

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA AMOSTRA
DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO MARCADORES
STRS AUTOSSÔMICOS E DO CROMOSSOMO Y**

**CURITIBA
Janeiro / 2012**

HEMERSON BERTASSONI ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA AMOSTRA
DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ UTILIZANDO MARCADORES
STRs AUTOSSÔMICOS E DO CROMOSSOMO Y**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, Área de Concentração Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz

Co-Orientador: Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior

CURITIBA

2012

DEDICATÓRIA

A Deus, que sem a sua sabedoria nada nesse mundo seria possível...

À minha família Kelly Cristina, Larissa e Rodrigo, que sempre me apoiaram e pacientemente compreenderam a minha ausência dedicada ao trabalho

Aos meus pais que são os responsáveis por aquilo que sou e ao suporte financeiro.

AGRADECIMENTO MUITO ESPECIAL

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz**, que com sua sabedoria, amizade e paciência conduziu-me ao término deste trabalho.

À minha Co-orientadora, **Profa. Dra. Vanessa Sotomaior**. Pelos ensinamentos e a contribuição ao nosso trabalho,

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), por meio do seu Excelentíssimo Reitor, **Prof. Dr. Clemente Ivo Juliatto**, pela oportunidade de conhecer e interagir com uma nova escola, e por amparar no caminho da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, **Coordenador de pesquisa**, pelas palavras sábias destinadas a nós, pós-graduandos.

Ao **Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho**, Coordenador do Programa de Pós-graduação, pelo apoio em todas as atividades necessárias para nossa formação.

Ao Ex-Diretor do Instituto de Criminalística do Paraná Dr. Carlos Roberto Martins de Lima, pelo apoio Incondicional na execução prática da tese.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS)** do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pelo estímulo, atenção, ensinamentos e carinho. O seu entusiasmo conduz a imagem e o espírito da casa.

Aos colegas e ex-estagiários e funcionários do Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Paraná: Renato Dall’Stella, Marcelo Malaghini, Maria Christina Marini, Marianna do Rosário Maia Taulois, Maria Madalena Tomen, Carlos Barbosa, Leandro Krause Guidolin e Junia Gomes.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação PUCPR, **Fernanda e Alcione**, pela atenção e auxílio durante todo o curso.

Aos professores componentes dos **Comitês Assessores de Pesquisa (CAPs), dos Seminários Júnior e Sênior, da banca de Qualificação**, pelas valiosas contribuições dadas a esta tese.

À Universidade Positivo pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a minha formação.

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO	02
ABSTRACT	04
INTRODUÇÃO	06
ARTIGO 1.....	15
ARTIGO 2.	20
DISCUSSÃO.	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
ANEXOS	45

Resumo

RESUMO

O presente estudo caracterizou a variabilidade genética de uma amostra da população do Paraná utilizando dois sistemas genéticos distintos: A) um total de 820 indivíduos, não aparentados, foi analisado por marcadores autossômicos, empregando a amplificação simultânea de 15 marcadores STRs: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818 e FGA; B) um total de 263 indivíduos, também não aparentados, foi analisado por marcadores do cromossomo Y, empregando a amplificação simultânea de 17 marcadores STRs por meio do Kit comercial AmpFIRTR® Yfiler™. Para os marcadores autossômicos foram calculados os seguintes parâmetros forenses: Poder de Discriminação, Poder de Exclusão, Índice de Paternidade Típico, Poder de Discriminação Combinado e o Poder de Exclusão Combinado. Todos os *loci* analisados estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni. Foi analisado a possibilidade de sub-estruturação genética, empregando a Análise Molecular da Variância com populações brasileiras, européias, africana e sul americana, e nenhuma diferença significativa foi encontrada, exceto com a população africana. Para os marcadores do cromossomo Y foram calculados os seguintes parâmetros forenses: Diversidade Gênica e Diversidade Haplotípica. Também foi analisada a possibilidade de sub-estruturação populacional, empregando a análise molecular da variância, com populações brasileiras, européias, africanas, e sul americanas. Segundo os dados estatísticos gerados pelos bancos de dados, em ambos os sistemas, marcadores autossômicos e marcadores do cromossomo Y, recomenda-se utilizar este estudo populacional como base para população paranaense em casos forenses e de investigação de paternidade.

Abstract

ABSTRACT

This study characterized the genetic variability of a sample of the Paraná population using two different genetic systems: A) a total of 820 individuals, not related, were analyze through autosomal markers by employing the simultaneous amplification of 15 STRs markers: D8S1179, D21S11, D7S820 , CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818 and FGA; B) a total of 263 male individuals, also unrelated, were analyze for markers of the Y chromosome, using the simultaneous amplification of 17 STRs markers with the commercial kit AmpFIRTR Yfiler®™. In the Autosomal markers, it has been calculated the following forensic parameters: Discrimination Power, Power of Exclusion, Typical Paternity Index, Combined Power of Discrimination and the Combined Power of Exclusion. After Bonferroni correction all analyzed *loci* were in Hardy-Weinberg equilibrium. It was analyze the possibility of genetic structure, using the Molecular Analysis of Variance with Brazilian populations, European, African and South American, and no significant difference was found, except in the African population. For the Y chromosome markers the following forensic parameters were calculated: Gene and Haplotype Diversity. It was also discuss the possibility of genetic distance, using the Analysis of Molecular Variance with Brazilian, European, African and South American populations. According to statistics generated by the databases, in both systems – autosomal and Y chromosome – it is recommended to use this as a basis for population-based studies in the state of Paraná for criminal cases and paternity suits.

Introdução

INTRODUÇÃO

Marcadores Moleculares em Estudos Populacionais

O estudo da composição genética das diferentes populações humanas sempre ocupou lugar de destaque na ciência. Nesse sentido foram, e ainda são, utilizados diversos tipos de marcadores genéticos polimórficos, como os grupos sanguíneos (ABO e Rh), proteínas séricas e eritrocitárias, imunoglobulinas, sistemas de histocompatibilidade e polimorfismos de DNA (Cavalli-Sforza et al., 1996), sendo que estes últimos tem assumido papel de destaque nas análises em laboratórios de genética molecular. (Butler et al., 2010)

Os Polimorfismos de DNA são sequências de nucleotídeos que apresentam duas ou mais diferentes sequências. Atualmente aplica-se a denominação de alelos para qualquer variante das sequências de base do DNA. Para se considerar que existe polimorfismo de DNA o alelo mais raro não deve ter sido mantido na população somente por mutações e deve ocorrer com uma frequência maior que 1% (Kendrew, 1994). Diversos marcadores polimórficos de DNA se encontram distribuídos em todo o genoma e são utilizados na identificação humana, mapeamento de genes e estudos populacionais.

Existem vários tipos de polimorfismos de DNA. Alguns compreendem alterações em um único nucleotídeo (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*). Sua origem pode ser por meio de deleções, inserções ou substituições de base, podendo ser identificados por meio da digestão com enzimas de restrição (RFLP- *restriction fragment length polymorphisms*), por DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) ou por seqüenciamento do DNA. Outro tipo de polimorfismo é o representado pelas variações no número de repetições de sequências em tandem (VNTR – *variable number of tandem repeats*). Nessa categoria estão representados os microsatélites (STRs – *Short Tandem Repeats*), formados por unidades de repetição de uma a 13 bases e os minissatélites, formados por unidades de repetição de 14 a 500 bases (*International Human Genome Sequencing, 2001*).

O sequenciamento do genoma humano revelou que os 23 cromossomos do *Homo sapiens* são compostos aproximadamente por 3 bilhões de pares de base,

dos quais cerca de 1,1% correspondem aos éxons, 23,9% a introns e 75% são sequências intergênicas. Cerca de 50% do genoma humano é constituído por sequências repetitivas que podem estar dispersas ou organizadas em tandem (Thompson, et al., 2008).

STRs e VNTRs podem ocorrer tanto nos cromossomos autossômicos, quanto nos cromossomos sexuais (X e Y), caracterizando polimorfismo de tamanho, onde a diferenciação entre indivíduos estaria no tamanho do alelo, gerado pela diferença entre o número de repetições, em um determinado *locus* estudado. No DNA mitocondrial (DNAMt), herdado pela linhagem materna, não temos STRs ou VNTRs, caracterizando polimorfismo de sequência onde a diferenciação entre indivíduos se dá pela diferença na sequência de DNA apresentado, quando comparado com uma sequência de DNA padrão chamada de Sequência de Anderson (Butler, 2001; Butler, 2010). Os diversos tipos de polimorfismos de DNA podem ser aplicados em identificação humana e mapeamento de genes de interesse clínico. Também podem ser utilizados em estudos de filogenia quando se deseja agrupar duas ou mais populações em função das suas frequências alélicas ou da similaridade das sequências (Butler, 2001).

Enquanto os cromossomos autossômicos são herdados de ambos os progenitores e os materiais paterno e materno podem ser “embaralhados” na recombinação meiótica, o cromossomo sexual Y não sofre recombinação em mais de 90% de sua extensão, a chamada NRY (*non recombining portion of the Y*) e é transmitido pelo pai somente a seus filhos homens. A única fonte de variação nessa região é representada pelas mutações que se acumulam gradativamente (Hammer et al., 1996).

Técnicas Moleculares

A técnica molecular mais utilizada para analisar os marcadores genéticos, em identificação humana, é a PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A PCR foi descrita primeiramente em 1985 por Kary Mullis, sendo modificada e refinada nos anos recentes. O processo da PCR é similar ao processo de replicação do DNA. A

molécula de DNA, contendo o segmento a ser amplificado, é aquecida brevemente para desnaturá-lo. Depois é resfriado na presença de grande excesso de oligonucleotídeos, que são iniciadores sintéticos denominados de *primers*, formando a etapa de hibridação. Os iniciadores são sintetizados, cada um complementar a uma seqüência curta de uma fita do segmento de DNA, posicionada logo além da extremidade da seqüência a ser amplificada, sendo usados, como citado anteriormente, como iniciadores do processo de amplificação. (Mullis et al., 1994).

A PCR possui vantagens sobre as outras técnicas moleculares como as RFLPs e por isso ganhou uma larga aceitação na comunidade científica. A vantagem primária da amplificação pela PCR é que quantidades de amostras de DNA tão pequenas quanto 1 fentograma podem ser analisadas. Este fato faz com que a análise de fios de cabelo e saliva em pontas de cigarros seja possível usando a PCR. A necessidade de pouca amostra para análise por PCR faz dela útil para amostras degradadas, onde a grande parte de DNA é degradada, deixando apenas poucos fragmentos pequenos para análise. É importante salientar que, pelo fato da PCR necessitar de pequenas amostras para o teste, uma outra parte da amostra original pode ser testada por outros laboratórios, satisfazendo um segundo controle dos resultados obtidos. A aplicação da análise do DNA para ciência forense é um mero aspecto da vasta implicação biológica que a ciência oferece (Hourn et al., 1989; Mullis et al., 1994; Melson et al., 1994).

Em relação às análises de vínculo biológico, tem-se muitos marcadores genéticos que são passíveis de serem utilizados, tanto em cromossomos autossômicos quanto em cromossomos sexuais. A combinação destes marcadores STRs autossômicos com outro marcador que avalia qual o sexo em questão, chamado amelogenina, representam no momento, o aspecto mais popular em relação à identificação humana, utilizando o DNA (Butler, 2001) (Butler et al 2010).

Banco de Dados

A formação do povo brasileiro resulta de um prolongado processo de alta miscigenação biológica e cultural, devido a extrema variabilidade de seus grupos étnicos originais e à sua distribuição por toda uma gama de condições ambientais.

Os brasileiros compõem uma das mais heterogêneas populações do mundo, sendo resultado de cinco séculos de cruzamento interétnicos entre povos de três continentes: os colonizadores europeus, representados principalmente por portugueses; escravos africanos e nativos americanos(indígenas). Este fato gerou uma identidade nacional singular e um povo marcadamente mestiço, na aparência e na cultura (Penna, et al., 2002)(Alves-Silva, 2000).

A colonização brasileira foi principalmente formada pela união de indivíduos do gênero masculino europeus, com indivíduos do gênero feminino representados por indígenas e africanos (Carvalho-Silva, 2001; Salzano, 2002). Um outro estudo recente revelou que na população brasileira, os haplótipos do cromossomo Y, são indistinguíveis dos haplótipos representados pelos primeiros imigrantes portugueses (Carvalho-Silva, 2006).

Em 1808, a família real chega ao Brasil, iniciando um fluxo migratório de famílias européias. O Brasil recebeu grandes contingentes de famílias de portugueses, italianos, espanhóis, alemães, japoneses, sírios e libaneses, que participaram do processo de mistura racial. (Ribeiro, et al, 1995)

A colonização do Estado do Paraná teve uma contribuição significativa pela migração de descendentes europeus, os quais datam de 1802 até a década de 50. Entre o período de 1875 a 1950, cerca de 5 milhões de europeus imigraram para o Brasil, permanecendo a sua maioria nos estados do sul do país. Um total de 80% dos imigrantes veio de Portugal, Itália, Espanha e Alemanha. Muito embora estes grupos de imigrantes europeus fossem etnicamente heterogêneos, seus descendentes ao contrário são relativamente homogêneos e hoje eles são encontrados primariamente no sul do país, nos estados do Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e no Rio Grande do Sul (RS). No Paraná, 70,3% da população é euro-descendente, e 3% consistem em brasileiros afrodescendentes. Atualmente, brasileiros de origem europeia constituem 49,4% da população total, 42,3% são constituídos de raça-misturada, 7,4% formado pelos brasileiros africanos e 0,8% constituídos por asiáticos e ameríndios (Faucz et al., 2010).

