

Universidade do Porto



Y-miniSTR: alternativa para a análise de amostras “complicadas”

Estudo da população do Norte de Portugal

Teresa Maria Vieira Martins

(Licenciada)

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Forenses

Sob orientação da Prof. Doutora Maria de Fátima Pinheiro

Porto, Dezembro de 2008

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Teresa Magalhães, na qualidade de directora da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, presto o meu agradecimento pela oportunidade e voto de confiança que me deu para realizar o presente trabalho nesta Instituição.

À Prof. Doutora Maria de Fátima Pinheiro, minha orientadora, agradeço todo o apoio, opiniões, críticas e sugestões.

Aos meus “colegas” de laboratório, David, Gabi, Laura e Lurdes, e aos restantes membros do Serviço de Genética e Biologia Forense (particularmente à Maria João), o meu profundo obrigada pela forma como me acolheram, aturaram e ajudaram ao longo deste trabalho.

Aos meus Amigos, Xana, Marcela, Gilberto, Isabel, Cris e Luís, muito obrigada por todo o apoio; por partilharem comigo os bons e os maus momentos. Muito particularmente à Raquel devo o mais sincero obrigada... por tudo!!

À minha Família, que sempre esteve do meu lado e me deu o apoio de que precisava, presto também toda a minha gratidão.

Por fim, mais do que um profundo agradecimento, dedico este trabalho aos meus pais e irmãos – pilares da minha existência – e ao Paulo, tão *simplesmente* por existir na minha vida.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUÇÃO	1
1. O DNA ao serviço da Justiça	2
2. Análise da diversidade genética humana	3
3. STR – Marcadores por excelência em contexto forense	4
4. Degradação e miniSTR	6
5. Cromossoma Y	8
5.1. Caracterização e modo de transmissão	8
5.2. Marcadores genéticos do cromossoma Y	10
5.3. Aplicações forenses dos Y-STR	11
a) Criminalística – Agressões sexuais	12
b) Investigações de paternidade e Identificação	14
5.4. Valor da análise de Y-STR e Bases de dados genéticos	15
5.5. Mutações e implicações na análise de perfis Y-STR	17
OBJECTIVOS	20
II. MATERIAL E MÉTODOS	21
1. Material biológico e amostragem	22
2. Extração de DNA	22
3. Estudo dos marcadores Y-miniSTR	24
3.1. Obtenção de <i>primers</i> e optimização do procedimento	24
3.2. Amplificação por PCR	24
3.3. Análise de fragmentos	26
3.4. Sequenciação	27
3.5. Análise estatística	29
4. Teste de especificidade	30
5. Teste de sensibilidade	30
6. Análise de misturas	30
7. Aplicação a amostras forenses	31
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1. Estudo da população do Norte de Portugal	34

2. Mutações	48
3. Sequenciação	51
4. Teste de especificidade	54
5. Teste de sensibilidade	55
6. Análise de misturas	56
7. Aplicação a amostras forenses	58
IV. CONCLUSÕES FINAIS	61
BIBLIOGRAFIA	63
ANEXOS	70
Anexo 1. Haplótipos obtidos para as 371 amostras analisadas no estudo	71
Anexo 2. Haplótipos dos 98 pares pai/filho estudados para pesquisa de mutações	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Lista de abreviaturas

DG	Diversidade Génica
DH	Diversidade Haplotípica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
INML	Instituto Nacional de Medicina Legal
ISFG	International Society for Forensic Genetics
mtDNA	DNA mitocondrial
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
YHRD	Y chromosome Haplotype Reference Database

Lista de símbolos

°C	Graus Celsius
h	Hora(s)
Mb	Megabase(s)
µL	Microlitro(s)
µM	Micromolar(es)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar(es)
min	Minuto(s)
M	Molar(es)
ng	Nanograma(s)
pb	Pares de bases
pg	Picograma(s)
pmol	Picomole(s)
seg	Segundo(s)

RESUMO

Actualmente os STR (*Short Tandem Repeats*) são considerados os marcadores forenses por excelência, título em grande parte devido à sua abundância e elevada variabilidade, ao facto de serem facilmente amplificáveis por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), funcionarem com baixas quantidades de DNA e serem passíveis de automatização com processos envolvendo detecção por fluorescência.

No entanto, quando se tentam analisar amostras com DNA degradado, os *loci* com fragmentos de maior tamanho (>200pb) tendem a não ser amplificados, o que se traduz numa diminuição do poder informativo da análise.

Uma possível solução para estes casos é a utilização de *primers* que hibridizam mais próximo da zona repetitiva e que, conseqüentemente, originam fragmentos de amplificação de menor tamanho.

Os STR do cromossoma Y (Y-STR) são também muito usados em genética forense por permitirem a detecção exclusivamente de DNA masculino, mesmo quando presente num enorme *background* feminino; e, pelo facto de serem iguais em todos os indivíduos do sexo masculino pertencentes a uma mesma linhagem paterna, possibilitarem a determinação do perfil de Y-STR de um indivíduo, através da análise de familiares pertencentes a essa linhagem.

No presente trabalho as vantagens supramencionadas para os miniSTR e para a utilização dos *loci* STR específicos do cromossoma Y foram associadas, através do desenvolvimento de Y-miniSTR.

Os oito Y-miniSTR estudados provaram ser úteis e eficientes ferramentas para aplicação na prática forense, uma vez que se revelaram exclusivos do cromossoma Y, produziram fragmentos de amplificação inferiores a 160pb, demonstraram uma capacidade de detecção de quantidades de DNA tão baixas como 100pg, possibilitaram a diferenciação de amostras cujos perfis Y-STR para outros marcadores eram idênticos, permitiram a determinação do perfil masculino em misturas de DNA masculino com DNA feminino, em diferentes proporções, e possibilitaram ainda a análise de diversas amostras da casuística forense como, por exemplo, alguns ossos.

No estudo de uma amostra da população do Norte de Portugal (n=272) os 8 Y-miniSTR revelaram diversidades génicas (DG) entre 0,4506 e 0,7649 e um valor de diversidade haplotípica (DH) de 0,9938. Em 272 indivíduos surgiram 195 haplótipos distintos – 72% de capacidade de discriminação –, sendo que 167 (86%) surgiram uma única vez.

ABSTRACT

Nowadays STR (Short Tandem Repeats) are the most common markers used in forensic genetics due to their abundance and high variability, the easiness they are typed with PCR-based methods, the fact they work well with low quantities of DNA and because they are susceptible of automatization with processes involving fluorescence detection.

However when testing samples with degraded DNA loci with amplicons larger than 200bp tend to fail, which results in a loss of information.

One possible way to try to solve this problem is to use PCR primers that bind as close as possible from the polymorphic region so as to produce smaller amplicons.

Y chromosome STR (Y-STR) are also widely used in forensic genetics once they allow the detection of male DNA even in a vast female background, and because they are kept unchanged along paternal lineages it is possible to determine once Y-STR profile by analysing his male relatives belonging to the same lineage.

Herein we have tried to conciliate the advantages of miniSTR with those of the use of Y chromosome specific loci, through the development of some Y-miniSTR.

The eight Y-miniSTR studied proved to be useful and efficient tools for forensic application once they have revealed themselves exclusive of the Y chromosome, gave rise to amplicons smaller than 160bp and were able to detect low quantities of DNA such as 100pg. When applied to forensic samples the Y-miniSTR made possible the differentiation of samples that displayed the same profile for Y-STR loci included in the PowerPlex[®] Y System (Promega), allowed the detection of the male component in male:female mixtures with several proportions and provided some complete haplotypes in the analysis of several skeletal remains.

In the study of a sample from the Northern Portuguese population (n=272) the gene diversity values for the 8 Y-miniSTR varied from 0,4506 to 0,7649 and the haplotype diversity was 0,9938. One hundred and ninety five different haplotypes were found – meaning 72% of discrimination capacity – 167 of them being unique.

Until recently, the Y chromosome seemed to fulfil the role of juvenile delinquent among human chromosomes — rich in junk, poor in useful attributes, reluctant to socialize with its neighbours and with an inescapable tendency to degenerate.

Mark Jobling and Chris Tyler-Smith

I. INTRODUÇÃO

1. O DNA ao serviço da Justiça

Desde que a tipagem de DNA (ácido desoxirribonucleico) foi introduzida, em meados dos anos 80 do século passado, assistiu-se a uma revolução nas ciências forenses e na capacidade dos investigadores criminais efectuarem a ligação dos criminosos aos locais do crime. Milhares de casos foram encerrados, levando à libertação de inocentes e à punição dos culpados, graças a uma “testemunha silenciosa” deixada na vítima, no local e/ou instrumentos do crime – o DNA. Contudo, a utilidade do DNA não se restringe ao âmbito penal, sendo também muito usado em processos civis, nomeadamente em investigação de parentesco biológico (maioritariamente paternidades) e na identificação de cadáveres ou restos cadavéricos (por exemplo em casos de acidentes ou catástrofes).