Os Bancos de dados de frequências alélicas são utilizados para mensurar a raridade do perfil genético na população em estudo, para dar suporte às estimativas

de probabilidades utilizadas em testes de vínculo biológico genético. Saber a frequência que um determinado alelo ocorre na população em estudo é o ponto fundamental para estabelecer vínculos genéticos biológicos (Bucketon et al., 2005).

Em testes de vínculo biológico, para elaboração dos cálculos estatísticos de probabilidade de inclusão de parentesco, faz-se necessário a utilização de tabelas com frequências alélicas adequadas. Isto significa que uma população de pessoas tomadas ao acaso e de mesma etnia foi genotipada, que o tamanho da amostra é suficientemente grande para favorecer as frequências gênicas com um erro mínimo nas estimativas dos alelos do sistema e que o homem testado e o pai biológico pertençam a mesma população.

Atualmente alguns kits comerciais estão disponíveis como o Identifiler™ (Life Technologies), o Power-Plex 16™ (Promega Corporation) que juntos conseguem formar um perfil genético com 15 loci autossômicos informativos. Estes sistemas tornam as análises de investigação de vínculo biológico mais acessíveis, permitindo sua utilização em grandes rotinas laboratoriais.

No Brasil existe uma escassez de estudos populacionais de frequências alélicas de STRs autossômicos, levando-se em conta as dimensões continentais do nosso país. Alguns trabalhos envolvendo um banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos, foram descritos em populações do Rio Grande do Sul (Leite et al., 2005), de São Paulo (Bydlowski et al., 2002), do Rio de Janeiro (Góes et al., 2003; Silva et al., 2004), de Minas Gerais (Castollo et al., 2008) e do Brasil envolvendo as 5 regiões (Gratapaglia et al., 2.000; Poiares et al., 2009).

Em conjunto com estes potentes marcadores autossômicos, um número de STRs específicos do cromossomo Y, estão disponíveis para avaliar a herança patrilinea. O primeiro Y-STR (STR específico do cromossomo Y) descrito foi o *locus* Y27H39, conhecido atualmente como DYS19 (Rower, 1992). Logo em seguida, um número crescente de Y-STRs foram sendo descritos. A aplicabilidade destes polimorfismos Y-STRs foi demonstrada em várias situações: Testes de investigação de paternidade; identificação de restos mortais em desastres em massa; estudos evolutivos envolvendo migração e formação populacional; estudos forenses

envolvendo evidências de ataque sexual e casos contendo misturas de DNA masculino-masculino e masculino-feminino (Corach et al., 2001; Butler, 2002).

Cerca de 25 Y-STRs já foram descritos e seus haplótipos estudados, sendo formado uma rede de bases de dados referência, de populações européias e norte-americanas, disponíveis *on-line* (Rower et al., 2000). Padronizações de protocolos e estudos de validação para os Y-STRs foram feitos, mobilizando intensivas estratégias de cooperação dos laboratórios no mundo todo. Diferentes plataformas foram empregadas para tipagem dos Y-STRs como a coloração com sais de prata e a detecção fluorescente em sequenciadores automáticos (Butler, 2001).

Atualmente alguns kits comerciais estão disponíveis como o Y-Plex 6™, o Y-Plex 5™ e o Power Plex® Y System. O Y-Plex 5 e o Y-Plex 6 são fabricados pela Reliagene Technologies, INC, que juntos conseguem formar um haplótipo com dez loci informativos. O Power Plex® Y System é fabricado pela Promega Corporation e perfaz um haplótipo com 12 loci informativos. O sistema AmpliSTR Y-filer® é fabricado pela Applied Biosystems e amplifica 17 loci informativos (Mulero et al., 2006). Estes sistemas tornam as análises de investigação de vínculo biológico mais acessíveis, permitindo sua utilização em grandes rotinas laboratoriais (Reliagene, 2003; Promega, 2004; Mulero et al., 2006).

Os Y-STRs representam marcadores de linhagem paterna, passando de geração para geração sem mudanças, exceto em eventos mutacionais. Sendo assim, a informação genética de cada marcador é relatada em forma de haplótipos, devido a existência de apenas um alelo por locus por indivíduo, diferentemente dos genótipos observados nos marcadores autossômicos. Devido aos marcadores do cromossomo Y estarem ligados ao mesmo cromossomo, ou seja, não ocorre uma divisão da herdabilidade de geração para geração, os cálculos estatísticos, para se obter uma probabilidade de relação de vínculo biológico, não podem envolver a regra dos produtos, pois os haplótipos são de caráter ligado e segregados conjuntamente.

Segundo Evett e colaboradores em 1998 e Brenner et al 1990, os parâmetros estatísticos gerados a partir do banco de dados dos STRs autossômicos são:

Razão de Verossimilhança (*Matching Probability*) - representa o número de indivíduos que devem ser examinados antes de se encontrar o mesmo perfil de DNA em um indivíduo selecionado aleatoriamente na mesma população;

Poder de Discriminação: representa a porcentagem de indivíduos que os marcadores moleculares genéticos podem discriminar em relação à população estudada. Matematicamente se expressa em $1 - \text{a Razão de Verossimilhança}$;

Poder de Exclusão: refere-se à capacidade de um teste genético para excluir um homem da possibilidade de paternidade biológica, ou seja, utilizando os marcadores moleculares, loci gênicos, qual a probabilidade de se enxergar uma exclusão;

Heterozigotidade: frequência de heterozigotos na população;

Homozigotidade: frequência de homozigotos na população;

Valores de Probabilidade P para o teste exato do Equilíbrio de Hardy-Weinberg: permite saber se os alelos representados pela população estão sendo herdados aleatoriamente, seguindo as leis de Mendel;

Análise Molecular da Variância (AMOVA) – Valores de Fst e Rst: descreve a proporção de variância dentro de uma espécie devido a subdivisão populacional e é inversamente proporcional ao fluxo gênico. Valores baixos de Fst e Rst indicam que a maior parte da diversidade ocorre entre indivíduos da mesma população, sendo considerado que valores abaixo de 0,05 correspondem a pouca diferenciação dentro da população. Valores entre 0,05 e 0,15 apresentam diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25 apresentam grande diferenciação e valores acima de 0,25, denotam uma diferenciação genética muito elevada (Balloux et al., 2002).

Os parâmetros estatísticos gerados a partir do banco de dados dos STRs do Cromossomo Y podem ser definidos segundo Nei (1987) em:

Frequência haplotípica: representa o número de vezes que o haplótipo foi observado na população;

Diversidade Gênica: representa a probabilidade de dois indivíduos tomados ao acaso possuírem alelos diferentes para o mesmo locus;

Diversidade Haplotípica: representa a probabilidade de que dois haplótipos tomados ao acaso sejam diferentes. Para o cromossomo Y a diversidade haplotípica é numericamente idêntica ao parâmetro usado para os cromossomos autossômicos que é o Poder de Discriminação.

Com base nas informações apresentadas e na inexistência de estudos relacionados a montagem de um banco de dados de frequência alélica de STRs autossômicos e haplotípica de Y-STRs no Paraná e a escassez destes estudos no Brasil, o presente trabalho pretende elaborar este banco de dados com a finalidade de determinar as frequências alélicas, haplotípicas e a eficiência dos parâmetros estatísticos a partir dos dados populacionais, verificando se a utilização destes marcadores genéticos são uma estratégia relevante para identificação humana forense.

Artigo 1

ARTIGO 1

STR data for 15 autosomal STR markers from Paraná (southern Brazil)

Hemerson Bertassoni Alves^{ad}, Fábio P. das Neves Leite^e, Karin Braun^c, Leandro K. Guidolin^b, Renato Dall'Stella^b, Maria Madalena Tomen^b, Marcelo Malaghini^b, Vanessa Santos Sotomaior^d, Fábio Rueda Faucz^d.

^aLaboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística, Curitiba, Brazil

^bLaboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística, Curitiba, Brazil

^cUniversidade Federal do Paraná

^dLaboratory of Molecular Genetics, Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Science, Center for Biological and Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba -PR, Brazil.

^e Instituto Geral de Perícias, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ABSTRACT

Allele frequencies for 15 STR autosomal loci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818 and FGA) included in the AmpF/STR[®] Identifiler[™], were obtained from a sample of unrelated individuals from Paraná (southern Brazil). The expected performance of these loci for personal identification and paternity testing in the population of Paraná was also estimated.

Population

820 admixture, unrelated and healthy individuals from the southern Brazilian State of Paraná (Figure 1).

Extraction

DNA was extracted from peripheral blood samples by Chelex procedure[®] [1].

PCR

0,125ng/uL target DNA, according to the manufacture's instruction (Identifiler[™] PE Applied Biosystems).

Typing

Capillary sequencer ABI 310 and reference sequence ladders (PE Applied Biosystems).

Results

The allele frequencies and statistical parameters for the 15 STR analyzed are shown in Table 1.

Quality Control

Proficiency testing of the GEP-ISFG.

Analysis of Data

Forensic efficiency parameters were estimated using Powerstats [2], and the Hardy-Weinberg equilibrium deviation was calculated by GENEPOP [3].

Table 1
Allele frequencies and statistical parameters in a population sample from Paraná, Brazil

Allele ^a	D8S1179 (N:820)	D21S11 (N:820)	D7S820 (N:820)	CSF1PO (N:820)	D3S1358 (N:820)	TH01 (N:820)	D13S317 (N:820)	D16S539 (N:820)	D2S1338 (N:820)	D19S433 (N:820)	VWA (N:820)	TPOX (N:820)	D18S51 (N:820)	D5S818 (N:820)	FGA (N:820)
5						0.001		0.001				0.005			
6						0.210						0.014			
7			0.016	0.010		0.260	0.001					0.002		0.029	
8	0.013		0.139	0.011		0.120	0.105	0.017				0.463		0.009	
9	0.007		0.106	0.021		0.143	0.098	0.132				0.122	0.001	0.049	
9.3						0.253									
10	0.080		0.273	0.275		0.013	0.045	0.088		0.005		0.064	0.011	0.057	
11	0.073		0.254	0.273	0.001		0.271	0.287		0.013	0.003	0.268	0.009	0.338	
12	0.123		0.184	0.340	0.001		0.290	0.275		0.096	0.001	0.062	0.138	0.329	
12.2										0.008					
13	0.280		0.027	0.062	0.002		0.137	0.174		0.255	0.005	0.001	0.113	0.174	
13.2										0.044					
14	0.242		0.001	0.007	0.095		0.052	0.025		0.285	0.073		0.149	0.012	
14.2										0.026					
15	0.148				0.309		0.001	0.001		0.147	0.129		0.163	0.003	
15.2										0.062					
16	0.026				0.273				0.046	0.035	0.267		0.130	0.001	0.001
16.2										0.017					
17	0.007				0.190				0.215	0.002	0.276		0.130		0.003
17.2										0.002					
18	0.001				0.123				0.088		0.168		0.062		0.007
18.2															
19					0.008				0.129		0.063		0.048		0.077
19.2															
20									0.111		0.012		0.023		0.107
20.2															
21									0.059		0.005		0.014		0.159
21.2															
22									0.062				0.007		0.147
22.2															
23									0.128						0.169
23.2															
24									0.082				0.001		0.147
24.2		0.003													
25									0.068						0.108
25.2		0.002													
26		0.001							0.012						0.054
27		0.020							0.001						0.013
28		0.129													0.005
29		0.220													
30		0.246													
30.2		0.037													0.001
31		0.057													
31.2		0.120													0.002
32		0.010													
32.2		0.105													0.001
33		0.003													
33.2		0.037													
34		0.002													
34.2		0.002													
35		0.004													
36		0.002													
37		0.001													
P	0.6991	0.568	0.606	0.0549	0.7783	0.8533	0.4909	0.381	0.0583	0.0574	0.5896	0.5533	0.228	0.1613	0.0085
MP	16.8	22.65	13.9	8.3	10.8	12.7	14.5	12.7	37.3	15.9	14.0	7.1	36.2	8.8	32.5
PD	0.94	0.96	0.928	0.880	0.907	0.921	0.931	0.922	0.973	0.937	0.929	0.859	0.972	0.887	0.969
PE	0.606	0.67	0.586	0.426	0.73	0.581	0.570	0.561	0.705	0.676	0.622	0.399	0.688	0.504	0.697
TPI	2.55	3.08	2.41	1.66	2.33	2.38	2.32	2.27	3.45	3.13	2.66	1.56	3.25	1.97	3.36
Hom	19.6%	16.2%	20.7%	30.1%	21.5%	21.0%	21.6%	22.1%	14.5%	16.0%	18.8%	32.0%	14.4%	25.4%	14.9%
Het	80.4%	83.8%	79.3%	69.9%	78.5%	79.0%	78.4%	77.9%	85.5%	84.0%	81.2%	68.0%	84.6%	74.6%	85.1%
PD Comb.	0.999999999999999751														
PE Comb.	0.9999993281														

MP: Matching Probability expressed as 1 in...; **PD:** Power of Discrimination; **PE:** Power of exclusion; **TPI:** Typical Paternity Index; **Hom:** Homozygotes; **Het:** Heterozygotes; **N=**number of individuals typed
P=Probability values of exact test for Hardy-Weinberg equilibrium; **PD comb:** Power of Discrimination combined; **PE comb:** Power of Exclusion Combined;

Other Remarks:

All the analyzed loci reached the Hardy-Weinberg equilibrium after the Bonferroni correction. To address the possibility of genetic structuring, our data was compared with other published data, from African [4], European [5] [6], Argentinean [7] and Brazilian [8] [9] populations. For this purpose, pairwise F_{ST} values were estimated using the Arlequin software [10]. Our data presented significant differences ($p > 0.05$) only when compared with the Guinea Bissau data [4]. For the rest of the comparisons, no significant differences were found. In summary, based on the allele frequencies and statistical parameters for the AmpFISTR Identifiler system presented herein, the combination of these 15 STR loci presents a powerful strategy for individual identification and parentage analyses for this Brazilian population. This paper follows the guidelines for publication of population data requested by the journal [11].

References

- [1] P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi, Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Biotechniques* 10 (1991) 506-513.
- [2] Powerstats v1.2, Promega Corp.
- [3] M. Raymond, F. Rousset, GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, *J. Hered.* 86 (1995) 248-249.
- [4] C. Alves, L. Gusmão, A. Damasceno, B. Soares, A. Amorim, Contribution for an African STR database (AmpFISTRIdentifiler and Powerplex 16 System) and a report on genotypic variations, *Forensic Sci Int.* 139 (2004) 201–205.
- [5] M. Paredes, M. Crespillo, J.A. Luque, J.L. Valverde, STR frequencies for the PowerPlex1 16 System kit in a population from Northeast Spain, *Forensic Sci. Int.* 135 (2003) 75–78.
- [6] M.F. Pinheiro, L. Caine, L. Pontes, D.Abrantes, G.Lima, M.J.Pereira, P.Rezende, Allele frequencies of sixteen STRs in the population of Northern Portugal, 2005, *For Sci Int* 148 (2005) 221-223.
- [7] U. Toscanini, L. Gusmão, G. Berardi, A. Amorim, A. Carracedo, A. Salas, E. Raimondi, Testing for genetic structure in different urban Argentinian populations, *Forensic Science International* 165 (2007) 35–40.
- [8] F.P.N Leite, F.J. Menegassi, S.P.Schwengber, P.E. Raimann, T.K. Albuquerque, STR data for 09 Autosomal STR markers from Rio Grande do Sul (southern Brazil), *Forensic Sci Int.* 132 (2003) 223-224.
- [9] S.M. Callegari-Jacques, D. Grattapaglia, F.M. Salzano, S.P. Salamoni, S.G. Crossetti, M.E. Ferreira, M.H. Hutz, Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population, *Am. J. Hum. Biol.* 15 (2003) 824-834.
- [10] S. Schneider, D. Roessli, L. Excoffier, Arlequin v2000, A software for population genetic data analysis, University of Geneva, 2000.
- [11] P. Lincoln, A. Carracedo, Publication of population data of human polymorphisms, *Forensic Sci. Int.* 110 (2000) 3-5.

Artigo 2

ARTIGO 2

Announcement of Population Data

Haplotype diversity of 17 Y-chromosome STRs in Paraná (southern Brazil)

Hemerson Bertassoni Alves^a, Rinaldo W. Pereira^b, Junia G. Scouto^a, Vanessa Santos Sotomaior^c, Fábio Rueda Faucz^c.

^aLaboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística, Curitiba, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília
Brasília DF, Brazil

^cLaboratory of Molecular Genetics, Group for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Science, Center for Biological and Sciences, Pontificia Universidade Catolica do Paraná, Curitiba -PR, Brazil.

Population

Two hundred sixty three admixture, unrelated and healthy males randomly sampled from publicly funded paternity casework in the southern Brazilian State of Paraná (Figure 1).

Extraction

DNA was extracted from peripheral blood samples using Chelex[®] [1]

PCR amplification

The PCR was performed according to the manufacture's instruction (AmpFIRTR[®] Yfiler™ PCR amplification kit, Applied Biosystems) using 1-2 ng of template DNA.

Typing of STRs:

Typing was performed in an ABI Prism 310 genetic analyzer using Genescan[®] and Genotyper[®] Analysis Softwares. Allele Calling was based on comparison with the allelic ladders provided in the AmpFIRTR[®] Yfiler™ PCR amplification kit (Applied Biosystems). After automatic allele calling, all electropherograms were visually inspected and allele calls verified.

Quality Control

Proficiency testing of the GEP-ISFG Working Group for the minimal haplotype STRs, between 2002-2007.

Analysis of Data

Haplotype frequencies were estimated by gene counting. Haplotype diversities and the analysis of molecular variance (AMOVA) were performed using the Arlequin 3.11 software. [2] For population comparisons data was inputted excluding locus locus DYS385I/II and subtracting the number of repeats in DYS389I from the number of repeats in DYS389II. The AMOVA was carried out based on R_{st} genetic distances. [2]

Access to the data:

The raw data worksheet and the Arlequin input files are available upon request on the corresponding author.

Results:

A total of 247 different haplotypes were observed, 234 unique, 11 with two occurrences, 1 with three occurrences and 1 with four records. (Table 1). As expected an increased number of different haplotypes were observed with increasing number of STRs analyzed: 196 with the 9-loci minHt, 214 with the 11 loci SWGDAM panel (minHt plus DYS438 and DYS439), 218 with 12- loci Power Plex[®] Y system kit (SWGDAM plus DYS437) and 247 with the AmpFIRTR[®] Yfiler™ STRs 17-loci panel. The 17 loci combined in the AmpFIRTR[®] Yfiler™ showed a higher discrimination capacity than the more commonly used panels based on 9, 11 or 12 Y STRs. Table 1 show the allele frequencies and the genetic diversity of the Y STRs analysed in the Paraná population sample. Table 2 presents the haplotype distribution of the Y-chromosome obtained among 263 individuals analysed.

Other Remarks:

Brazilian colonization was mainly formed from the union of European Males with females represented by Indian and African. This shows that the majority of Y-chromosome haplotypes in contemporary Brazilian population has a European origin. [3-4]. Another recent study revealed that the Y-chromosome haplotypes are indistinguishable from the first Portuguese immigrants. [5]

Paraná State's colonization has an important migration of people of European descent, which started in 1802 and decreased dramatically after 1950. From 1875 to 1950, about 5 million Europeans immigrated to Brazil, settling mainly in the Southern states. A total of 80% of the immigrants came from Portugal, Italy, Spain and Germany. Although this European group was ethnically heterogeneous with a widespread admixture, European descendants are relatively homogeneous, and today, they are found primarily in the South, such as in states of Paraná(PR) and Santa Catarina (SC). In PR, 70.3% of the population is of European origin, whereas 3% consists of African Brazilians[6]. Nowadays, Brazilians with a European origin constitute 49.4% of total population, mixed-race 42.3%, African Brazilians 7.4%, Asians and Amerindians 0.8%.[6]

In 1998, the State of Paraná, through the Molecular Genetics Laboratory at the Institute of Criminology, unique in the whole state territory, began his routine analysis in forensic DNA and paternity leave, and later, in 2007, introduced the markers of STRs Y chromosome.

Pairwise Rst analysis show that our data from the PR population is not significantly different, after Bonferroni correction ($P > 0.05$) ($R_{st} = 0.00211$ and $P\text{-value} = 0.06256 + 0.00782$) from the whole Brazilians dataset of 17 Y-STR loci [7] [8].

However, there are not a huge number of published data based on 17 Y-STR loci, most of the data can be analysed using minimal haplotype. We also compared PR population, using minimal haplotype, with data previously published from **Brazil** [7], **Brazil** [9], **Rio de Janeiro admixture** [10], **Santa Catarina**[11], **Black from Rio Janeiro**[12], **Pará admixture** [13], **São Paulo**[14], **Rio Grande do Sul**[8], **Portugal Azores** [15], **Mozambique**[16], **Cabinda**[17], **Colombian_Black**[18], **Colombian_Caucasian**[19], **Argentina** [20], **Spain** [21] and **Portugal Central Region** [15]. Pairwise Rst distances (in parenthesis) show that PR population, after Bonferroni correction $p \leq 0.003$, is not different from , Brazil [7] (**0.00278**), Brazil [9] (**-0.00049**), RJ admixture [10] (**-0.00166**) , Santa Catarina[11] (**0.00313**), São Paulo[14] (**0.00760**), Rio Grande do Sul[8] (**0.00134**), Portugal Azores [15] (**0.00207**), Argentina[20] (**0.00569**) , Spain[21] (**0.00998**) and Portugal Central Region[22] (**0.01142**), is Marginally different from, Black from Rio Janeiro[12] (**0.04736**), Pará admixture[13] (**0.03275**) and Colombian_Caucasian[19] (**0.01884**), is very divergent from Moçambique[16] (**0.38078**), Cabinda[17] (**0.37513**) and Colombian_Black[18] (**0.19968**). We also compared PR population using data from YHRD <http://www.yhrd.org>, going to analyse 10 populations, which is a total of 1499 haplotypes. Parana, uploaded sample with 247 haplotypes; Bahia, Brazil [Admixed Brazilian], population sample with 205 haplotypes; Belém, Brazil [Admixed Brazilian], population sample with 400 haplotypes; Boa Vista, Brazil [Admixed Brazilian], population sample with 49 haplotypes; Macapá, Brazil [Admixed Brazilian], population sample with 51 haplotypes; Manaus, Brazil [Admixed Brazilian], population sample with 77 haplotypes; Palmas, Brazil [Admixed Brazilian], population sample with 30 haplotypes; Porto Alegre, Brazil [European], population sample with 46 haplotypes; Pôrto Velho, Brazil [Admixed Brazilian], population sample with 139 haplotypes Rio Grande do Sul, Brazil [European], population sample with 255 haplotypes. Pairwise Rst distances (in parenthesis) show that PR population, after Bonferroni correction $p \leq 0.005$, is not different from Bahia, Brazil [Admixed Brazilian], Manaus, Brazil [Admixed Brazilian], Palmas, Brazil [Admixed Brazilian], Porto Alegre, Brazil [European], Porto Velho, Brazil [Admixed Brazilian] and Rio Grande do Sul, Brazil [European], is marginally different from Boa Vista Brazil [Admixed] and very divergent from Belém[Admixed Brazilian]. This results indicates, by the Rst values for 17 Y-STR loci as well for a minimal haplotype, or even in the YHRD data base, from many populations in Brazil, that we can pool the haplotypes of each State, became in a bigger database and analyse it as a representative Brazilian population. The complete data of this relationship with the values of Rst and p, are available upon request of corresponding author.

This paper follows the guidelines for publication of population data requested by the journal. [22]

References

- [1] P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, Watick, (1991) v.10, p.506-513.
- [2] L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider, Arlequin version 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinform. Online* 1(2005) 47-50.
- [3] D.R. Carvalho-Silva, F.R. Santos, J. Rocha, S.D. Pena, The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages, *Am.J. Hum. Gent.* 68 (2001) 281-286.
- [4] F.M. Salzano, M.C. Bortolini, *The Evolution and Genetics of Latin American Population*, Cambridge University Press, Cambridge, 2002.

- [5] D.R. Carvalho-Silva, E. Tarazona-Santos, J. Rocha, S.D.J. Pena, F.R. Santos, Y-chromosome diversity in Brazilians: switching perspectives from slow to fast evolving markers, *Genética* 126 (2006) 251-260.
- [6] F.R. Faucz, D.A.S. Souza, M. O., S. Raskin CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country, *Journal of Human Genetics* (2010) 55, 71–76.
- [7] R.W. Pereira, E.H.G. Monteiro, G.C.R. Hirschfeld, A.Y. Wang, D. Grattapaglia, Haplotype diversity of 17 Y-chromosome STRs in Brazilians, *Forensic Sci. Int.* 171 (2007) 226-236.
- [8] S.P. Schwengber, T. Kommers, C.H.F. Matte, P.E. Raimann, B.A. Carvalho, F.P.N. Leite, M.A. Medeiros, L.F. Sousa, C.S. Castro, F.G.C. Chassot, S.L. Bonatto, Population data of 17 Y-STR loci from Rio Grande do Sul state (South Brazil). *Forensic Sci. Int.: Genetics* 4 (2009) e31-e33.
- [9] D. Grattapaglia, S. Kalupniek, C. Guimarães, M.A. Ribeiro, P.S. Diener, C. N. Soares, Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian Population. *Forensic Sci. Int.* 2005, 149: 99-107.
- [10] A.C. S. Góes, E.F., Carvalho, I. Gomes, D.A. da Silva, E. H. F. Gill, A. Amorim, L. Gusmão. Population mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). *Int. J. Legal Med* 2005. 119: 70-76.
- [11] L. Cainé, F. Corte-Real, D.N. Vieira, M. Carvalho, A. Serra, V. Lopes, M.C. Allele frequencies and haplotypes of 8 Y-chromosomal STRs in the Santa Catarina population of southern Brazil. *Forensic Sci. Int.*, 2005 148:75-79.
- [12] P.M. Domingues, L. Gusmão, D.A. da Silva, A. Amorim, R.W. Pereira, E.F. de Carvalho, Sub Saharan África Descendents in Rio de Janeiro (Brazil): population and mutational data for 12 Y-STR loci, *Int. J. Legal Med.* 121 (3) (2007) 238-241.
- [13] T.J. B. F. Palha, E. M. R. Rodrigues, S. E. B. dos Dantos, Y-chromosomal haplotypes in a population from the Amazon region. *Forensic Science International* (2006).
- [14] C.C. Góis, J.A. Martins, G.A. Pereira, A. Freschi, G.G. Paneto, V.L.S. Alvarenga, R.M.B. Cicarelli, M.H. Hirata, R.N. Oliveira. Genetic population data of 12 STR loci of the Power Plex Y system in state of São Paulo population (Southeast Brazil). *For. Sci. Int.* 174 (2008) 80-85.
- [15] M. Carvalho, M.J. Anjos, L. Andrade, V. Lopes, M.V. Santos, J.J. Gamero, F. Corte Real, M.C. Vide. Y-Chromosome STR haplotypes in two population samples: Azores Islands and Central Portugal, *Forensic Sci. Int.* 134 (2003) 29-35.
- [16] P. Sanchez-Diz, T. de La Fé, B. Quintáns, A. Salas, Y-chromosome STRs in populations of Bantu, origin from Mozambique: Male Contribution to the Africa genetic pool and forensic implications, *Int. Congr. Ser.* 1239 (2003) 419-424.
- [17] C. Alves, L. Gusmão, J. Barbosa, A. Amorim. Evaluating the informative power of Y-STRs: a comparative study using European and new African haplotype data. *FSI Int.* 174, (2002), 126-133.
- [18] J.J. Yunis, L.E. Acevedo, D.S. Campo, E. J. Yunis. Population data of Y-STR minimal haplotypes in a sample of Caucasian-Mestizo and African descent individuals of Colombia. *Forensic Science International* 151 (2005) 307–313.
- [19] J.J. Yunis, L.E. Acevedo, D.S. Campo, E. J. Yunis. Population data of Y-STR minimal haplotypes in a sample of Caucasian-Mestizo and African descent individuals of Colombia. *Forensic Science International* 151 (2005) 307–313.
- [20] M. Fondevila, J.C. Jaime, A. Salas, M.V. Lareu, A. Carracedo, Y-chromosome STR haplotypes in Córdoba (Argentina). *Forensic Sci. Int.* 137 (2003) 217-220.
- [21] P. Martín, J. Garcia-Hirschfeld, O. Garcia, L. Gusmão, P. García, C. Albarrán, M. Sancho, A. Alonso. A Spanish population study of 17 Y-Chromosome STR loci, *Forensic Sci. Int.* 139 (2004) 231-235.
- [22] P. Lincoln, A. Carracedo, Publication of population data of human polymorphisms, *Forensic Sci. Int.* 110 (2000) 3-5.