Foi em 1985 que, pela primeira vez, um geneticista Inglês de seu nome Alec Jeffreys, descreveu aquilo a que se viria a chamar “*DNA Fingerprinting*” ou tipagem de DNA. Jeffreys descobriu que havia certas regiões no DNA que continham pequenas sequências de nucleótidos repetidas diversas vezes, umas a seguir às outras. Adicionalmente, constatou que o número de vezes em que essas porções se repetiam podia variar de indivíduo para indivíduo.

Ao desenvolver uma técnica que permitia avaliar a variação de tamanho desses fragmentos de DNA repetitivo, Alec Jeffreys criou a possibilidade de se executarem análises para a identificação genética individual. Estas regiões de DNA ficaram conhecidas como *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) e a técnica por ele desenvolvida denominava-se *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP), uma vez que se recorria à utilização de enzimas de restrição que cortavam o DNA em zonas adjacentes à região repetitiva.

Em Abril desse mesmo ano a técnica foi usada pela primeira vez para auxiliar a resolução de um caso de emigração e, no ano seguinte (1986), na deliberação de um duplo homicídio, ambos os casos ocorridos em Inglaterra [1].

Nos mais de vinte anos que separam o nascimento da genética forense e a actualidade, os testes de DNA evoluíram estrondosamente, de forma a tornarem-se numa ferramenta sensível e eficaz no apoio à Justiça. Para tal contribuíram, de entre

outros factores, o surgimento da PCR – *Polymerase Chain Reaction*, o Projecto Genoma Humano, a descoberta de novos marcadores e o desenvolvimento de novos equipamentos e tecnologias que, associado ao enorme progresso informático, tornou possível a automatização dos procedimentos e, assim, a obtenção de melhores resultados em menores períodos de tempo.

De todos estes destaca-se a descoberta da PCR, em 1985, por Kary Mullis e membros do grupo Human Genetics da Cetus Corporation, uma vez que revolucionou a biologia molecular e as ciências forenses com a capacidade de produzir milhões de cópias de regiões específicas da molécula de DNA em poucas horas. Sem esta capacidade de copiar regiões de interesse do DNA, muitas amostras seriam impossíveis de analisar, dado que o material genético proveniente dos locais de crime é geralmente limitado, quer em quantidade quer em qualidade, e a obtenção de uma amostra “limpa” e mais concentrada estaria normalmente fora de questão. Através deste processo enzimático – que envolve um padrão cíclico de aquecimentos e arrefecimentos do DNA das amostras –, conseguem obter-se, ao fim de 30 ciclos, aproximadamente mil milhões de cópias das regiões alvo. Os fragmentos de DNA passam então a estar presentes em quantidade suficiente para serem facilmente analisados através de uma variedade de técnicas disponíveis, geralmente electroforese capilar.

2. Análise da diversidade genética humana

Mais de 99,7% do património genético da nossa espécie é igual em todos os indivíduos. Porém, a variação existente nos restantes cerca de 0,3% (aproximadamente 10 milhões de nucleótidos) é suficiente para tornar cada um de nós num ser único e irrepetível, sendo esta “porção” de variação o objecto central das análises forenses.

As técnicas usadas pelos laboratórios de genética forense para fins de identificação individual, baseiam-se nos mesmos métodos e princípios fundamentais usados no diagnóstico médico e mapeamento genético. A constituição genética de um indivíduo pode ser directamente determinada a partir de pequenas quantidades de

DNA presentes em manchas de sangue, saliva, ossos, pêlos, sémen, ou qualquer outro material biológico. Uma vez que todas as células do organismo descendem, por sucessivas divisões, de uma única célula – o ovo fertilizado – o material genético será idêntico em quaisquer células provenientes de um mesmo indivíduo (exceptuando a ocorrência de mutações), fornecendo portanto a mesma informação forense.

As variações no DNA são exibidas sob a forma de diferentes alelos ou diversas possibilidades para um determinado *locus* e existem, ao nível do DNA, duas formas possíveis de variação: polimorfismos de sequência – originados por substituição de nucleótidos numa sequência de DNA – e polimorfismos de tamanho – resultantes de inserções ou “deleções” de nucleótidos.

Uma vez que apresentamos diferentes alelos em diversos *loci*, o estudo das regiões variáveis do genoma permite proceder à identificação genética individual humana, isto é, individualizar e identificar cada um de nós.

Na realidade actual da genética forense os principais representantes dos polimorfismos de sequência são os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), enquanto que os polimorfismos de tamanho são maioritariamente representados pelos STR (*Short Tandem Repeats*).

Na tipagem de DNA são estudados múltiplos marcadores genéticos ou *loci*. Quanto mais marcadores forem examinados e comparados, maior será a probabilidade de dois indivíduos não aparentados apresentarem perfis genéticos distintos. Por outro lado, cada fracção de informação coincidente acrescida aumenta a certeza de dois perfis concordantes serem provenientes do mesmo indivíduo.

3. STR – Marcadores por excelência em contexto forense

Os genomas eucarióticos estão repletos de sequências de DNA repetitivo, vulgarmente referidas como DNA satélite, e que podem ser encontradas maioritariamente junto do centrómero dos cromossomas. Estas sequências possuem uma enorme variedade de tamanhos, e são diferenciadas de acordo com o comprimento da unidade de repetição e o número de repetições contíguas ou o comprimento total da região de repetição. Regiões de DNA com unidades de repetição

com 2-6 pares de bases (pb) de comprimento, que se repetem umas a seguir às outras – em *tandem* – até algumas dezenas de vezes, são denominadas microssatélites ou *Short Tandem Repeats* (STR) e constituem uma versão reduzida dos VNTR de Alec Jeffreys. Os marcadores STR estão dispersos por todo o genoma humano (ocupando aproximadamente 3% da totalidade deste), tanto nos autossomas como nos cromossomas sexuais, e ocorrem, em média, a cada 10.000 nucleótidos [2-4].

O número de vezes em que a unidade de repetição aparece repetida varia muito entre os indivíduos, fazendo com que estes STR sejam ferramentas eficientes para fins de identificação genética individual humana.

As primeiras aplicações destes marcadores no âmbito forense concretizaram-se no início dos anos 90 do século passado, na tipagem dos restos cadavéricos de uma vítima de homicídio [5], seguida da tipagem dos restos cadavéricos de Josef Mengele, o “Anjo da Morte” de Auschwitz [6].

Entretanto foram sendo descritos e aplicados novos marcadores STR, tornando-se nos marcadores forenses por excelência devido à sua abundância e elevada variabilidade, à circunstância de serem facilmente amplificados pela técnica de PCR, funcionarem com baixas quantidades de DNA e serem passíveis de automatização com processos envolvendo detecção por fluorescência.

O desenvolvimento de sistemas de amplificação em *multiplex* tornou possível a genotipagem simultânea de um grande número de STR numa só reacção de PCR. Actualmente a maioria dos laboratórios de genética forense recorre à utilização de kits comerciais, através dos quais se consegue proceder à amplificação simultânea de até 15 *loci* STR, o que proporciona um excelente poder de discriminação com baixo consumo de amostra. Outra grande vantagem dos kits comerciais para a tipagem de amostras na área forense é a disponibilidade de se aceder a *ladders* alélicos que permitem uma uniformidade de nomenclatura, ajudando a asseverar a qualidade dos resultados, tal como assegura a compatibilidade dos resultados inseridos em bases de dados genéticos.

4. Degradação e miniSTR

O DNA degrada-se através de diversos mecanismos, incluindo processos bacteriológicos, bioquímicos, oxidativos e/ou enzimáticos, que levam à ruptura das cadeias constituintes da molécula. Calor, humidade, luz e fogo são exemplos de factores que contribuem para essa degradação.

Como foi já referido, a tipagem de DNA baseada nos STR é o método mais usual para identificação genética individual humana devido à natureza altamente polimórfica destes marcadores e à facilidade com que são genotipados. A aplicação dos kits comerciais resulta, normalmente, na obtenção de perfis completos a partir de uma grande variedade de substratos com DNA de elevada qualidade. Todavia, o DNA recolhido nos locais de crime, e presente noutras amostras da casuística forense, está muitas vezes degradado ou apresenta inibidores da PCR e/ou contaminantes ambientais.

Assim, se um número significativo de moléculas de DNA de uma amostra biológica estiverem quebradas na região de ligação dos *primers*, ou mesmo na zona delimitada pelos *primers* “*forward*” e “*reverse*”, isto é, a zona de interesse, a eficácia da reacção de PCR será reduzida. Em termos práticos, esta degradação irá manifestar-se numa redução da sensibilidade de detecção dos produtos amplificados, ou mesmo, em casos mais críticos, numa completa falha de amplificação, principalmente para os marcadores de peso molecular mais elevado (acima dos 200/250pb) [7-11] (Figura 1).