[

Corresponding author.

Address: Instituto de Criminalística do Paraná,

Av. Visconde de Guarapuava, 2652 Zip code: 80.010-100. Curitiba-PR

Tel: +55-41-3323-6164;

Fax: +55-41-3281-5600

E-mail address: hbertassoni@hotmail.com

ALELO	DYS19	DYS389I	DYS389II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	DYS437	DYS438	DYS439	DYS448	DYS456	DYS458	DYS635	YGATAH4	Haplótipos	DYS385 I/II
7																10, 11	0.0038
8																10, 13	0.0038
9					0.0494				0.0760							10, 14	0.0152
10					0.5057	0.0038	0.0038		0.2928	0.0988					0.0266	10, 15	0.0076
11					0.4335	0.4145	0.0076		0.1635	0.3042					0.3308	11, 11	0.0152
12		0.1293			0.0114	0.0456	0.1559		0.4449	0.4525					0.5627	11, 12	0.0267
13	0.1217	0.6464				0.4753	0.6882	0.0038	0.0228	0.1179		0.0114			0.0799	11, 13	0.0267
14	0.5323	0.2205				0.0570	0.1027	0.3840		0.0228		0.0875	0.0418			11, 14	0.3194
15	0.2585	0.0038				0.0038	0.0380	0.5057		0.0038		0.4943	0.1141			11, 15	0.0723
16	0.0647						0.0038	0.1065				0.3118	0.2624			11, 16	0.0076
17	0.0228										0.0076	0.0798	0.2928			11, 17	0.0038
18											0.0494	0.0152	0.1749			12, 12	0.0076
19											0.4639		0.0836	0.0076		12, 14	0.0457
20											0.3346		0.0304	0.0532		12, 13	0.0114
21				0.0646							0.1293			0.2015		12, 15	0.0038
22				0.0761							0.0114			0.1027		12, 16	0.0038
23				0.2395							0.0038			0.5209		12, 17	0.0076
24				0.5019										0.0951		13, 13	0.0076
25				0.1065										0.0190		13, 14	0.0532
26			0.0076	0.0114												13, 15	0.0114
27			0.0114													13, 16	0.0380
28			0.1027													13, 17	0.0076
29			0.3916													13, 18	0.0114
30			0.2966													13, 19	0.0076
31			0.1293													13, 21	0.0038
32			0.0494													14, 14	0.0304
33			0.0114													14, 15	0.0190
34																14, 16	0.0190
DG	0.633	0.519	0.731	0.672	0.556	0.655	0.492	0.588	0.686	0.681	0.656	0.646	0.795	0.668	0.569	14, 17	0.0190
																14, 18	0.0038
																14, 19	0.0038
																15, 15	0.0228
																15, 17	0.0190
																15, 16	0.0152
																16, 16	0.0152
																16, 17	0.0380
																16, 18	0.0152
																16, 19	0.0076
																16, 20	0.0038
																16, 24	0.0038
																17, 17	0.0076
																17, 18	0.0038
																17, 19	0.0076
																17, 20	0.0038
																18, 18	0.0038
																18, 19	0.0076
																18, 21	0.0076
Diversity	0.633	0.519	0.731	0.672	0.556	0.655	0.492	0.588	0.686	0.681	0.656	0.646	0.795	0.668	0.569		0.881

Total Haplotipic Diversity: 99,94%

For locus DYS385 I/II genotype frequencies are show.

Table 1 Allele frequencies and gene diversity data for the 17 Y-STR loci estimated from a sample of 263 unrelated healthy males from Paraná State os Brazil.

Discussão

RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS

BANCO DE DADOS DOS STRs AUTOSSÔMICOS

Em 1998, o Estado do Paraná, por meio do Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística, único em todo território estadual, começou a sua rotina de análises em DNA de casos criminais forenses, utilizando somente os marcadores STRs autossômicos. Em 2007, iniciou-se então a rotina com os marcadores uniparentais do cromossomo Y, onde atualmente fazem parte juntos, do arsenal analítico do laboratório.

Neste estudo foram analisados 820 perfis genéticos de marcadores STRs dos cromossomos autossômicos e 263 perfis genéticos de marcadores STRs do cromossomo Y, perfazendo um tamanho amostral adequado para caracterizar a variabilidade genética da população do Estado do Paraná. Os perfis genéticos foram gerados pelo Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística, de indivíduos sadios, não relacionados, miscigenados e que residem em diferentes regiões do Estado do Paraná. Estes indivíduos se submeteram a coleta de sangue venoso para realização dos testes de Investigação de Paternidade, assinando o termo de autorização para coleta de material biológico, conforme apresentado no item 06 Anexos da tese. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUC-PR e aprovado segundo o parecer nº **0003496/2009**.

O banco de dados de frequência alélica para caracterização da variabilidade genética da população do Estado do Paraná por meio dos marcadores STRs, foi constituído por meio da análise de 15 loci microssatélites autossômicos, utilizando o conjunto comercial AmpFI STR® Identifier PCR Amplification: CSF1PO, FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D21S11, D2S1338, D19S433.

O levantamento da distribuição alélica revelou que os loci com maior e menor número de alelos foram respectivamente, o D21S11 com 19 alelos e o TH01 com 8 alelos. A maior frequência alélica observada foi a do locus TPOX, alelo 8, constituindo um valor de 0,496.

Os resultados relativos aos cálculos de Poder de Discriminação(PD) demonstram que os loci com o maior poder de discriminação são: D2S1338 (0,93), D18S51(0,972), D21S11(0,96) e FGA (0,96). O locus com o menor PD observado foi o TPOX (0,859). O Poder de Discriminação combinado para os 15 *loci* STRs analisados foi de 0,9999999999999999751.

Os resultados relativos aos cálculos de Poder de Exclusão (PE) demonstram que os loci com o maior poder de exclusão são: D2S1338 (0,705), FGA (0,69), D18S51 (0,688) e D21S11 (0,67) O locus com o menor PE observado foi o TPOX (0,399). O Poder de Exclusão combinado para os 15 loci STRs analisados foi de 0,9999993281.

Todos os loci analisados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, segundo os dados apresentados pelo valor da probabilidade P, utilizando o teste exato de Fischer ($P > 0,5$), após a correção de Bonferroni.

A possibilidade de ocorrência de sub-estruturação genética na população do Estado do Paraná foi testada comparando os valores estimados de F_{st} entre as frequências alélicas da População do Paraná com uma população Africana, duas populações Européias, uma população da América do Sul e duas populações Brasileiras. Os dados apresentados pelos valores de F_{st} apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) apenas comparado com a população Africana da Guiné Bissau. Para o resto das populações nenhuma diferença significativa foi encontrada, caracterizando assim uma ausência de sub-estruturação genética na população do Estado do Paraná, se comparado com as demais populações.

Finalmente os parâmetros forenses calculados mostraram que o banco de dados de frequência alélica dos STRs autossômicos do Paraná, é uma ferramenta útil para identificação pessoal, justificando o seu uso no Estado.

BANCO DE DADOS DOS STRS DO CROMOSSOMO Y

A análise dos 263 perfis genéticos de marcadores STRs do cromossomo Y, demonstraram um total de 247 haplótipos diferentes, sendo 234 únicos, 11 deles com duas ocorrências, 1 haplótipo com três ocorrências e 1 deles com quatro ocorrências. Quando analisado em composição de quatro sistemas genéticos comumente utilizados pela comunidade forense, observou-se como esperado um aumento no número de diferentes haplótipos, com um aumento do número de STRs analisados: 196 haplótipos diferentes utilizando 9 *loci* gênicos **Haplótipo Mínimo– minHT (DYS19, DYS385, DYS389I e II, DYS390, DYS391, DYS392 E DYS393)**; 214 haplótipos únicos com 11 *loci* gênicos **Painel SWGDAM (minHT mais DYS438 e DYS439)**; 218 haplótipos únicos com 12 *loci* gênicos – **Kit Power Plex Y® System (SWGDAM mais DYS437)** e por último, 247 haplótipos diferentes com 17 *loci* gênicos – **Kit Yfiler®** (Butler et al., 2003; Schoske et al., 2003; Rower et al., 2001). Os 17 loci combinados mostraram uma capacidade de discriminação superior aos sistemas genéticos utilizados: minHT, SWGDAM, Power Plex Y System e o Identifiler, devido a um número maior de haplótipos únicos gerados.

A Tabela 1, referente ao artigo 2, encontrada nos anexos permitiu calcular a frequência dos haplótipos únicos (0,004), a frequência dos haplótipos com 2 ocorrências (0,008), a frequência dos haplótipos com 3 ocorrências (0,011) e a frequência dos haplótipos com 4 ocorrências (0,015) necessárias para calcular a diversidade haplotípica que apresentou um valor de 99,94%. Este valor indica a probabilidade de dois indivíduos, não aparentados, escolhidos ao acaso da amostra, apresentar haplótipos diferentes.

As baixas frequências haplotípicas encontradas aumentaram a probabilidade de dois haplótipos tomados ao acaso serem diferentes, o que tornou a diversidade haplotípica elevada. Isso demonstra que os 17 marcadores STRs do cromossomo Y, testados para população do Estado do Paraná, se prestam como uma excelente ferramenta molecular em identificação humana, mostrando-se bastante informativo.

A Tabela 1 do artigo 2, que se encontra no corpo desta tese mostra que as frequências dos alelos em cada um dos 17 loci Y-STRs refletem diferentes diversidades gênicas entre os marcadores. A diversidade gênica de um determinado locus informa o potencial deste marcador em discriminar indivíduos de uma população. O Locus DYS385 a/b, foi o marcador mais informativo, apresentou a maior Diversidade Gênica (0,881). Este era um resultado esperado, pois o locus duplicado DYS385 é um dos marcadores mais informativos do cromossomo Y (Niederstätter et al., 2004). Este marcador consiste de dois loci de microssatélite separados por aproximadamente 40 Kb. Tais loci são tipicamente amplificados em conjunto, incluindo a região flanqueadora, isto ocorre, devido a presença de sequências idênticas, imediatamente circundantes às duas cópias do locus, o que permite o anelamento dos *primers* simultaneamente em ambas as regiões (Gusmão, et al., 2005; Gill et al., 2001; Schneider et al., 1998). As frequências foram estimadas para os haplótipos observados nesse locus conforme descrito na tabela retromencionada. A maior Diversidade Gênica entre os outros marcadores, que não são duplicados, foi a do locus DYS458 (0,795). As duas menores Diversidades Gênicas foram registradas para os loci DYS393 (0,492) e DYS3891 (0,519).

Quanto maior for o número de marcadores utilizados e quanto menor for a frequência alélica, mais raro será o haplótipo encontrado. Se os haplótipos forem constituídos com marcadores com maior Diversidade Gênica, possuirão maior Diversidade Haplotípica e conseqüentemente uma maior chance de excluir ou incluir indivíduos relacionados em casos forenses ou de vínculo genético de parentesco (Azevedo, 2006).

A possibilidade de ocorrência de sub-estruturação genética na população do Estado do Paraná foi testada comparando os valores estimados de R_{st} entre as frequências haplotípicas da População do Paraná com algumas populações de interesse. A análise pareada dos valores de R_{st} mostraram que os dados da população do PR não são significativamente diferentes dos dados referentes à todas as populações brasileiras publicadas que utilizaram 17 marcadores STRs do cromossomo Y ($R_{st} = 0,00211$ e $P = 0,06256$) (Pereira et al., 2007; Schwengber et al., 2009).

No entanto, não existe um grande número de publicações de bancos de dados utilizando os 17 marcadores, sendo que a maioria dos dados populacionais podem ser analisados com o Haplótimo mínimo minHT.

A população do PR foi comparada utilizando o minHT, com os dados previamente publicados para duas populações brasileiras (Pereira et al., 2007; Gratapaglia et al., 2005); duas populações do Estado do RJ (Góes et al., 2005; Domingues et al., 2007); uma população do Estado de Santa Catarina (Cainé et al., 2005); uma população de miscigenados do Estado do Pará (Palha et al., 2006); uma população do Estado de São Paulo (Gois et al., 2008); uma população do Estado Rio grande do Sul (Schwengber et al., 2009); uma população de Moçambique na África (Sanches-Diz et al., 2003); e Cabinda também na África (Alves et al., 2002); duas populações da Colômbia, Caucasianos e Afrodescendentes (Yunis et al., 2005); duas populações de Portugal (Carvalho et al., 2003); uma população da Espanha (Martin et al., 2004) e uma população da Argentina (Fondevila et al., 2003). A análise pareada com o valor de R_{st} (em parênteses), mostrou que as frequências haplotípicas da população do PR, após a correção de Bonferroni ($P < 0,003$) não são diferentes das frequências haplotípicas das populações brasileiras - Gratapaglia et al., 2005 (-0,00049) e Pereira et al., 2007 (0,00245); da população do Rio de Janeiro Miscigenados - Goes et al., 2005 (-0,00166); de Santa Catarina - Cainé et al., 2005 (0,00313); da população de São Paulo - Góis et al., 2008 (0,00760); do Estado do Rio Grande do Sul - Schwengber et al., 2009 (0,00134); das duas populações de Portugal Carvalho et al., 2003 (0,00207 e 0,01142); da população da Argentina - Fondevila et al., 2003 (0,00569) e da população da Espanha - Martin et al., 2004 (0,00998). Constatou-se ainda que

há uma diferença marginal entre as frequências haplotípicas do PR se comparada com as populações dos negros africanos do Rio de Janeiro - Domingues et al., 2007 (0,04736); da população de miscigenados do Pará - Palha et al., 2006 (0,03275) e dos indivíduos Caucasianos da Colômbia - Yunis et al., 2005 (0,01884). Ainda em relação as comparações das frequências haplotípicas, observou-se uma grande divergência entre a população do PR com as populações de Moçambique - Sanchez-Diz et al., 2003 (0,38078); Cabinda - Alves et al., 2002 (0,37513) e a população dos Negros da Colômbia - Yunis et al., 2005 (0,19968).

Além das análises mencionadas anteriormente, foram comparadas, por meio dos valores de R_{st} , populações das regiões brasileiras, registradas no sistema YHRD (<http://www.yhrd.org>). Os 247 haplótipos da população paranaense foram comparados com 10 populações de regiões diferentes do Brasil, somando um total de 1499 haplótipos, das seguintes regiões: 205 haplótipos de indivíduos miscigenados da população do Estado da Bahia; 400 haplótipos da população de indivíduos miscigenados da população de Belém no Estado do Pará; 49 haplótipos de indivíduos miscigenados da população de Boa Vista no Estado de Roraima; 51 haplótipos de indivíduos miscigenados da população de Macapá no Estado do Amapá; 77 haplótipos de indivíduos miscigenados da população de Manaus no Estado do Amazonas; 30 haplótipos de indivíduos miscigenados da população de Palmas no Estado de Tocantins; 46 haplótipos de indivíduos europeus da população de Porto Alegre no Estado do Rio Grande do Sul; 255 haplótipos de indivíduos eurodescendentes da população do Estado do Rio Grande do Sul e 139 haplótipos de indivíduos miscigenados da população de Porto Velho no Estado de Rondônia. A análise pareada com os valores de R_{st} , mostraram que as frequências haplotípicas, geradas pelos STRs do cromossomo Y da população do PR, após a correção de Bonferroni ($P < 0,005$), não são diferentes das frequências haplotípicas observadas para as populações dos Estados da Bahia, Manaus, no Amazonas, em Palmas, no Tocantins, em Porto Alegre no Rio Grande do Sul, em Porto Velho, em Rondônia e no Estado do Rio Grande do Sul. Na mesma análise de sub-estruturação, constatou-se que os dados de frequência haplotípica para população deste estudo são marginalmente diferentes para população de Boa Vista no Estado

de Roraima e Amapá, bem como, muito divergente para população de Belém no Estado do Pará.

Estes resultados de Rst obtidos para os 17 loci STRs do cromossomo Y, assim como os loci analisados no haplótipo mínimo minHT e das populações registradas no YHRD, indicam que existe a possibilidade de se juntar os haplótipos de cada população referente a cada Estado, tornando-se um banco de dados de frequência haplotípica grande e de significativa representatividade para população brasileira.

Uma vez estabelecido este banco de dados de frequência haplotípica para os STRs do cromossomo Y e que represente a população brasileira, ou até mesmo a população estadual, os Laboratórios forenses do Brasil passariam a ter mais uma ferramenta estatística para estabelecer um vínculo genético de verossimilhança em casos criminais de violência sexual ou locais de crime diversos. Atualmente, quando utilizados estes marcadores uniparentais para o cromossomo Y em casos de violência sexual ou em locais de crime diversos e observa-se total correspondência haplotípica entre a amostra questionada e a amostra referência, as análises estatísticas ficam comprometidas, devido a inexistência deste banco de dados. Nestes casos, estabelece-se apenas que a amostra questionada e a amostra referência possuem o mesmo perfil genético e que compartilham a mesma linhagem paterna uniparental. Além disso não podemos excluir um número desconhecido de homens não relacionados biologicamente, como sendo doadores da amostra questionada.

Buckleton e cols. (2005) e o NRC II (*National Research Concil II*) (1996) desenvolveram um tratamento estatístico que visa mensurar o coeficiente de verossimilhança entre dois haplótipos homólogos em casos criminais forenses e de paternidade, para isto deve-se ter uma população referência analisada com a frequência haplotípica determinada. O coeficiente de verossimilhança representa o número de indivíduos que devem ser examinados antes de se encontrar o mesmo perfil de DNA em um indivíduo selecionado aleatoriamente na mesma população.

Exemplo Teórico 1, quando temos a ocorrência do perfil genético na população:

Em uma população referência que contenha 27773 indivíduos estudados, ocorreu homologia entre os perfis genéticos da amostra questionada e referência. Este perfil homólogo foi observado em uma frequência de 7 ocorrências. Então 7 ocorrências em 27.773 haplótipos, nós temos $p = 0,000252$ indivíduos. Aplicando a fórmula (Buckleton et al., 2005; NRC II, 1996) temos:

$$p + 1.96 \sqrt{\frac{(p)(1-p)}{N}}$$

$0,000252 + 1.96 \sqrt{\frac{(0,000252)(1 - 0,000252)}{27,773}}$
$= 0,000252 + 0,000187 = 0,000439$
$= 0.044\% (\sim 1 \text{ in } 2270)$

Este coeficiente de verossimilhança demonstra que o perfil genético contendo os STRs do cromossomo Y começa a se repetir aleatoriamente na população em aproximadamente 1 a cada 2270 indivíduos. Uma outra forma de interpretar este resultado seria: “ Segundo os dados genéticos, é 2.270 vezes mais provável que o indivíduo referência seja o doador do material genético encontrado na cena do crime do que qualquer outro indivíduo do gênero masculino, escolhido aleatoriamente na população.

Certamente este resultado do Coeficiente de verossimilhança, para STRs do cromossomo Y, se comparado com os coeficientes de verossimilhança gerados por STRs autossômicos, é muito baixo, porém, quando temos perfis genéticos gerados em ambos os sistemas genéticos e consequentemente produzidos dois coeficientes de verossimilhança, um para o sistema autossômico e outro para o sistema uniparental do Y, podemos juntar estes coeficientes pela multiplicação simples dos mesmos tornando-se o número final maior, o que ajuda estatisticamente a compor o conjunto de provas mais robusto (Walsh et al., 2008).

Exemplo Teórico 2, quando não temos a ocorrência do perfil genético na população referência:

Em uma população referência que contenha 4.004 haplótipos estudados, ocorreu homologia entre os perfis genéticos da amostra questionada e referência. Este perfil homólogo não foi observado na base de dados haplótipos STRs do cromossomo Y, ou seja 0 ocorrências em 4.004 indivíduos. Aplicando o tratamento estatístico de Buckleton e cols. (2005) e NRC II (1996) temos:

$$1-\alpha^{1/N},$$

Onde $\alpha=0,05$ (nível de confiança com 95% de certeza)

N (nº indivíduos na base de dados)

$$1-\alpha^{1/N} = 1-(0.05)^{[1/4,004]} = 0.000748$$

$$= 0.075\% (\sim 1 \text{ in } 1340)$$

Este coeficiente de verossimilhança demonstra que o perfil genético contendo os STRs do cromossomo Y começa a se repetir aleatoriamente na população em aproximadamente 1 a cada 1340 indivíduos.

Exemplo Prático 1:

Caso registrado no protocolo do Instituto de Criminalística Laudo nº 329.141, datado do ano 2009, o qual configura um crime de violência sexual, sendo confrontadas as amostras questionada e referência, apresentando total homologia nos 17 loci STRs do cromossomo Y. Conclusão extraída do Laudo:

“Devido às correspondências alélicas em homologia, observadas entre a amostra Questionada e o Suspeito, nas regiões STRs do cromossomo Y analisadas, conclui-se pela condição de Inclusão de Verossimilhança entre o Suspeito e a Amostra Questionada, constituída pela fração masculina do conteúdo vaginal retirado da vítima. Em observância ao critério conclusivo acima, temos a informar que devido a inexistência de um banco de dados de frequência haplotípica da população brasileira, para o sistema genético utilizado, impossibilita calcular o coeficiente de verossimilhança entre a amostra evidência e o suspeito.”

Sendo assim, diante da conclusão acima, aplicando população referência deste estudo, que contém 263 indivíduos estudados, ocorreu homologia entre os

perfis genéticos da amostra questionada e referência. Este perfil homólogo foi observado em uma frequência de 01 ocorrência . Então 01 ocorrência em 263 haplótipos, nós temos **P = 0,0038** indivíduos. Aplicando a fórmula de Buckleton e colaboradores em 2005 temos um valor final para o **coeficiente de verossimilhança de 1 em 89**.

Isto significa dizer que os perfis genéticos obtidos na análise do caso, permitem dizer ser 89 vezes mais provável que o Suspeito seja o doador dos resíduos espermáticos encontrados na vítima, do que qualquer outro indivíduo do gênero masculino, escolhido aleatoriamente na população.

Finalmente, de acordo com parâmetros forenses calculados, as inferências estatísticas que apontam as distâncias populacionais e a clara aplicação prática gerada, este banco de dados de frequência haplotípica dos STRs do cromossomo Y, representativo da população do Estado do Paraná, é uma ferramenta útil para identificação humana, justificando sua utilização local no Estado do Paraná e num futuro representar uma parte da população brasileira no conjunto formativo de um banco de dados genético Nacional.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✦ A eficiência dos parâmetros estatísticos, gerados pelo banco de dados das frequência alélicas dos cromossomos autossômicos, justifica sua utilização como população referência no Estado do Paraná.
- ✦ Nenhuma diferença significativa foi encontrada, utilizando os valores de F_{st} , caracterizando assim uma ausência de sub-estruturação genética na população do Estado do Paraná, se comparado com as demais populações.
- ✦ Observou-se eficiência do conjunto dos 17 Y STRs em identificar e diferenciar indivíduos a partir dos parâmetros calculados como Diversidade Haplotípica (99,94%) e a Diversidade Gênica.
- ✦ A eficiência dos parâmetros estatísticos, gerados pelo banco de dados das frequência haplotípicas dos Y-STR, justifica sua utilização como população referência no Estado do Paraná.
- ✦ Nenhuma diferença significativa foi encontrada, utilizando os valores de R_{st} , caracterizando assim uma ausência de sub-estruturação genética na população do Estado do Paraná, se comparado com as demais populações brasileiras e estrangeiras.
- ✦ Contribuirá para um futuro banco de dados populacional brasileiro com Y-STRs, com a contribuição de todos os Estados, organizado pela SENASP.
- ✦ A possibilidade de inserção, a partir deste banco de dados da nova modalidade de se obter o Coeficiente de Verossimilhança quando temos apenas os marcadores Y-STR.
- ✦ A possibilidade de junção de dois Coeficientes de Verossimilhança, autossômico e Cromossomo Y, ajudando a compor um conjunto de provas mais robusto

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.; GUSMÃO, L. BARBOSA, J. AMORIM, A. Evaluating the informative Power of YSTRs: a comparative study using European and new African haplotype data. *Forensic Sci. International* (a34) 126-133, 2003.
- ALVES, L. GUSMÃO, A. DAMASCENO, B. SOARES, A. AMORIM. Contribution for an African STR database (AmpFISTRIdentifiler and Powerplex 16 System) and a report on genotypic variations, *Forensic Sci Int.* (139) 201–205, 2004.
- Alves-Silva, J., Santos, M.S., Guimarães, P.E.M., Ferreira, A.C.S., Bandelt, H.J., Pena, D.J., Prado, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *American Journal of Human Genetics*, (67) 444-461, 2000.
- AMPLSTR IDENTIFILER PCR Amplification Kit, user manual, 2001.
- AMPLSTR YFILER PCR Amplification Kit, user manual, 2006.
- AZEVEDO, A.D. Determinação do Polimorfismo de 15 microssatélites do Cromossomo Y na População do Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
- BAIRD, M. Allele Frequency Distribution of two Highly Polimorphic DNA sequences in three Ethnic Groups and Its Application to determination of paternity. *American Journal Human Genetics*.. (39), 489-501, 1996.
- BALLOUX, F., MOULIN, N.L. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular. Ecology*. (11) 155-65, 2002.
- BARROS, J. E. X. S. Diversidade Haplotípica de Microssatélites do Cromossomo Y humano na População de Pernambuco. Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
- BRENNER, C., MORRIS, J. Proceedings of International Symposium on Human Identification. Promega Corporation, 1990.
- BUCKLETON, J., TRIGGS, C.M., WALSH S.J., **Forensic DNA Evidence Interpretation**. CRC press, Washington, 364p, 2005.
- BUTLER, J.M. **Forensic DNA Typing** Academic Press, San Diego. 321p, 2001.
- BUTLER, J.M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing** Academic Press, San Diego. 341p, 2010
- BUTLER, J.M. NEAFS Y-mtDNA Workshop: Populations, Statistics and Mutations. Available on line in <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training.htm>. (2006)
- BUTLER, J.M. State of the Y chromosome. Canadian Forensic DNA Technology Workshop, Available on line in <http://www.cstl.nist.gov>. (2005)
- BUTLER, J.M.; DECKER, A.E.; VALLONE, P.M.; KLINE, M.C. Allele frequencies for 27Y-STR loci with U.S. Caucasian African American, and Hispanic samples. *Forensic Science International* (22) 135-141, 2005.
- BUTLER, J.M.; SCHOSKE, R.; VALLONE, P.M.; KLINE, M.C.; REDD, A.J.; HAMMER, M.F. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Science International* (129) 10-24, 2002.