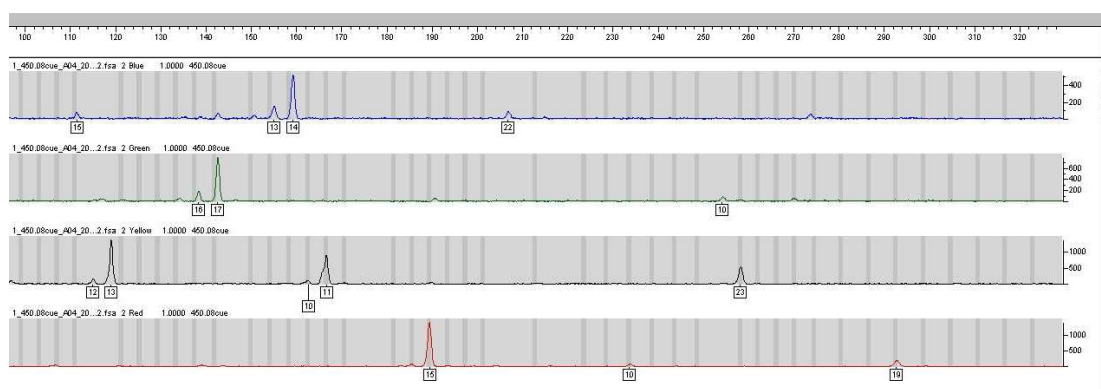


Figura 1. Electroforetograma resultante da análise de uma amostra degradada com o kit AmpF&STR[®] Yfiler[®] PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), no qual é notória a redução da eficácia para os marcadores com fragmentos de maior tamanho (>200pb).

Pode então concluir-se que a presença de DNA degradado numa amostra conduz, geralmente, à obtenção de um perfil genético parcial, o que significa um menor poder informativo.

Até há poucos anos a alternativa era recorrer à análise das regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial (mtDNA), uma vez que este está presente em grande número nas células e, devido à sua natureza circular, é mais resistente à degradação. Todavia, trata-se de um processo laboratorial moroso e com elevados custos, para além de nunca poder ser atingido, com esta análise, um poder de discriminação tão elevado como aquele que resulta da tipagem de diversos STR, dada a transmissão uniparental materna destas moléculas.

Uma abordagem alternativa para tentar recuperar o máximo de informação possível em amostras degradadas, e que tem sido utilizada nos últimos anos, é reduzir o tamanho dos fragmentos de amplificação – desenhando *primers* que se liguem o mais próximo possível da zona de repetição – criando aquilo que ficou conhecido como miniSTR [12] (Figura 2).

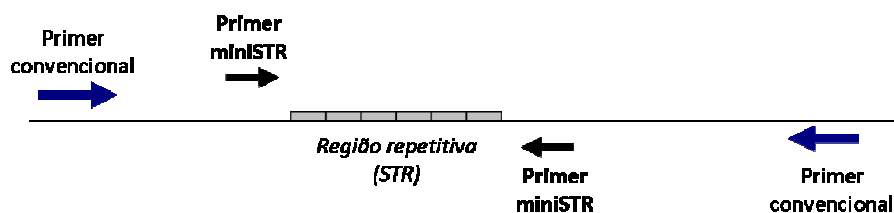


Figura 2. Diferenciação entre *primers* de STR convencionais e de miniSTR.

A constatação de que produtos de PCR de menor tamanho, na análise de amostras com DNA degradado, levavam à obtenção de uma taxa de sucesso mais elevada foi referida pela primeira vez em 1995, aquando da identificação das vítimas do fogo da Waco Branch Davidian, no Texas [13]. Estes resultados foram entretanto confirmados por um vasto número de novos trabalhos, centrados em diversos marcadores autossómicos, quer em sistemas *singleplex*, quer em *multiplexes* [14-21].

Note-se que, à circunstância da utilização de miniSTR produzir melhores resultados em amostras degradadas, acresce a grande vantagem da compatibilidade com bases de dados genéticos poder ser mantida – mesmo que esses dados tenham sido obtidos a partir do uso de kits comerciais –, uma vez que o polimorfismo estudado

é o mesmo; o que varia é simplesmente o tamanho do fragmento por deslocação dos *primers* para um local mais próximo da zona de repetição.

Apesar de todas as vantagens enumeradas para a utilização de miniSTR, destaca-se uma desvantagem face aos kits comerciais de STR, que é o facto de não se poderem criar sistemas *multiplex* que englobem tantos marcadores quantos os dos referidos kits. Dado o reduzido intervalo de tamanhos dos fragmentos torna-se mais difícil poder analisar, numa mesma reacção e com o mesmo fluorocromo, diversos polimorfismos. Assim, na maioria das vezes conseguem-se co-amplificar no máximo 4-8 miniSTR numa só reacção, o que faz com que, para se obter o mesmo poder de discriminação, se tenha que proceder a várias amplificações, implicando assim a utilização de maiores quantidades de amostra, que nem sempre está disponível.

5. Cromossoma Y

5.1. Caracterização e modo de transmissão

O cariótipo humano é constituído por 46 cromossomas organizados em 23 pares; destes, 22 são semelhantes entre homens e mulheres e cada elemento do par homólogo é idêntico em morfologia e conteúdo génico, sendo denominados cromossomas autossómicos ou autossomas. O outro par – o par de cromossomas sexuais – pode ser composto por dois cromossomas X (mulher) ou por um cromossoma X e um Y (homem). Assim, nos indivíduos do sexo masculino os cromossomas sexuais encontram-se num estado de hemizigotia, não desfrutando da existência de um elemento homólogo.

O típico cromossoma Y humano contém aproximadamente 6×10^7 pb (60Mb), sendo o terceiro mais pequeno dos cromossomas humanos, apenas ligeiramente maior que os cromossomas 21 (47Mb) e 22 (49MB). Trata-se de um cromossoma acrocêntrico, que representa apenas 2% do cariótipo. Sessenta por cento do seu DNA é constituído por sequências polimórficas altamente repetitivas, que estão essencialmente confinadas à porção heterocromática do braço longo (Figura 3) e à região pericentromérica, sugerindo que estas regiões teriam uma funcionalidade limitada [22]. Contudo, investigações posteriores demonstraram a existência de genes

e famílias de genes localizadas nas regiões supostamente não codificantes deste cromossoma [23].

Devido à falta de um elemento homólogo a maior parte do cromossoma Y não recombina durante a meiose, só se verificando recombinação – com partes homólogas do cromossoma X – em duas pequenas regiões pseudoautossómicas denominadas PAR1 e PAR2 [24], localizadas nos extremos do cromossoma (Figura 3). Tal facto leva a que todas as sequências localizadas na região não-recombinante do cromossoma Y (NRY) – que compreende aproximadamente 95% do cromossoma e corresponde à fracção exclusivamente masculina do genoma humano – sejam herdadas como um bloco. Assim, a informação passa de pai para filho sem que haja variação ou alterações, excepto aquelas que sejam criadas pela ocorrência de mutações aquando da formação dos gâmetas.

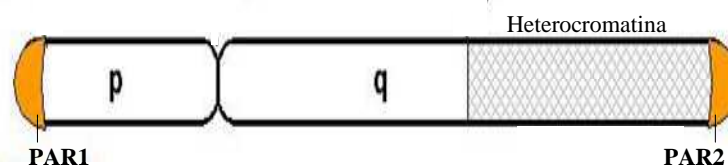


Figura 3. Idiograma do cromossoma Y humano com as duas regiões PAR assinaladas.

Tal como acontece com o mtDNA, os marcadores do cromossoma Y são conhecidos como “marcadores de linhagem”, uma vez que são herdados apenas de um dos progenitores (no caso do cromossoma Y, o pai). São passados de geração em geração sem alterações, definindo linhagens – neste caso paternas. Para os marcadores de linhagem a informação genética é referida como haplótipo e não como genótipo.

Certas características exibidas pelo cromossoma Y tornam-no particularmente úteis para estudos de vínculo de parentesco, assim como para análise de vestígios forenses. No entanto, o modo de transmissão implica limitações no seu uso no contexto da criminalística biológica em casos de concordância entre dois perfis genéticos, uma vez que a mesma informação genética é partilhada por todos os indivíduos do sexo masculino pertencentes à mesma linhagem paterna. Deste modo, a caracterização de marcadores do cromossoma Y pode ser altamente esclarecedora em

casos de exclusão, mas tem um valor probatório limitado em casos de concordância de perfis genéticos.

5.2. Marcadores genéticos do cromossoma Y

No cromossoma Y, tal como no restante genoma humano, existem sequências polimórficas cuja variabilidade se reflecte em variações de tamanho e/ou sequência.

Dois grandes categorias de marcadores de DNA têm sido usadas para a análise da diversidade do cromossoma Y: *loci* bialélicos – que apresentam dois alelos possíveis – e os *loci* multi-alélicos. Os marcadores bialélicos incluem os Y-SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e as inserções Alu. Os marcadores multi-alélicos do cromossoma Y englobam dois minissatélites e variadíssimos microsatélites ou STR (*Short Tandem Repeats*). Estes últimos sofreram um “boom” no decorrer dos últimos 20 anos, especialmente após o lançamento da sequência do genoma humano. Nos anos 90 apenas uma mão cheia de *loci* STR do cromossoma Y (Y-STR) estavam caracterizados e disponíveis para serem usados em testes de identificação genética individual humana e, no início de 2002, eram somente 30 os Y-STR disponíveis [25]. Desde aí muitas dezenas de microsatélites do cromossoma Y foram sendo descobertos e caracterizados e, em 2006, Hanson e Ballantyne [26] referiam 417 *loci* Y-STR disponíveis para potencial uso na prática forense.