- BUTLER, J.M.; SCHOSKE, R.; VALLONE, P.M. Highly multiplexed assays for measuring polymorphisms on the Y-chromosome. *Int. Congress Series*, 2003 1239; 301-305.
- BYDLOWSKI, R.S. M. NETO, R. P.S. SOARES, R. SILVA, A.A. DEBES-BRAVO, L. MORGANTI. *Genetic data on 12 STRs (F13A01, F13B, FESFPS, LPL, CSF1PO, TPOX, TH01, vWA, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 from four ethnic groups of São Paulo, Brazil. Forensic Science International* (135) 67-71, 2003.
- CAINÉ, L. CORTE-REAL, F., VIEIRA, D.N. CARVALHO, M.; SERRA, A.; LOPES, V. VIDE. M.C. Allele frequencies and haplotypes of 8 y-chromosomal STRs in Santa Catarina population of southern Brazil. *Forensic Science International* (148) 75-79, 2005.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M., GRATAPAGLIA, D., SALZANO, F.M., SALAMONI, S.P., S.G. CROSSETI, M.E. FERREIRA, M.H. HUTZ. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *American Journal of Human Biology* (15) 824-834 (2003).
- CARVALHO-SILVA, D. R. E. TARAZONA-SANTOS, J. ROCHA, S.D.J. PENA, F.R. Santos, Y-chromosome diversity in Brazilians: switching perspectives from slow to fast evolving markers, *Genética Forensic Science International* (126) 251-260, 2006.
- CASTILLO, D.M. PERONE, C.; MOURÃO, P.H.; JANUÁRIO, J.N. Populational Genetic data for 15 STR markers in the Brazilian population of Minas Gerais. *Legal Medicine* (Tokio), (3) 211-223, 2008.
- CAVALLI-SFORZA, L.L., MENOZZI, P., PIAZZA, A. The history and Geography of human genes. Princeton University Press, USA, 1996.
- CORACH, D. **Additional approaches to DNA typing of Skeletal Remains: The search for missing persons killed during the last dictatorship.** *Electrophoresis*. (18) 1608-1612, 1997.
- CORACH, D.; RISSO, L.F. MARINO, M. **Routine Y-STR typing in forensic Case Work.** *Forensic Science International*, *Forensic Science International* (118) 131-135, 2001.
- CARVALHO, M., ANJOS, M.J., ANDRADE, L., LOPES, V., SANTOS, M.V. GAMERO, J.J. CORTE REAL, F. Y-Chromosome STR haplotypes in two population Samples: Azores Islands and Central Portugal, *Forensic Science. International*. (134) 29-35, 2003.
- DOMINGUES, P.M., L.GUSMÃO, D.A. DA SILVA, A. AMORIM, R.W. PEREIRA, E.F. DE CARVALHO, Sub Saharan Africa Descendants in Rio de Janeiro (Brazil): population and mutational data for 12 Y-STR loci, *International. Journal of Legal Medicine*. 121-(3) 238-241, 2007.
- DONIS-KELLER, H., **A genetic linkage map of the human genome.** *Cell*, (51), 319-337, 1987..
- EDWARDS, A. CHAKRABORTY, R. **Genetic variation of five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups.** *Genomics* (12) 241-253, 1992.
- EVETT, I.W., WEIR, B.S. **Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Science.** Sunderland, MA: Sinauer, 1998.
- FAUCZ, F.R., SOUZA, D.A.S., OLANDOSKI, M., RASKIN, S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *Journal of Human Genetics* (55) 71-76, 2010.
- FONDEVILA, M., J.C. JAIME, A. SALAS, M.V. LAREU, A. CARRACEDO, Y-chromosome STR haplotypes in Córdoba (Argentina). *Forensic Science. International*. (137) 217-220, 2003.

- GILL, P., BRENNER, C., BRINKMANN, B., BUDOWLE, B., CARRACEDO, A., JOBLING, M.A., KAYSER, M., PASCALI, V., ROEWER, L., SCHNEIDER, P.M., SAJANTILA, A. and TYLER-SMITH, C. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations of forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Science International*. (124): 5-10, 2001.
- GÓES, A.C.S.; CARVALHO, E.F.; GOMES, I.; SILVA, D.A.S.; GIL, E.H.F.; AMORIM, A.; GUSMÃO, L. Population and mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). *International Journal of Legal Medicine*. (119) 70-76, 2005.
- GOIS, C.C.; MARTINS, J.A.; HIRATA, M.H., OLIVEIRA, R.N. Genetic Population data of 12 STR loci of the Power Plex® Y system in the state of São Paulo population (Southeast of Brazil). *Forensic Science International* (33) 46-52, 2007.
- GRATAPAGLIA, A.B., FERREIRA, M.E. Brazilian Population data base for the 13 STR loci of AmpliSTR Profiler Plus multiplex kits, *Forensic Science International*. (118), 91-94 (2001).
- GRATAPAGLIA, D.; KALUPNIEK; GUIMARÃES, C.S.; SOARES, C.N. Y-Chromosome STR haplotype diversity in Brazilian Populations. *Forensic Science International* (2005), 149 99-107.
- GUSMÃO, L.; BUTLER, J.M. CARRACEDO, A.; GILL, P.; KAYSER, M.; ROEWER, L.; SCHNEIDER, P.M. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): Na update of the recommendations of the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Science International*. (157) 187-197, 2006.
- GUSMÃO, L.; BUTLER, J.M. CARRACEDO, A.; GILL, P.; KAYSER, M.; ROEWER, L.; SCHNEIDER, P.M. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): Na update of the recommendations of the use of Y-STRs in forensic analysis. *International Journal of Legal Medicine*. Review Article (2005).
- HAMMER, M.F., ZEGURA, S. The role of Chromosome in Human Evolutionary Studies. *Evolutionary Anthropology* 5: 116-134, 2001.
- HIRATA, M.H.; HIRATA R.D.C. **Aplicações da Biologia Molecular em Análises Clínicas**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. p50, 1998.
- HOCHMEISTER, M.N.; BUDOWLE, B. Using multiplex PCR amplification and typing kits for the analysis of DNA evidence in a serial killer case. *Journal of Forensic Science*, (41) 155-162, 1996.
- HOURN, G.T Amplification of the highly polymorphic VNTR segment by the Polymerase Chain Reaction. *Nucleic Acid Research*, (17) 2140, 1989.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTION. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* (409):860-921, 2001.
- JEFFERYS, A. J. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* (214) 67-73, 1985.
- JUNIOR, C.T.; FERREIRA, L.B.; SIMÕES, A.L. Y-Chromosome STR haplotypes in a sample from São Paulo, Southeastern Brazil. *Journal of Forensic Science*, (52)- 2 236-242, 2007.
- KASAI, K.; NAKAMURA, Y. WHITE, R. Amplification of Variable Tandem Repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the Polymerase Chain Reaction and its application to forensic Science. *Journal of Forensic Science* (35)-5 1196-1200, 1990.
- KAYSER, M. CAGLIA, A.; CORACH, D.; ROEWER, L. Evaluation of Y chromosomal STRs: a multicenter Study. *International Journal of Legal Medicine*. (110) 125-131, 1997.

- KENDREW, J. **The encyclopedia of Molecular Biology**. Blackwell Science LTD. Oxford, 1994.
- LEE, H.C., PAGLIARO, E. Genetic Markers in human bone DNA analysis. *Journal of Forensic Sciences*, (36)-02 188-197, 1991.
- LEITE, F.P.N., F.J. MENEGASSI, S.P.SCHWENGBER, P.E. RAIMANN, T.K. ALBUQUERQUE, STR data for 09 Autosomal STR markers from Rio Grande do Sul (southern Brazil) *Forensic Science International*. (132) 223-224, 2003.
- LINCOLN, P., CARRACEDO, A., Publication of population data of human polymorphisms, *Forensic Science. International*. (110) 3-5, 2000.
- MARTIN, P.D. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science in Europe. *Forensic Science International*, (119), 2001.
- MARTÍN, P., GARCIA-HIRSCHFELD, J. O, GARCIA, L. GUSMÃO, P. GARCÍA, C. ALBARRÁN, M. SANCHO, A. ALONSO. A Spanish population study of 17 Y-Chromosome STR loci. *Forensic Science. International*. (139) 231-235, 2004.
- MELSON, K. E. **Determining Individuality by DNA**. Chapter 15, 871-923, 1994.
- MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A Generic Estimation of population subdivision using distances between alleles, with special reference for Microsatellite loci. *Genetics* (142) 1061-1064, 1996.
- MULERO, J. J.; CHANG, C.W.; CALANDRO, L.M.; GREEN, R.L.; HENNESSY, L.K. Development and validation on the AmpFISTR® Y-filer® PCR amplification 17 Y-STR Multiplex System. *Journal. of Forensic Science*,. (51)-1, 112-123, 2006.
- MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A. **The Polymerase Chain Reaction**, Birkhauser-Boston, 1994.
- NRC – National Research Council: **The evaluation of Forensic DNA Evidence**. National Academy of Sciences, 1996.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, 1987. 512pp.
- NIEDERSTÄTTER, H., BERGER, B., OBERACHER, H., BRANDSTÄTTER, A., HUBER, C. and PARSON, W. Evaluation of the forensic usefulness of the separate analysis of DYS385a and DYS385b in an Austrian population sample. *International Congress Series*, (1261) 360-362, 2004.
- PALHA, T.J.B.F.; RODRIGUES, E. M. R.; SANTOS, S.E.B. Y-chromosomal STR haplotypes in a population from the Amazon region, Brazil. *Forensic Science International* (67) 59-64, (2006).
- PENA, S.D.J. Homo Brasilis: Aspectos Genéticos, Linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro. FUNPEC, Ribeirão Preto, 2002.
- PAREDES, M., M. CRESPILO, J.A. LUQUE, J.L. VALVERDE. STR frequencies for the PowerPlex16 System kit in a population from Northeast Spain, *Forensic Science. International* (135) 75–78, 2003.
- PEREIRA, R.W.; MONTEIRO, E.H.G.; HIRSCHFELD, G.C.R.; WANG, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. Haplotype diversity of 17 y-chromosome STRs in Brazilians. *Forensic Science. International*. (171) 226-236, 2007.
- PHILIPS, C.P. UK caucasian databases for six y chromosome STRs. *Progress in forensic Genetics*. Elsevier Amsterdam. (8), 290-293, 2000.

PINHEIRO, M.F., L. CAINE', L. PONTES, D.ABRANTES, G. LIMA, M.J.PEREIRA, P.REZENDE. Allele frequencies of sixteen STRs in the population of Northern Portugal *Forensic Science International* (148) 221-223, 2005.

POIARES, L. A., OSORIO, P.S., SPANHOL, F. A., COLTRE, S.C., RODENBUSH, R., GUSMÃO, L. LARGURA, A., SANDRINI, F., SILVA, C.M.D. Allele frequencies of 15 STRs in a representative sample of the Brazilian population. *Forensic Science international Genetics* (2) e61 – e63, 2010.

POWERSTATS V1.2, Microsoft® Excel work-book Template. Available on line in www.promega.com/geneticitools/ ., 1999.

PREVIDRE, L.J.; PELOSO, G. Y-Chromosomal haplotypes and haplogroups in male identification. *Progress in forensic Genetics*. Vol 8. Elsevier Amsterdam. 2000, 257-260.

PROMEGA CORPORATION Matrix FL-JOE-TMR-CXR – Technical Bulletin, 2004.

PROMEGA CORPORATION. PowerPlex Y System – Technical Manual, 2004.

RAYMOND, M., F. ROUSSET, GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism, *Journal of Heredity* (86) 248-249, 1995.

REEDERS, S. T. A highly DNA marker linked to adult polycystic Kidney disease on chromosome 16. *Nature*, (317) 542-544, 1995.

RELIAGENE Technical Information for Y-plex 5 and Y-plex 6, 2003.

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil**. Companhia das Letras, São Paulo., 1995.

ROEWER, L. J.; ARNEMANN, N.K. Simple repeat sequences of the human y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Human. Genetics*, (89) 389-394, 1992.

ROEWER, L.J.; KAYSER, M.K.; CORACH, D.; KNIFF, P.R. Caucasian Y-STR haplotype reference database for forensic Application. *Progress in forensic Genetics*, Elsevier, Amsterdam (8), 389-394, 2000.

ROEWER, L.J.; KAYSER, M.K.; CORACH, D.; KNIFF, P.R.; CARRACEDO, A.; HENKE, J.L. On line <http://ystr.charite.de> Reference database of European Y-Chromosomal Short Tandem Repeats (STR) Haplotypes. *Forensic Science International* (118) 106-113, 2001

SANCHEZ-DIZ, P., T. DE LA FÉ, B. QUINTÁNS, A. SALAS, Y-chromosome STRs in populations of Bantu, origin from Mozambique: Male Contribution to the Africa genetic pool and forensic implications, *International. Congress. Series*. (1239) 419-424, 2003.

SALZANO, FR, BORTOLINI, M.C. The Evolution and Genetics of Latin American Population, Cambridge University Press, Cambridge, 2002.

SCHNEIDER, S D. ROESSLI, L. EXCOFFIER, Arlequin v2000, A software for population genetic data analysis, University of Geneva, 2000.

SCHNEIDER, P.M, MEUSER, S., RITTNER, C. Tandem Repeat structure of the duplicated Y-chromosome STR locus DYS385 and frequency studies in the German and three Asian population. *Forensic Science International*, (97) 61-70, 1998.

SCHOSKE R, VALLONE PM, KLINE MC, REDMAN JW AND BUTLER JM Highthroughput Y-STR typing of U.S. populations with 27 regions of the Y chromosome using two multiplex PCR assays. *Forensic Science International* (139) 107-121, 2004.

SCHOSKE R. The design, optimization and testing of Y Chromosome STR megaplexes. *PhD Thesis, American University, Washington D.C.*, 2004.

- SCHWENGBER, S.P., T.KOMMERS, C.H.F. MATTE, P.E.RAIMANN,B.A.CARVALHO, F.P.N.LEITE, M.A.MEDEIROS, L.F.SOUSA, C.S.CASTRO, F.G.C.CHASSOT, S.L.BONATTO, Population data of 17 Y-STR loci from Rio Grande do Sul state(South Brazil). *Forensic Science International Genetics* (4) e31-e33, 2009.
- SILVA, R., R.S. MOURA-NETO. Genetic Diversity and admixture data on STRs (F13B, TPOX, CSF1PO, F13A01, D7S820, LPL, TH01, vWA, D13S317, FESFPS, and D16S539 in a sample of Rio de Janeiro European-descendents population, Brazil, *Forensic Science International*. (142) 51-53, 2004.
- SLATKIN, M. A measure of Population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, (139) 457-462, 1995.
- THOMPSON, M.W.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **GenéticaMédica**, Elsevier, 7 ed. 2008.
- TOSCANINI, U., GUSMÃO, L., BERARDI, G., AMORIM, A., CARRACEDO, A. SALAS, A. RAIMONDI, E. Testing for genetic structure in different urban Argentinian populations. *Forensic Science International* (165) 35–40, 2007.
- WALSH, P.S., D.A. METZGER, R. HIGUCHI Chelex® 100 as a medium for simple extration of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. (10), .506-513, 1991.
- WALSH, B., REED, A.J., HAMMER, M.F. Joint match probabilities for Y chromosomal and autossomal markers. *Forensic Science International* (174) 234-238, 2008.
- WHITE, R. **Construction of linkage maps with DNA markers for human Chromossomes**. *Nature*, (313) 101-105, 1995.
- YANG, B., WANG G., LIU Y, YANG W. Population data for the AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit in China Han in Jilin Province China. *Forensic Science International*. (151) 293-297, 2005.
- YUNIS, J.J., ACEVEDO, L.E., CAMPO, D.S., YUNIS, E. J. Population data of Y-STR minimal haplotypes in a sample of Caucasian-Mestizo and African descent individuals of Colombia. *Forensic Science International* (151) 307–313, 2005.
- ZONDERMANN, J. **Beyond the Crime Lab: The New Science Of Investigation**. Copyright by Wiley & Sons Inc. EUA, 1990.

Anexos

Anexo 1

AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Nós, abaixo-assinados e identificados declaramos, para todos os fins de direito, que, nesta data de _____, por livre e espontânea vontade, comparecemos ao Instituto de Criminalística – sito na Avenida Visconde de Guarapuava, nº 2652, Centro, Curitiba/PR – para nos submetermos à coleta de material biológico visando à realização de Laudo de Investigação de Vínculo Genético. Declaramos ainda que estamos cientes da realização de pesquisas envolvendo nossas amostras, como na elaboração de um Banco de Dados Populacional para o Cromossomo Y e DNA mitocondrial, além de não nos submetemos à transfusão sanguínea nos últimos 120 dias, ou a transplante de células tronco-hematopoéticas.

Mãe

Documento Apresentado:

Grau de Parentesco com o suposto pai: Sim () Não (X) Grau _____

Data de nascimento:

Local de nascimento:

Local de residência:

Classificação Étnica: não negra

Assinatura:

Requerente:

Documento apresentado: Certidão de Nascimento

Termo: Livro: Folha:

Data de nascimento:

Local de nascimento:

Local de Residência:

Classificação Étnica: não negro

Assinatura do Responsável:

Suposto Pai

Documento apresentado: Cédula de Identidade

Número:

Data de nascimento:

Local de nascimento:

Local de Residência:

Classificação Étnica:

Assinatura:

Para uso interno

Os materiais hematológicos – coletados com produtos descartáveis e identificados na presença dos solicitantes – foram enviados ao Laboratório de Genética Molecular Forense deste Instituto, onde foram vinculados ao código de identificação interna.

Responsável pela Coleta

Anexo 2:

Haplótipos do Cromossomo Y de 263 paranaenses com base nos 17 loci Y STRs do sistema AmpF ℓ STR® Yfiler®

HAPLÓTIPOS	OCORRÊNCIA	DYS19	DYS389I	DYS389II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	DYS385 a/b	DYS437	DYS438	DYS439	DYS448	DYS456	DYS458	DYS635	Y GATA H4
1	1	14	14	30	24	11	13	13	10 13	14	12	12	18	17	18	24	11
2	1	16	14	31	22	10	11	12	15 17	14	11	11	21	15	16	21	11
3	1	13	14	30	24	10	11	13	13 14	14	10	10	20	16	17	21	12
4	1	14	14	30	24	11	13	12	11 14	15	12	11	19	16	17	23	12
5	1	15	14	30	24	10	13	13	12 14	14	12	13	19	15	18	23	12
6	1	13	14	30	23	10	13	13	13 15	14	9	13	19	16	17	21	12
7	1	14	14	31	24	11	13	13	11 15	14	12	11	18	15	17	23	11
8	1	15	13	29	23	10	11	12	12 13	15	10	12	21	14	17	21	12
9	1	15	12	27	24	11	13	13	11 14	15	12	13	19	15	16	23	12
10	1	14	13	29	23	10	13	14	11 14	15	12	12	19	15	18	23	12
11	1	14	13	29	24	11	13	13	11 14	15	12	12	20	16	20	23	12
12	1	13	12	30	23	10	14	13	14 17	14	11	11	20	15	17	23	12
13	1	15	12	27	22	10	11	13	13 14	16	10	11	19	16	18	21	11
14	1	15	13	29	23	10	11	12	13 16	14	9	10	20	17	16	21	11
15	1	15	15	33	21	10	11	12	15 17	15	11	11	21	15	17	22	12
16	1	15	14	30	24	11	13	13	11 14	15	11	13	19	16	16	23	12
17	2	15	13	29	23	9	11	12	13 16	14	9	12	21	16	14	21	12
18	1	14	13	29	24	11	13	13	11 14	15	12	11	19	15	18	23	13
19	1	15	13	30	24	11	13	14	11 14	15	12	12	20	15	17	23	12
20	1	14	14	32	23	10	11	12	15 15	15	9	10	20	18	16	23	11
21	1	14	13	29	24	10	13	13	11 14	15	12	12	19	15	18	23	12
22	1	15	13	30	25	10	13	13	12 14	15	13	12	19	17	17	23	12
23	1	14	12	28	22	10	11	13	14 14	16	10	11	20	15	16	21	10
24	1	14	13	29	24	11	13	13	11 16	15	12	12	20	15	17	23	11
25	1	15	13	29	23	10	12	15	15 16	14	10	12	20	14	17	21	11
26	1	14	12	28	23	10	11	13	14 14	16	10	11	20	14	15	21	11
27	1	14	12	28	24	10	11	12	13 14	16	10	12	20	14	15	23	11
28	1	15	13	31	25	11	11	13	12 14	14	12	10	20	16	17	24	12
29	1	15	13	31	23	10	11	14	15 17	14	11	11	20	16	15	22	11
30	1	14	14	30	24	11	13	13	12 14	15	12	12	19	14	16	23	12
31	1	16	13	28	23	11	12	14	15 15	15	11	11	20	17	16	20	11
32	1	14	13	29	23	10	13	13	11 17	15	12	11	19	14	17	24	12
33	1	15	13	29	24	11	13	13	11 14	15	12	12	19	16	16	23	12
34	1	17	14	31	23	10	11	14	10 14	14	11	10	20	15	16	23	12
35	1	16	13	29	25	10	11	13	10 14	14	11	11	20	16	16	23	13
36	1	13	13	30	24	10	11	13	16 19	14	10	13	20	16	14	21	12
37	1	15	12	29	22	10	11	14	14 15	16	10	11	21	15	18	20	12
38	1	15	13	28	24	11	14	13	11 14	15	12	12	19	16	16	23	12

39	1	16	13	30	25	11	11	13	<u>11 14</u>	14	11	11	20	15	17	23	12
40	1	15	13	29	23	11	13	14	<u>11 14</u>	15	12	12	18	18	17	23	12
41	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	14	18	23	11
42	1	13	12	29	24	10	11	13	<u>17 17</u>	14	10	10	20	14	14	21	11
43	1	14	13	28	24	11	13	14	<u>11 15</u>	15	12	12	19	16	17	23	12
44	1	14	13	29	25	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	20	23	12
45	1	13	13	30	25	10	11	12	<u>15 16</u>	14	10	13	20	15	17	22	11
46	1	14	13	30	21	11	11	13	<u>16 17</u>	14	11	12	21	17	17	20	12
47	2	13	13	32	24	10	11	12	<u>16 16</u>	14	10	12	20	15	17	23	12
48	1	15	13	31	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	16	17	23	11
49	1	14	13	29	23	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	15	19	23	12
50	1	13	14	30	24	9	11	13	<u>13 14</u>	14	10	10	18	15	20	21	12
51	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 13</u>	15	12	12	19	15	17	23	12
52	1	14	12	29	23	10	11	13	<u>14 14</u>	16	10	12	20	14	15	21	11
53	1	13	14	31	24	11	14	11	<u>14 16</u>	15	11	12	19	14	15	22	11
54	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	14	12	11	18	15	17	23	11
55	1	15	12	29	22	10	11	14	<u>15 16</u>	16	10	13	21	17	16	21	12
56	1	15	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	14	12	11	17	16	17	23	11
57	1	14	13	29	23	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	18	15	18	24	11
58	1	13	14	31	22	10	13	13	<u>13 16</u>	15	9	12	20	15	17	21	12
59	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	16	18	24	12
60	1	15	13	31	24	11	13	14	<u>11 13</u>	14	12	13	18	17	18	23	12
61	1	14	14	30	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	17	23	11
62	1	14	13	30	23	11	13	13	<u>11 14</u>	16	13	13	19	16	17	24	13
63	2	13	13	30	24	11	11	13	<u>18 21</u>	14	10	12	20	15	16	23	12
64	1	14	12	28	22	10	11	13	<u>13 14</u>	16	10	11	20	15	15	23	10
65	1	13	13	29	24	9	11	13	<u>13 14</u>	14	10	10	19	16	18	21	12
66	1	14	13	29	23	10	11	12	<u>13 16</u>	14	9	12	20	15	19	23	11
67	1	17	12	29	26	10	11	13	<u>11 14</u>	14	11	10	20	16	16	23	13
68	1	16	13	31	25	11	11	13	<u>11 14</u>	14	11	10	20	16	15	23	12
69	1	15	13	29	23	10	14	14	<u>11 13</u>	14	10	10	19	14	17	22	12
70	1	17	14	31	25	10	11	13	<u>11 14</u>	14	11	11	20	16	16	24	13
71	1	14	13	29	25	12	14	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	15	17	24	12
72	1	15	14	30	24	9	11	12	<u>13 17</u>	14	10	12	21	16	14	22	12
73	1	15	13	30	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	18	17	23	11
74	1	15	13	29	25	11	13	13	<u>11 13</u>	14	12	11	18	16	15	24	12
75	1	15	13	32	21	10	10	13	<u>16 19</u>	14	11	12	22	15	17	21	12
76	1	16	14	32	24	10	11	12	<u>13 18</u>	14	10	11	20	15	16	22	10
77	1	16	13	31	25	10	11	14	<u>11 14</u>	14	11	11	20	17	16	23	12
78	1	14	12	28	23	10	11	13	<u>13 15</u>	16	10	11	20	15	16	22	11
79	1	16	13	31	25	11	11	13	<u>11 14</u>	14	11	10	20	15	16	23	13
80	1	15	12	26	24	11	13	13	<u>12 14</u>	15	11	10	19	15	16	24	12
81	1	15	13	31	21	10	11	13	<u>15 16</u>	14	11	14	21	15	16	22	12
82	1	14	13	28	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	16	17	23	12
83	1	14	13	29	23	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	20	16	16	23	12
84	1	14	13	31	24	10	11	13	<u>17 19</u>	14	10	12	20	15	16	21	12
85	1	15	13	31	21	10	11	15	<u>17 19</u>	14	11	12	20	16	16	21	11
86	1	15	13	29	23	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	16	17	25	12
87	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>12 15</u>	15	12	11	19	16	17	23	12
88	1	16	14	31	26	11	11	13	<u>11 14</u>	14	11	10	20	16	15	23	12
89	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	15	17	23	12