Ainda que com um número limitado de marcadores disponíveis na altura, em 1997 foi seleccionado um conjunto de Y-STR para uso na prática forense [27,28] que continua, ainda hoje, a ser utilizado e que ficou conhecido como “haplótipo mínimo”. Este é composto por sete *loci* de cópia única – DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393 – e um *locus* altamente polimórfico, de múltiplas cópias – o DYS385a/b [29]. Em Janeiro de 2003 o U.S. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) recomendou a expansão do haplótipo mínimo por acréscimo de dois novos marcadores de cópia única: DYS438 e DYS439 [30] que haviam sido descritos três anos antes por Ayub e colaboradores [31]. Subsequentemente foram sendo reportados diversos *loci* adicionais que, combinados com os do haplótipo mínimo, aumentam o poder de discriminação [32-34].

O primeiro kit comercial de Y-STR ficou disponível no mercado em Janeiro de 2001 e incluía seis marcadores: DYS19, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS393 e

DYS385a/b. Posteriormente foram lançados diversos outros e, actualmente, encontram-se disponíveis no mercado distintos kits já validados para a casuística forense, sendo que a maioria incorpora entre 12 e 17 *loci* num único sistema *multiplex*. Estes kits englobam todos os marcadores recomendados pelo SWGDAM e, apesar da robustez e capacidade demonstrada de diferenciar dois indivíduos na maioria dos casos, as probabilidades de coincidência (*matching probabilities*) são modestas, quando comparadas com as de um conjunto *standard* de marcadores STR autossómicos. Assim, continua a haver necessidade de se desenvolverem novos sistemas *multiplex* para complementar os já existentes, nos casos em que é ambicionado um poder de discriminação adicional ou quando há concordância entre perfis de Y-STR de diferentes indivíduos envolvidos no caso.

5.3. Aplicações forenses dos Y-STR

O valor do cromossoma Y nas análises forenses prende-se com o facto já evidenciado deste se encontrar somente nos indivíduos do sexo masculino. Uma vez que a grande maioria dos crimes em que a informação genética se torna útil, particularmente os crimes de natureza sexual, envolve indivíduos do sexo masculino como perpetradores, os testes de DNA desenhados especificamente para examinar a porção masculina da amostra podem tornar-se extremamente valiosos. Analisando o cromossoma Y poderão ser obtidos resultados interpretáveis nos casos em que os marcadores autossómicos se revelam limitados pela quantidade e/ou qualidade da amostra como, por exemplo, quando existe uma pequena quantidade de DNA masculino misturado com grandes quantidades de DNA feminino – situação típica em amostras de agressões sexuais.

Há pouco mais de 10 anos, a análise da porção especificamente masculina do DNA humano estava limitada à determinação do género de uma dada amostra biológica [27]. Os testes que eram então realizados não tiravam partido do potencial discriminativo da porção especificamente masculina do cromossoma Y, a qual contribui para a variabilidade total do genoma humano.

Nos anos 90, as técnicas de identificação forense eram dominadas pelo desenvolvimento e rápido estabelecimento de STR amplificáveis por PCR; e apesar de um número considerável de STR autossómicos terem sido rapidamente avaliados e

implementados com sucesso na casuística forense, o desenvolvimento de STR do cromossoma Y permanecia estagnado, existindo apenas um marcador tetramérico cuja aplicabilidade ao âmbito forense havia sido considerada – DYS19 [27]. Se bem que a sua aplicação fosse limitada, por não se dispor de marcadores adicionais, tal restrição pôde ser ultrapassada. A detecção e validação de um grande número de sequências polimórficas presentes no cromossoma Y, tornou possível a realização de estudos populacionais mais completos e a sua aplicação imediata no âmbito forense.

A possibilidade de se determinarem vínculos de filiação na ausência do progenitor, a investigação da identidade e do sexo das vítimas de acidentes e/ou desastres de massa e a identificação dos responsáveis em casos de agressões sexuais, constituem alguns dos campos de aplicação forense dos marcadores microsatélite do cromossoma Y na actualidade.

a) Criminalística – Agressões sexuais

Misturas de fluidos corporais provenientes de diferentes indivíduos são uma situação frequente na casuística forense, particularmente no que se refere a delitos de natureza sexual. Nestes casos, muitas das amostras biológicas presentes ao laboratório, para análise genética, contêm uma mistura de células espermáticas masculinas e células epiteliais femininas. A análise destas amostras, recorrendo a STR autossómicos, resulta na obtenção de mistura de perfis (vítima + agressor) – nem sempre de fácil e inequívoca interpretação –, ou somente na obtenção do perfil genético da vítima, uma vez que o seu material genético está normalmente presente em muito maior quantidade.

Uma forma de combater este problema é proceder a uma lise diferencial [35] aquando da extracção do DNA. Através deste processo obtêm-se, separadamente, a fracção masculina (espermatozóides) e a fracção feminina (maioritariamente células epiteliais). Após a extracção procede-se à amplificação da fracção masculina com STR autossómicos, para identificação do agressor. Contudo esta técnica não é totalmente eficaz – uma vez que nem sempre se consegue uma separação total – o que acaba por se revelar na perda de parte da fracção masculina. Este facto pode ser problemático, principalmente quando se trata de amostras com muito pouco DNA masculino. Acresce ainda o facto de não ter qualquer utilidade em amostras de ejaculados de

indivíduos oligo ou azoospermicos e/ou vasectomizados, uma vez que estas não contêm espermatozoides (ou têm-nos em muitíssimo baixa quantidade) e o método de separação é baseado nas diferenças estruturais e bioquímicas das células.

Perante estas dificuldades surgiu uma nova forma de se analisarem as amostras provenientes de crimes de natureza sexual, com o objectivo de identificar o seu autor. Uma vez que a maioria dos crimes sexuais tem um homem como perpetrador e uma mulher como vítima, recorrer à caracterização de polimorfismos específicos do cromossoma Y (Y-STR) aumenta as hipóteses de serem detectadas pequenas quantidades de DNA do agressor – mesmo na presença de um enorme *background* de DNA heterólogo feminino – dado que estes marcadores estão presentes exclusivamente nos indivíduos do sexo masculino. Assim, apenas o material genético de proveniência masculina é amplificado, mesmo que represente uma ínfima parte do DNA total da amostra, excluindo-se a necessidade de interpretar perfis de mistura.

Nos últimos anos foram publicados diversos estudos demonstrando a aplicabilidade e eficácia dos Y-STR nestas situações, sem que seja necessário recorrer à lise diferencial [36-42].

Outra vantagem da aplicação dos Y-STR é a mais fácil determinação do número de contribuidores de sémen em situações de violação por múltiplos agressores, uma vez que para cada marcador analisado cada indivíduo apresentará um único alelo (em oposição às complicadas misturas obtidas com o estudo de marcadores autossómicos).

No entanto há que ter em conta que, devido às zonas palindrómicas duplicadas do cromossoma Y, alguns *loci* Y-STR ocorrem mais do que uma vez e, quando amplificados com um par de *primers* específico para aquele *locus*, originam mais do que um fragmento de amplificação e, conseqüentemente, levam à presença de mais do que um pico no electroforetograma. Este facto pode levar ao surgimento de alguma confusão na hora de determinar o número de contribuidores de material biológico para determinada amostra, uma vez que um só par de *primers* pode produzir dois ou mais produtos de amplificação que podem ser (erradamente) interpretados como pertencentes a diversos indivíduos.

Pode ainda acrescentar-se a estas uma terceira vantagem que é a capacidade de se analisarem amostras sem espermatozoides, resultantes de ejaculados de indivíduos azoospermicos ou vasectomizados, ou de situações em que não houve

ejaculação. Nestes casos, o material masculino presente na amostra provém unicamente de células epiteliais resultantes de descamação [36].

Resta salientar o facto suscitado por diversos estudos [37,39,43,44] dos marcadores Y-STR serem mais sensíveis do que os STR autossómicos, dado que, por diversas vezes, se conseguiram resultados com Y-STR em amostras que, quando analisadas com kits de STR autossómicos, não haviam produzido resultados.

Em jeito de conclusão, poder-se-á dizer que a tipagem de Y-STR será especialmente útil na análise de amostras de mistura envolvendo: (1) um ou mais contribuidores de sémen, (2) homens azoospermicos ou vasectomizados e (3) a presença de mistura de outros fluidos corporais (ex.: saliva-pele ou pele-suor) de vítimas e suspeitos de sexo distinto [27,36,44,45].

b) Investigações de paternidade e Identificação

Nas investigações de paternidade de filhos do sexo masculino, bem como na identificação de restos cadavéricos através de familiares, também eles do sexo masculino, os STR do cromossoma Y têm ganho cada vez mais importância [46-49].

Em situações em que o suposto pai faleceu ou não está disponível para análise, é possível determinar o haplótipo completo do cromossoma Y analisando qualquer parente, de sexo masculino, pertencente à sua linhagem paterna. Assim, uma análise detalhada do cromossoma Y pode evitar a realização de exumações – sempre penosas para a família – para determinar a paternidade de um falecido relativamente a um filho homem, se se puder contar com irmãos reconhecidos, tios ou avôs paternos do suposto filho. Contudo um resultado baseado exclusivamente nos Y-STR não exclui como pai biológico qualquer outro homem dessa mesma linhagem, e a aplicabilidade destes marcadores está limitada a aproximadamente metade dos casos de investigação de paternidade, aqueles em que o descendente em causa é do sexo masculino.

Outra vantagem do cromossoma Y na investigação forense é a circunstância da presença de familiares com a mesma informação relativa ao cromossoma Y aumentar o número de possíveis amostras de referência em casos de pessoas desaparecidas e identificação de vítimas de grandes catástrofes.

Pode concluir-se então que a capacidade de detectar e discriminar DNA masculino torna os marcadores STR do cromossoma Y num vantajoso acréscimo aos já bem estabelecidos STR autossómicos. Além disso, o cromossoma Y pode também ser usado para outros fins, tais como: traçar padrões das migrações humanas e para responder a questões antropológicas, históricas e genealógicas.

5.4. Valor da análise de Y-STR e Bases de dados genéticos

Como foi já referido, grande parte do cromossoma Y é transferida directamente de pai para filho sem que haja recombinação, fazendo com que as mutações sejam a única forma de gerar variabilidade, ao longo do tempo, entre indivíduos relacionados por via paterna. Assim, enquanto que um resultado de “exclusão” obtido ao analisar marcadores do cromossoma Y pode ser decisivo na investigação forense, já uma “concordância” entre suspeito e evidência apenas prova que o indivíduo em questão pode ter contribuído para a amostra, tal como o podem ter feito um irmão, pai, avô, tio ou primo paternos, ou mesmo um qualquer outro familiar da linha paterna, mesmo que distante nessa linhagem. Apenas em circunstâncias muito específicas é que a concordância entre dois perfis genéticos do cromossoma Y pode ser vista como inequívoca. Tal só é possível quando se comparam amostras de uma população fechada como, por exemplo, a análise de vestígios de uma catástrofe em que se conhece a identidade de todos os indivíduos envolvidos (queda de um avião, entre outras).

Pode então concluir-se que os haplótipos obtidos dos marcadores de linhagem não podem nunca ser tão eficazes na diferenciação de dois indivíduos como são os génotipos dos marcadores autossómicos que não estão ligados e segregam independentemente de geração em geração.

Apesar de tudo, os Y-STR constituem um valioso acréscimo ao conjunto de ferramentas dos cientistas forenses e, quantos mais Y-STR forem estudados maior será o poder de distinguir linhagens.

Quando o perfil de DNA de um suspeito, ou de uma vítima, é concordante com o perfil de DNA da evidência recolhida, por exemplo, no local do crime, o indivíduo é “não excluído” como potencial fonte da evidência. A força da coincidência é

normalmente expressa sob a forma de um valor estatístico que traduz a frequência esperada da ocorrência desse perfil de DNA em indivíduos não aparentados, dentro de diversos grupos populacionais.

Uma vez que os marcadores do cromossoma Y não gozam de independência entre si e são transmitidos em bloco, não podem ser analisados, do ponto de vista estatístico ou de valor probatório, da mesma forma que os STR autossômicos. Assim sendo, a regra do produto não pode ser aplicada, isto é, as frequências haplotípicas não podem ser extrapoladas a partir das frequências alélicas por simples multiplicação. Os resultados obtidos da análise de Y-STR têm de ser combinados na forma de um haplótipo, para comparação com bases de dados de haplótipos disponíveis, para que se possa estimar a raridade de um perfil haplotípico em particular. O estabelecimento de bases de dados locais muito bem definidas torna-se essencial para se puderem usar os Y-STR na prática forense [50].

A maior e mais extensamente usada base de dados de haplótipos do cromossoma Y – YHRD (Y Chromosome Haplotype Reference Database) –, disponível online desde o ano 2000, foi criada por Lutz Roewer e colaboradores na Universidade de Humbolt (Berlim, Alemanha) [51,52] e teve origem num trabalho interlaboratorial levado a cabo por Kayser *et al.* [27], no qual foram analisadas cerca de 4.000 amostras de indivíduos do sexo masculino, pertencentes a 48 populações diferentes. Com o passar dos anos esta base de dados foi aumentando e actualmente¹ conta já com 58.818 haplótipos introduzidos [53]. Na YHRD é possível pesquisar haplótipos com até 16 *loci*: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 e DYS385a/b (haplótipo mínimo), acrescidos dos marcadores DYS438 e DYS439 (haplótipo “expandido” recomendado pelo SWGDAM), e ainda os *loci* DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 e YGATAH4. Importa salientar que, apesar do tamanho da base de dados ser extremamente importante para a fiabilidade de uma estimativa da frequência de um qualquer haplótipo [54], mais importante ainda é que estas bases de dados contemplem o maior número possível de *loci* Y-STR, uma vez que quanto mais extenso for o haplótipo, maior será a capacidade de discriminação [28].

Existem muitas outras bases de dados de haplótipos Y-STR com acesso online como, por exemplo, as das empresas ReliaGene [55], Promega [56] e Applied

¹ Agosto de 2008

Biosystems [57]. Estas diferem quanto ao número de marcadores Y-STR e de indivíduos representados, apesar de todas conterem o conjunto de *loci* recomendados pelo SWGDAM.

Note-se que o desenvolvimento destas bases de dados é importante, não apenas para se estimarem frequências haplotípicas para subsequente cálculo de probabilidades de *matching* em estudos forenses, mas também para a análise comparativa de populações [58].

Actualmente estão disponíveis duas abordagens para avaliar a probabilidade de uma concordância entre dois perfis haplotípicos de STR do cromossoma Y (evidência e suspeito em criminalística, ou pai e filho nas investigações de paternidade): o método de contagem e o método de “cálculo” de frequências haplotípicas (*surveying frequency method*) [59,60].

No método de contagem a estimativa da frequência de um haplótipo em particular depende inteiramente do tamanho da base de dados usada, facto este que se traduz numa limitação que conduz normalmente a uma estimativa de frequência altamente conservativa. O método de “cálculo” de frequências haplotípicas, por outro lado, é um método de extrapolação com uma abordagem Bayesiana que procura extrair mais informação da estrutura das bases de dados de haplótipos Y-STR e que, por isso, resulta na obtenção de frequências haplotípicas mais rigorosas [52].

Um programa que calcula frequências haplotípicas recorrendo a este último método está já implementado na YHRD para três subpopulações europeias. Contudo o método de contagem continua a ser recomendado para todas as restantes populações, até que se consigam obter bases de dados suficientemente grandes e representativas [61].

5.5. Mutações e implicações na análise de perfis Y-STR

A evidência genética nas análises forenses e testes de paternidade é baseada na interpretação das semelhanças e/ou diferenças em determinados marcadores genéticos, quando são comparadas duas ou mais amostras. Enquanto que na criminalística as diferenças são indicativas de uma exclusão – uma vez que a informação genética de cada indivíduo é igual em todas as células do seu organismo,

ao longo de toda a sua vida –, nos testes de paternidade (ou identificação através de familiares) o mesmo já não se verifica. Podem surgir diferenças entre os perfis genéticos de um presumível pai e do filho em investigação, fruto da ocorrência de mutações espontâneas na linha germinativa do progenitor. Desta forma, a constatação da existência de tais diferenças não pode levar automaticamente a que se conclua pela não existência de vínculo biológico entre aqueles dois indivíduos. É necessário conhecer as taxas de mutação dos diferentes *loci* para se proceder a uma correcta interpretação dos perfis genéticos.

A análise directa de pares pai/filho com paternidade confirmada é o método de eleição para se estimarem taxas de mutação nos microssatélites do cromossoma Y. Recorrendo a este método, Kayser *et al.* [62] estimaram uma taxa de mutação média de $2,80 \times 10^{-3}$ para um conjunto de 15 Y-STR e de $2,08 \times 10^{-3}$ se se considerarem apenas os *loci* incluídos no haplótipo mínimo. Tendo em consideração estes valores não é de todo inesperada a ocorrência de mutações em mais do que um Y-STR na mesma linha germinativa, tal como tem sido reportado [62,63].