90	1	15	14	30	23	10	12	15	<u>15 15</u>	14	10	13	20	14	15	21	10
91	1	14	13	29	25	11	13	13	<u>10 14</u>	15	12	13	19	16	14	23	13
92	1	14	14	32	23	10	14	12	<u>16 17</u>	16	10	11	20	15	16	24	10
93	1	14	13	30	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	20	16	19	23	12
94	1	16	13	30	21	10	11	15	<u>17 18</u>	14	11	12	19	16	17	21	11
95	1	14	12	28	24	11	13	13	<u>12 14</u>	15	12	12	19	16	16	23	11
96	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	14	12	12	19	15	17	24	12
97	1	13	13	30	25	10	11	13	<u>14 19</u>	14	10	12	20	15	17	20	11
98	1	13	13	29	24	9	11	13	<u>13 14</u>	14	10	10	20	16	18	21	12
99	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>11 15</u>	15	12	11	19	15	16	23	11
100	1	14	13	29	25	10	13	13	<u>11 14</u>	15	13	14	19	15	16	23	13
101	1	13	14	32	23	9	11	13	<u>14 17</u>	15	9	12	21	16	16	21	12
102	1	14	12	27	24	10	12	14	<u>11 15</u>	15	12	12	19	17	18	23	12
103	1	15	12	26	24	11	13	13	<u>12 14</u>	15	12	10	19	16	16	24	12
104	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	17	23	12
105	1	16	13	28	22	11	11	13	<u>11 12</u>	15	10	14	21	13	17	22	13
106	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	20	15	18	25	11
107	1	15	13	29	24	11	13	12	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	19	23	12
108	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	15	17	24	11
109	1	16	13	30	25	10	11	13	<u>11 13</u>	14	11	11	20	16	15	23	13
110	1	14	13	28	23	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	11	19	16	16	23	11
111	2	14	14	30	24	11	13	13	11 14	15	12	13	19	15	17	23	12
112	1	14	13	30	22	10	11	13	<u>18 19</u>	14	10	12	21	15	18	20	12
113	1	17	13	30	21	10	11	15	<u>18 19</u>	14	11	11	21	15	17	21	10
114	1	14	12	28	23	10	11	13	<u>13 14</u>	16	10	11	20	14	14	21	11
115	1	13	12	29	24	10	15	12	<u>13 14</u>	14	11	12	20	16	19	23	12
116	1	14	13	29	23	11	14	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	18	23	12
117	1	14	13	30	24	11	13	13	<u>10 15</u>	15	13	11	19	15	17	23	12
118	1	15	14	31	21	10	11	14	<u>16 20</u>	14	11	13	21	15	16	21	11
119	1	13	12	30	25	10	11	13	<u>16 17</u>	14	10	11	19	15	18	23	11
120	1	14	12	29	24	11	13	13	<u>12 14</u>	15	10	14	19	15	16	23	12
121	1	14	14	31	23	9	11	12	<u>13 14</u>	14	10	10	20	17	19	21	12
122	1	14	14	33	24	10	11	12	<u>16 24</u>	14	10	11	20	15	18	23	12
123	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 15</u>	15	11	13	19	16	20	24	12
124	1	13	13	31	24	10	11	13	<u>16 18</u>	14	10	12	20	15	14	22	11
125	1	14	13	29	25	11	12	13	<u>11 14</u>	15	12	11	19	16	18	23	12
126	1	14	12	28	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	11	19	15	19	23	12
127	1	14	12	28	23	10	11	13	<u>14 15</u>	16	10	11	20	15	15	21	11
128	1	14	13	29	24	10	13	12	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	17	23	12
129	1	15	14	31	23	10	12	14	<u>16 16</u>	15	10	12	20	13	18	21	12
130	1	13	13	30	24	10	11	13	<u>16 18</u>	14	10	12	20	17	15	24	11
131	1	14	13	30	23	10	11	13	<u>14 14</u>	16	10	11	20	14	15	22	11
132	1	14	13	30	24	10	11	12	<u>16 16</u>	15	9	12	21	17	18	23	12
133	1	16	13	29	23	9	11	12	<u>13 13</u>	14	9	11	21	16	14	24	11
134	1	15	12	28	22	10	11	13	<u>14 15</u>	16	10	11	20	14	15	22	11
135	2	14	13	29	24	11	13	13	11 12	14	12	12	19	15	17	23	12
136	1	15	13	30	24	10	12	16	<u>15 15</u>	15	10	11	20	14	16	19	11
137	1	15	13	30	25	11	11	13	<u>11 14</u>	14	11	10	20	16	18	25	12
138	1	14	14	32	23	9	11	12	<u>13 14</u>	14	10	10	20	17	19	21	12
139	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	11	12	19	15	18	23	11
140	1	13	13	31	24	11	11	13	<u>15 15</u>	14	10	14	20	14	18	21	12

141	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>12 13</u>	16	12	12	19	18	18	23	12
142	3	14	13	31	22	10	11	12	<u>14 17</u>	14	10	12	20	15	19	20	11
143	1	14	13	29	24	11	13	14	<u>11 11</u>	15	12	12	19	15	17	23	11
144	1	15	13	30	23	10	11	14	<u>15 17</u>	14	11	11	20	16	15	22	11
145	1	15	12	29	22	10	12	13	<u>12 17</u>	16	10	11	21	16	15	21	12
146	1	14	13	29	24	11	13	12	<u>11 14</u>	15	13	12	19	15	17	23	12
147	1	15	13	30	25	11	13	13	<u>13 16</u>	14	12	12	19	15	20	25	12
148	1	15	13	29	24	10	13	12	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	17	25	12
149	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>12 14</u>	15	12	12	19	16	17	23	12
150	1	14	12	28	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	16	23	12
151	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	17	23	11
152	1	15	12	28	25	10	11	12	<u>13 16</u>	14	10	11	19	14	16	22	11
153	1	15	13	31	21	10	11	13	<u>16 17</u>	14	11	11	21	15	16	21	12
154	1	14	12	28	23	11	12	13	<u>14 14</u>	16	10	12	22	15	15	21	12
155	1	15	13	29	21	10	11	13	<u>16 17</u>	14	11	11	21	15	16	20	12
156	1	13	14	33	24	10	11	13	<u>17 17</u>	14	10	12	22	15	19	22	11
157	1	15	14	32	21	11	11	13	<u>16 17</u>	14	11	11	21	15	16	21	12
158	1	14	13	29	24	11	13	12	<u>10 11</u>	13	12	11	19	15	19	23	12
159	1	13	13	30	24	10	11	14	<u>16 18</u>	14	10	12	20	15	15	24	11
160	2	14	14	30	23	10	11	12	<u>13 18</u>	15	9	11	19	15	16	22	13
161	1	14	13	29	25	11	13	13	<u>11 12</u>	15	12	11	19	15	18	23	11
162	1	15	14	30	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	11	12	19	16	16	23	12
163	1	14	13	30	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	11	11	19	15	16	23	12
164	1	15	13	29	26	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	19	23	12
165	1	14	13	29	23	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	11	19	16	17	23	11
166	1	13	13	29	24	10	11	13	<u>16 18</u>	14	10	12	20	15	15	22	12
167	1	14	14	30	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	16	23	12
168	1	14	12	28	23	10	11	13	<u>13 15</u>	15	10	11	20	14	15	21	11
169	1	14	13	30	23	10	13	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	15	17	23	12
170	1	14	13	29	24	12	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	18	23	13
171	1	14	14	31	23	10	14	12	<u>16 17</u>	16	10	11	20	15	16	24	10
172	1	14	13	29	24	11	13	14	<u>11 13</u>	15	12	12	19	17	18	24	12
173	1	14	12	28	22	10	11	13	<u>13 14</u>	16	10	11	20	15	15	21	11
174	1	14	14	31	24	11	13	13	<u>11 15</u>	15	12	13	19	16	19	23	12
175	2	15	13	30	24	10	12	15	<u>14 15</u>	15	10	11	20	14	16	20	11
176	1	14	14	30	24	11	13	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	15	18	23	12
177	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>11 16</u>	15	12	12	18	15	16	23	12
178	1	15	12	28	25	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	18	23	12
179	2	13	14	30	24	9	11	13	<u>13 14</u>	14	10	10	19	16	18	21	12
180	1	14	12	29	24	11	13	13	<u>12 14</u>	15	10	13	19	15	15	23	12
181	4	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	16	23	12
182	1	14	13	30	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	18	23	12
183	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>12 14</u>	15	12	12	19	15	17	23	13
184	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	15	16	24	12
185	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	14	12	12	17	15	17	23	11
186	1	13	14	31	24	10	11	13	<u>16 17</u>	14	10	13	20	17	15	21	11
187	1	13	13	30	25	9	11	13	<u>14 14</u>	14	10	10	20	15	19	21	12
188	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 11</u>	15	12	12	18	15	20	23	12
189	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	17	17	23	12
190	1	14	13	29	25	10	11	12	<u>13 13</u>	15	9	11	21	15	20	22	11
191	1	16	13	28	22	11	11	13	<u>11 12</u>	15	10	13	21	13	18	22	13

192	1	14	14	31	24	10	13	13	<u>11 15</u>	14	12	12	18	15	17	23	11
193	1	14	14	30	24	10	14	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	15	19	23	11
194	1	14	13	29	24	10	13	14	<u>11 15</u>	15	12	12	20	15	17	23	12
195	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 12</u>	15	12	12	19	15	18	23	12
196	1	16	13	30	25	10	11	13	<u>11 12</u>	14	11	11	20	16	15	23	13
197	1	15	14	31	21	10	11	12	<u>15 17</u>	14	10	11	19	15	16	19	13
198	1	15	13	31	23	10	14	13	<u>14 18</u>	14	9	11	19	16	17	21	12
199	1	15	13	30	23	10	13	10	<u>13 16</u>	16	10	11	20	15	16	24	11
200	1	15	13	29	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	19	23	12
201	1	15	12	28	22	10	11	14	<u>14 16</u>	16	11	11	21	15	16	20	13
202	1	13	13	30	24	10	11	13	<u>16 17</u>	14	10	11	20	17	16	22	12
203	1	14	14	30	23	11	13	14	<u>11 11</u>	15	12	12	19	15	17	23	12
204	1	15	13	30	22	10	11	14	<u>14 14</u>	16	10	11	21	15	18	20	12
205	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	17	23	12
206	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	18	23	12
207	1	15	13	31	23	11	13	13	<u>12 14</u>	15	12	11	19	15	16	23	12
208	1	17	13	30	25	10	11	13	<u>10 14</u>	14	11	10	20	15	16	23	12
209	1	14	14	30	23	10	14	12	<u>16 17</u>	16	10	11	20	15	15	24	11
210	2	14	14	30	24	10	14	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	15	18	23	11
211	1	15	13	30	21	11	11	12	<u>14 16</u>	14	9	15	20	17	17	23	11
212	1	17	13	28	23	10	11	13	<u>12 12</u>	15	10	11	21	14	16	21	12
213	1	16	13	30	21	10	11	15	<u>17 20</u>	14	11	12	21	16	17	21	11
214	1	14	13	30	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	20	16	18	23	12
215	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	17	17	23	12
216	1	14	14	32	24	11	14	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	16	17	23	13
217	1	15	14	29	23	10	11	13	<u>12 12</u>	15	11	12	21	15	16	22	11
218	2	14	14	30	24	11	13	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	15	19	23	12
219	1	16	13	29	25	12	11	13	<u>11 13</u>	14	11	11	20	16	15	23	13
220	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	15	15	24	12
221	1	14	13	28	23	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	11	19	16	17	23	11
222	1	15	13	30	21	10	11	13	<u>16 17</u>	14	11	11	21	15	17	21	11
223	1	15	13	30	24	11	13	13	<u>11 15</u>	15	12	12	19	16	16	23	12
224	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 15</u>	15	12	12	18	17	17	23	12
225	1	14	14	29	23	10	13	14	<u>14 16</u>	14	9	12	19	16	18	21	11
226	1	15	14	32	23	10	14	11	<u>12 17</u>	16	10	14	21	14	16	22	11
227	1	14	13	29	23	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	18	17	19	23	11
228	1	14	13	29	23	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	11	20	15	18	23	11
229	1	14	13	30	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	11	19	15	17	23	12
230	1	14	13	29	23	11	11	13	<u>12 16</u>	15	9	11	21	15	14	21	11
231	1	14	13	29	22	10	11	13	<u>13 19</u>	15	9	10	20	16	16	21	13
232	1	14	13	30	24	11	13	14	<u>11 14</u>	16	13	13	19	15	17	23	12
233	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 14</u>	15	12	12	19	16	18	23	12
234	1	14	14	30	23	10	11	12	<u>14 16</u>	14	9	10	20	16	14	22	11
235	1	13	13	30	22	11	13	13	<u>12 13</u>	15	12	12	19	16	18	23	11
236	1	14	13	29	24	11	13	13	<u>11 11</u>	15	12	12	19	15	17	23	12
237	1	15	12	30	21	10	11	15	<u>13 17</u>	16	10	11	23	15	16	21	11
238	1	14	13	30	23	10	11	12	<u>13 16</u>	14	10	11	20	15	19	20	11
239	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	13	19	16	17	24	12
240	1	14	14	30	23	10	11	13	<u>13 21</u>	14	10	12	21	15	20	23	11
241	1	15	13	30	23	10	11	12	<u>13 16</u>	15	9	10	20	15	16	22	11
242	1	14	13	28	23	10	13	13	<u>11 14</u>	15	12	11	19	16	17	23	12

243	1	15	13	31	21	11	11	14	<u>18</u>	<u>18</u>	14	11	11	21	15	16	21	12
244	1	15	14	32	23	10	12	14	<u>15</u>	<u>15</u>	14	10	11	21	15	15	21	11
245	1	13	14	32	24	10	11	15	<u>13</u>	<u>19</u>	14	10	12	20	16	15	22	11
246	2	14	13	29	24	11	13	13	<u>11</u>	<u>14</u>	14	12	12	19	15	17	23	12
247	1	14	13	29	24	10	13	13	<u>11</u>	<u>14</u>	16	12	11	19	16	18	23	11