As taxas de mutação dos STR, incluindo os do cromossoma Y, mostram variação não apenas inter mas também intra-*locus*, ou seja, variam muito entre os diversos *loci* e, dentro de cada *locus*, entre os diferentes alelos, dependendo da estrutura do *locus* e do tamanho do alelo [62-64]. Torna-se então evidente a grande necessidade de informação disponível para que se possam estimar taxas de mutação fiáveis, as quais são cruciais para a correcta interpretação dos resultados genéticos em determinadas situações. Nesta linha de pensamento, as recomendações da ISFG (International Society for Forensic Genetics) para a utilização de Y-STR em análises forenses [50] promovem o encorajamento da comunidade científica para a publicação de todos os dados que disponham relativamente a mutações verificadas em pares pai/filho com paternidade confirmada, tal como havia sido já feito por Kayser e Sajantila [65] ao proporem a criação de uma base de dados de mutações.

Outro aspecto mutacional não exclusivo, mas especialmente presente nos *loci* Y-STR, e que interfere na interpretação dos resultados das análises forenses, é a ocorrência de alelos adicionais devido à duplicação (ou triplicação) de grandes regiões do cromossoma que incluem um *locus* STR, seguida de uma alteração no número de

repetições nesse *locus*, por mutação. Tal facto tem de ser tido em consideração nas análises forenses nas quais os alelos adicionais são normalmente interpretados como perfis de mistura de material genético proveniente de mais do que um dador. Naturalmente o conhecimento da frequência de ocorrência de tais eventos será também do total interesse dos laboratórios forenses.

OBJECTIVOS

No presente trabalho pretende-se aliar as vantagens atrás enumeradas para o recurso aos miniSTR àquelas inerentes à utilização de marcadores específicos do cromossoma Y, através da criação de sistemas *multiplex* de miniSTR do cromossoma Y ou **Y-miniSTR**. Neste contexto, esperamos que a utilização de *primers* que geram fragmentos de amplificação de menor tamanho na tipagem de Y-STR possa também levar à obtenção de taxas de sucesso mais elevadas na análise de amostras altamente degradadas, quer forenses quer antropológicas.

Especificamente pretende-se:

- obter *primers* de amplificação para diversos *loci* Y-STR – que originem fragmentos de amplificação com tamanho inferior a 200pb – combinados em vários sistemas *multiplex*;
- otimizar as condições de amplificação e genotipagem para os referidos *multiplexes*;
- efectuar testes de especificidade e sensibilidade.

Após optimização dos procedimentos os novos multiplexes serão usados para:

- caracterizar uma amostra da população do Norte de Portugal relativamente aos novos marcadores;
- proceder à análise de misturas de DNA masculino e feminino;
- diferenciar amostras biológicas de dadores não aparentados mas que apresentam perfis genéticos idênticos noutros *loci* Y-STR;
- aplicar a casos forenses do âmbito da identificação genética individual de restos cadavéricos e criminalística biológica.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material biológico e amostragem

Neste estudo foram usadas amostras biológicas (zaragatoas bucais ou manchas de sangue em cartões Whatman) existentes no Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal (INML), IP para fins de investigação de paternidade.

Usaram-se na totalidade 371 amostras, divididas em dois grupos:

- O primeiro grupo era composto por amostras de 273 indivíduos do sexo masculino, aparentemente saudáveis, não aparentados entre si e com residência no Norte de Portugal;
- Do segundo grupo constavam amostras de 98 indivíduos do sexo masculino, aparentemente saudáveis, filhos de outros tantos indivíduos pertencentes ao primeiro grupo (consideraram-se filhos aqueles em que havia sido registada uma probabilidade de paternidade superior a 99,9999%).

Todas as amostras foram colhidas após consentimento informado e a confidencialidade relativamente à identidade dos dadores foi totalmente assegurada.

2. Extração de DNA

O DNA foi extraído das amostras supracitadas por recurso ao método orgânico fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico², adaptado à utilização de colunas Microcon[®] ultracel YM-100 (Millipore), segundo o procedimento que se segue:

- Cortar a ponta da zaragatoa (seca), ou um pequeno quadrado da mancha de sangue, para um *ependorf* de 1,5mL estéril;

² A escolha deste método de extração recaiu sobre o facto de se pretender iniciar, com estas amostras, a criação de um banco de amostras biológicas para futuros estudos populacionais. Assim sendo, pretendia-se uma extração que resultasse numa amostra purificada, com DNA de elevado peso molecular e passível de ser armazenada, inalterada, por longos períodos de tempo, estando a extração orgânica com fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico descrita como sendo o método mais indicado nestas situações.

- Adicionar 500µL de solução de extracção [94% (V/V) de tampão de extracção (10mM Tris pH=8, 10mM EDTA, 0,1M NaCl, 2% SDS; esterilizado por filtração por vácuo); 4% (V/V) de DTT (1M) e 2% (V/V) de proteinase K (10ng/mL)];
- Agitar em vortex;
- Incubar em banho termoestático a 56°C, com agitação ligeira, durante 3h;
- Recuperar a solução de lise pelo método “*los dos viales*”:
 - Inverter o *ependorf* que contém a amostra e furar-lhe o fundo recorrendo, para tal, a uma agulha estéril e aquecida à chama;
 - Introduzir este *ependorf* num novo *ependorf* de 1,5mL estéril;
 - Recorrendo novamente à agulha estéril e aquecida à chama, furar a tampa do *ependorf* que contém a amostra;
 - Centrifugar durante 10min a 7.800 x g;
 - Descartar o *ependorf* inicial e continuar o procedimento com o segundo *ependorf*, sendo este o que contém agora a amostra;
- Adicionar 200µL de solução fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) (USB Corporation);
- Agitar;
- Centrifugar durante 3min a 16.000 x g;
- Colocar o filtro Microcon[®] ultracel YM-100 (Millipore) num tubo de recolha fornecido;
- Adicionar 100µL de água estéril ao filtro Microcon[®];
- Recolher 400µL da fase superior da amostra e adicionar ao mesmo filtro;
- Centrifugar durante 20min a 1.000 x g;
- Descartar o líquido contido no tubo de recolha e recolocar o filtro no mesmo tubo;
- Adicionar 200µL de água estéril ao filtro e centrifugar durante 30min a 1.000 x g;
- Descartar o tubo de recolha e colocar o filtro, invertido, num novo tubo *ependorf* de 1,5mL estéril;
- Adicionar ao filtro 50µL de água estéril, morna, e centrifugar durante 10min a 1.000 x g;
- Descartar o filtro e armazenar a amostra a -20°C até utilização.

3. Estudo dos marcadores Y-miniSTR

3.1. Obtenção de *primers* e optimização do procedimento

Os *primers* utilizados para amplificação dos marcadores genéticos em estudo foram os descritos por Asamura *et al.* [66], com uma ligeira variação no *primer* “reverse” do sistema DYS576. Todos os *primers* “reverse” descritos por Asamura *et al.* possuíam uma cauda GTTTCTT que servia para promover a adenilação final dos fragmentos. Neste trabalho, no sistema DYS576, esta cauda foi alterada para GTTCTT (Tabela 1), para que se conseguisse um desfasamento no tamanho dos fragmentos, de forma a evitar o aparecimento de *pull-ups* coincidentes com os picos verdadeiros. Estes *primers* foram testados com o software AutoDimer [67] para a possível formação de dímeros e/ou *hairpins*, tendo sido o resultado negativo.

Após a obtenção dos *primers* a reacção de PCR foi optimizada, tendo sido testados os seguintes parâmetros: concentração de *primers*, temperaturas de *annealing*, número de ciclos e condições para a extensão final (temperatura e duração). Considerou-se a reacção optimizada quando, na amplificação de 0,75ng de DNA padrão AmpF ϕ STR Control DNA 007 (Applied Biosystems), doravante referido como DNA padrão 007, se obtinha um electroforetograma com um só pico para cada marcador genético e cujas alturas se encontravam balanceadas.

3.2. Amplificação por PCR

A amplificação dos marcadores específicos do cromossoma Y foi levada a cabo em dois sistemas *multiplex*, mais concretamente dois *quadriplexes* (Q1 e Q2). O *quadriplex* Q1 era composto pelos marcadores DYS632, DYS540, DYS570 e DYS522, enquanto que do *quadriplex* Q2 constavam os marcadores DYS556, DYS576, DYS504 e DYS508. Os *primers* utilizados, e respectivas marcações com fluorocromos, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Primers usados para amplificação.

Marcador genético	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Fluorocromo
Quadrplex 1	DYS632 TGGTTAAGGGCAAACCATT gtttcttTCTGGGCAACAGAAGGAGA	6-FAM
	DYS540 CCCGGGTCCTATACTCATTATT gtttcttCAACCTGGGCTACAGAGACA	VIC
	DYS570 GCTGTGTCCTCCAAGTTCCT gtttcttGCTGAAATGCAGATATCCCTA	NED
	DYS522 TGGATAGACATAGGTGACAGATGAT gtttcttGGAACCTCATGGTGGACATC	PET
Quadrplex 2	DYS556 GCCAAAACAATACTAGGCAAAAAT gtttcttGGTTAGTGTAATGCATCCAGCA	6-FAM
	DYS576 GCAAGACCTCATCTCTGAATAAAAG gtttcttGCGTATTTGTCTTGGCTTTTTC	VIC
	DYS504 CCTCCCCTCCACTCACTT gtttcttGGAGGGAGGGAAAGAGAAAG	NED
	DYS508 CCCAAATTCCAGCTTATTATTCC gtttcttAGGTGATAGATGATATGCAGAGAGT	PET

Em letras minúsculas estão os oligonucleótidos que compõem a cauda que foi adicionada aos *primers* “reverse” para promover a adenilação dos fragmentos.

Os fluorocromos mencionados na última coluna encontravam-se ligados à extremidade 5' do *primer* “forward”.

As reacções de PCR foram realizadas em termocicladores GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) recorrendo ao QIAGEN® Multiplex PCR kit (QIAGEN), num volume final de 12,5µL contendo: 6,25µL de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix; 1,25µL de Q-Solution, 5x; 2,75µL de água estéril; 1,25µL de Primer Mix 10x concentrada e 1µL de DNA *template* (não quantificado).

Na reacção final os *primers* encontravam-se nas concentrações de 1,0µM (DYS632), 0,2µM (DYS540), 1,4µM (DYS570 e DYS522), no que respeita ao Q1 e 0,3µM (DYS556), 0,6µM (DYS576), 1,0µM (DYS504) e 0,6µM (DYS508), quanto ao *quadrplex* 2.

As condições de temperatura consistiram numa desnaturação inicial a 95°C durante 15min, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30seg, *annealing*

dos *primers* a 59°C por 90seg e extensão a 72°C por 60seg. Após os trinta ciclos havia um período de 30min a 72°C de extensão final.

Todas as reacções foram acompanhadas de um controlo negativo (água estéril) e um controlo positivo (DNA padrão 007 (Applied Biosystems)).

3.3. Análise de fragmentos

Após amplificação, 1µL de produto de PCR foi adicionado a 13,55µL de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) e 0,45µL de padrão interno GeneScan™ – 500LIZ® Size Standard (Applied Biosystems), para ser analisado por electroforese capilar, em condições desnaturantes, num ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), com polímero 3100 POP-4™ Polymer (Applied Biosystems), e utilizando o software Data Collection (versão 1.1) (Applied Biosystems).

O tamanho dos fragmentos foi determinado por comparação com o padrão interno GeneScan™ – 500LIZ® Size Standard (Applied Biosystems) recorrendo ao software GeneScan (versão 3.7) (Applied Biosystems). Para a designação alélica foi utilizado um limiar de detecção dos picos de 100 RFU (Relative Fluorescence Units).

A atribuição alélica foi feita manualmente, recorrendo inicialmente a um “*ladder* teórico” construído como a seguir se descreve:

Foram amplificadas e analisadas, seguindo os procedimentos atrás descritos, diversas réplicas de DNA padrão 007 (Applied Biosystems), cujo perfil genético havia já sido descrito por Asamura *et al.* [66]. Calculou-se a média dos tamanhos dos fragmentos obtidos para cada marcador (em pares de bases – pb) e fez-se corresponder esse tamanho ao respectivo alelo do DNA padrão. De seguida, adicionaram-se e subtraíram-se sucessivamente 4pb ao valor médio – uma vez que todos os *loci* em estudo apresentam unidades de repetição tetraméricas – para se obterem os valores relativos aos alelos superiores e inferiores, respectivamente.

3.4. Sequenciação

Com o objectivo de confirmar o rigor da atribuição alélica atrás referida, para cada marcador foram sequenciados pelo menos dois alelos – o alelo de maior e o de menor tamanho de cada marcador e, para os *loci* com mais de cinco alelos, para além destes dois foi também sequenciado um alelo de tamanho intermédio. Isto permitiu calibrar o tamanho dos fragmentos (em pb) com o número de repetições presentes e, conseqüentemente, a designação alélica.

Foram também sequenciadas todas as amostras que aparentemente apresentavam interalelos ou unidades de repetição incompletas.

Adicionalmente, o DNA padrão 9948 Male DNA (Promega) – doravante referido como DNA padrão 9948 – foi sequenciado para confirmar o seu haplótipo relativamente aos marcadores em estudo, uma vez que este não se encontra publicado.

Os *primers* usados na sequenciação foram desenhados com o software Primer 3 (disponível em http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e posteriormente testados com os softwares Auto-Dimer [67] e *In-Silico* PCR (disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPCR?command=start>), e encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* para sequenciação.

<i>Locus</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	
	<i>Primer "forward"</i>	<i>Primer "reverse"</i>
DYS632	ACGACCATAAGGCTGCAGTT	TCACACCTGTAATCCCAGCA
DYS540	TGATTCACCCTGACCGTGTA	AGTTAGCCTGGTGTGGTGGT
DYS570	TCATCCAATTGCTGTCTTTTGG	GAAGGGCTTCTAAGGGATGC
DYS522	TGGGGAAGCTCTGATTGAGT	AGGGTGGGGAAGTTTCTGAT
DYS556	TGCTGTCACATACCAATGA	TTGACAAAATTCTGATGGTTGC
DYS576	CAAAAAGTGGCAAGCACA	ATGAGATTTGGGTGGGAACA
DYS504	TCTACACCACTGTGCCAAGC	AACCCAAGATGCAGAGGTTG
DYS508	CCCAGATAACCCCTTCACAT	AGAACAATAAGGTGGGATGG

Previamente à reacção de sequenciação, as amostras foram amplificadas em *singleplex* recorrendo, uma vez mais, ao QIAGEN® Multiplex PCR kit (QIAGEN), num volume final de 25µL contendo: 6,5µL de água estéril, 12,5µL de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix; 2,5µL de Q-Solution, 5x; 2,5µL de Primer Pair Mix 10x concentrada e 1µL de DNA *template*. Todos os *primers* apresentavam uma concentração de 1µM na

reação final. As reações de PCR foram levadas a cabo em termocicladores GeneAmp[®] PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems), com as seguintes condições de temperatura: desnaturação inicial a 95°C durante 15min, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 45seg, *annealing* dos *primers* a 60°C por 60seg e extensão a 72°C por 60seg. Após os 35 ciclos havia um passo de extensão final a 72°C durante 10min.

Os produtos de amplificação foram purificados com MinElute[®] PCR Purification Kit (QIAGEN) segundo o protocolo que a seguir se descreve:

- Adicionar 125µL de tampão PB ao produto de PCR;
- Colocar uma coluna MinElute[®] num tubo de recolha de 2mL fornecido no kit;
- Transferir todo o conteúdo do tubo de PCR para a coluna;
- Centrifugar durante 1min a 16.000 x g;
- Descartar o líquido que fica no tubo de recolha e recolocar a coluna nesse tubo;
- Adicionar 750µL de tampão PE à coluna;
- Centrifugar durante 1min a 16.000 x g;
- Descartar o líquido que fica no tubo de recolha e, uma vez mais, colocar a coluna no mesmo tubo;
- Centrifugar durante 1min a 16.000 x g;
- Descartar o tubo de recolha e o seu conteúdo e colocar a coluna num *ependorf* de 1,5mL estéril;
- Adicionar 15µL de tampão EB à coluna, o mais próximo possível do centro da membrana, sem, no entanto, lhe tocar;
- Deixar repousar durante 1min à temperatura ambiente;
- Centrifugar durante 1min a 16.000 x g;
- Descartar a coluna e guardar (no frio) o *ependorf* contendo a amostra purificada.

Após a purificação procedeu-se à reação de sequenciação usando o BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), com um volume de reação de 10µL contendo: 5,75µL de água estéril, 1,5µL de Master Mix BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems), 0,75µL de BigDye[®] Terminator v1.1 v3.1 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems), 3,2pmol de *primer*

“forward” ou “reverse” e 1µL de amostra. As reacções foram realizadas em termocicladores GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems), em 25 ciclos com as seguintes condições de temperatura: 10seg a 96°C (desnaturação), 5seg a 50°C (*annealing* dos *primers*) e 4min a 60°C (extensão).

De seguida efectuou-se a remoção dos terminadores utilizando o DyeEx™ 2.0 Spin Kit (QIAGEN) segundo o protocolo:

- Agitar brevemente a coluna em vortex, rodar a tampa ¼ de volta e retirar o “fecho terminal”;
- Colocar a coluna num tubo de recolha de 2mL fornecido no kit;
- Centrifugar durante 3min a 750 x g;
- Transferir cuidadosamente a coluna para um *ependorf* de 1,5mL estéril e descartar o tubo de recolha e o seu conteúdo;
- Transferir todo o produto de PCR para o centro do gel formado na coluna sem, no entanto, lhe tocar;
- Centrifugar durante 3min a 750 x g;
- Descartar a coluna e guardar o *ependorf* contendo a amostra purificada.

Por fim, as amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) com polímero 3100 POP-4™ Polymer (Applied Biosystems) recorrendo ao software Data Collection (versão 1.1) (Applied Biosystems). Para tal, adicionaram-se 16µL de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) a cada amostra purificada e transferiu-se todo o volume para as placas de sequenciação.

Os resultados foram analisados recorrendo ao software Sequece Analysis (versão 3.7) (Applied Biosystems) e o número de repetições presente contado manualmente.

3.5. Análise estatística

As frequências alélicas foram estimadas por contagem directa. A diversidade génica (DG) de cada *locus* foi calculada de acordo com a fórmula $DG = (n/n-1)(1-\sum p_i^2)$ [68], na qual **n** representa o tamanho da amostra e ***pi*** as frequências alélicas do marcador em análise.

De igual modo as frequências haplotípicas foram estimadas por contagem directa, enquanto que a diversidade haplotípica global (DH) foi determinada de acordo com a mesma fórmula, mas com p_i a representar, neste caso, as frequências haplotípicas. O desvio padrão para a estimativa da diversidade haplotípica foi calculado segundo a equação $\delta = \sqrt{(2/n)[\sum p_i^3 - (\sum p_i^2)^2]}$ [68].

4. Teste de especificidade

Para testar a especificidade dos *quadriplexes*, diversas concentrações de DNA feminino AmpF ϕ STR Control DNA 9947A (Applied Biosystems) foram amplificadas e genotipadas de acordo com as metodologias previamente descritas nas secções 3.2 e 3.3, respectivamente.

Foram realizadas duas réplicas de cada uma das seguintes concentrações: 10, 5 e 1ng/ μ L. As amplificações foram acompanhadas de controlos positivos (1ng de DNA padrão 9948 (Promega)).

5. Teste de sensibilidade

De forma a ser determinado o limite de detecção dos *quadriplexes*, 1 μ L de cada uma das seguintes concentrações de DNA padrão 9948 (Promega) – 1.000, 750, 500, 300, 250, 200, 150 e 100pg/ μ L – foi amplificado segundo o procedimento acima descrito (secção 3.2). Para cada concentração realizaram-se duas réplicas. As amplificações foram acompanhadas de respectivos controlos negativos (água estéril).

A análise dos fragmentos foi realizada de acordo com o descrito na secção 3.3.

6. Análise de misturas

Com o propósito de testar a eficiência dos *quadriplexes* na tipagem de DNA masculino na presença de um grande *background* feminino – o que representa a realidade de muitas amostras de agressões sexuais –, foram realizadas amplificações com *input* simultâneo destes dois tipos de DNA, em diferentes proporções.

As reacções continham 1ng de DNA masculino (DNA controlo 9948 (Promega)) e 1, 10, 100 ou 500ng de DNA feminino (DNA controlo 9947A (Applied Biosystems)), representando as proporções masculino:feminino 1:1, 1:10, 1:100 e 1:500, respectivamente. A amplificação por PCR destas misturas e subsequente genotipagem foi, uma vez mais, realizada conforme o previamente descrito nas secções 3.2 e 3.3, respectivamente. As amplificações foram acompanhadas de respectivos controlos negativos (água estéril).

7. Aplicação a amostras forenses

Com o objectivo de se ter uma real noção das vantagens inerentes à utilização dos Y-miniSTR na prática laboratorial forense, foram analisadas diversas amostras pertencentes ao historial da casuística do Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Norte do INML, IP. Destas constavam 7 ossos; 4 amostras cujos haplótipos para os marcadores Y-STR constantes do kit comercial PowerPlex[®] Y System (Promega) eram iguais entre si duas a duas; e ainda uma amostra de criminalística cujos resultados obtidos na análise com os kits comumente usados no laboratório haviam sido pouco satisfatórios.

O DNA dos ossos, pertencentes a indivíduos do sexo masculino, havia sido previamente extraído pelo procedimento habitual do método orgânico fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico e permanecia guardado a -80°C. Esse DNA foi amplificado e os fragmentos resultantes analisados segundo os procedimentos previamente descritos nas secções 3.2 e 3.3, respectivamente.

Procedendo a uma revisão do historial de haplótipos Y-STR obtidos por recurso ao kit PowerPlex[®] Y System (Promega) neste laboratório, foi possível encontrar diversas amostras, de indivíduos aparentemente não aparentados, cujos perfis para os marcadores em estudo eram idênticos. Destas, foram escolhidas aleatoriamente quatro amostras, iguais entre si duas a duas (Re. = J. e N. = Ri.), e cujos haplótipos Y-STR para os marcadores presentes no kit são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Haplótipos Y-STR para os marcadores do kit PowerPlex® Y System (Promega) de 4 amostras da casuística do laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forense do INML, IP..

	DYS 391	DYS 389I	DYS 439	DYS 389II	DYS 438	DYS 437	DYS 19	DYS 392	DYS 393	DYS 390	DYS 385a/b
Re.	11	13	12	29	12	15	14	13	13	23	11,14
J.	11	13	12	29	12	15	14	13	13	23	11,14
N.	11	13	13	29	12	15	14	13	13	24	11,14
Ri.	11	13	13	29	12	15	14	13	13	24	11,14

O DNA destas amostras havia sido previamente extraído com Chelex e preservado a -80°C e foi, no âmbito do presente trabalho, analisado com os oito Y-miniSTR em estudo como anteriormente descrito nas secções 3.2 e 3.3.

Por último, uma amostra da casuística forense (criminalística) – “zaragatoa com extremidade de algodão manchada de substância de cor acastanhada” –, cuja pesquisa de sangue através da reacção de Médinger havia proporcionado um resultado positivo, e os resultados obtidos por recurso aos kits comumente usados no laboratório não havia produzido resultados muito satisfatórios, foi também analisada com ambos os *quadriplexes* em estudo segundo os procedimentos supra mencionados (secções 3.2 e 3.3).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudo da população do Norte de Portugal

No presente trabalho foram estudados oito miniSTR do cromossoma Y (não constantes de qualquer kit comercial) que, após optimização dos procedimentos de genotipagem, demonstraram ser úteis e eficientes ferramentas para aplicação na prática forense, como complemento das metodologias já bem estabelecidas.

As principais características dos oito Y-miniSTR estudados encontram-se resumidas na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo das principais características dos Y-miniSTR estudados.

Marcador (GenBank accession)	Localização cromossômica ^a	Motivo de repetição	Alelo de referência ^b	Intervalo alélico encontrado	Tamanho do fragmento Y-miniSTR (pb) ^c	Redução de tamanho (pb) ^d	DNA padrão 007 [66]	DNA padrão 9948
DYS504 (AC006157)	Yp11.31	TCCT	18	12-20	118	181	17	17
DYS508 (AC006462)	Yq11.221	TATC	11	8-15	117	67	11	11
DYS522 (AC007247)	Yp11.2	GATA	10	8-14	116	243	11	10
DYS540 (AC010135)	Yq11.221	TTAT	12	9-14	137	136	12	12
DYS556 (AC011745)	Yq11.222	AATA	11	11-13	99	119	11	11
DYS570 (AC012068)	Yp11.2	TTTC	17	14-24	127	136	17	18
DYS576 (AC010104)	Yp11.2	AAAG	17	14-22	116	82	19	16
DYS632 (AC006371)	-	CATT	9	6-9	99	59	9	9

a) Segundo Hanson e Ballantyne [26].

b) Alelo de referência refere-se ao número de repetições encontrado na sequência depositada no GenBank.

c) Obtido por PCR *In-Silico* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) recorrendo aos *primers* usados para amplificação dos Y-miniSTR; relativo ao alelo de referência.

d) Relativamente aos fragmentos obtidos por PCR *In-Silico* recorrendo aos *primers* descritos por Butler *et al.* [69] para os mesmos marcadores Y-STR.

Todos os marcadores apresentam motivos repetitivos simples e com unidades de repetição tetraméricas (4pb), estando a nomenclatura atribuída a cada *locus* de acordo com as normas da DNA Commission of International Society for Forensic Genetics (ISFG) [50].

Como foi anteriormente referido, os miniSTR são “versões reduzidas” dos *loci* STR, isto é, é possível analisar os mesmos polimorfismos mas, pelo facto de se recorrer a *primers* que hibridizam mais próximo da zona de repetição, obtêm-se produtos de PCR de menor tamanho. No estudo dos oito marcadores do cromossoma Y foram obtidos fragmentos que variaram entre 81 e 152pb, o que denota uma expressiva redução de tamanho relativamente aos fragmentos obtidos com os *primers* descritos inicialmente para estes marcadores Y-STR [69]. As reduções no tamanho dos fragmentos variaram entre 59 e 243pb, tendo sido esta última e mais significativa obtida para o *locus* DYS522 (Tabela 4). Esta redução no tamanho dos fragmentos de amplificação é bastante benéfica para a análise de amostras com DNA degradado, como tem sido descrito na bibliografia [7,12,14-21,70].

Na Figura 4 podem ver-se os electroforetogramas obtidos numa das amostras analisadas para os *quadriplexes* 1 (A) e 2 (B), respectivamente.

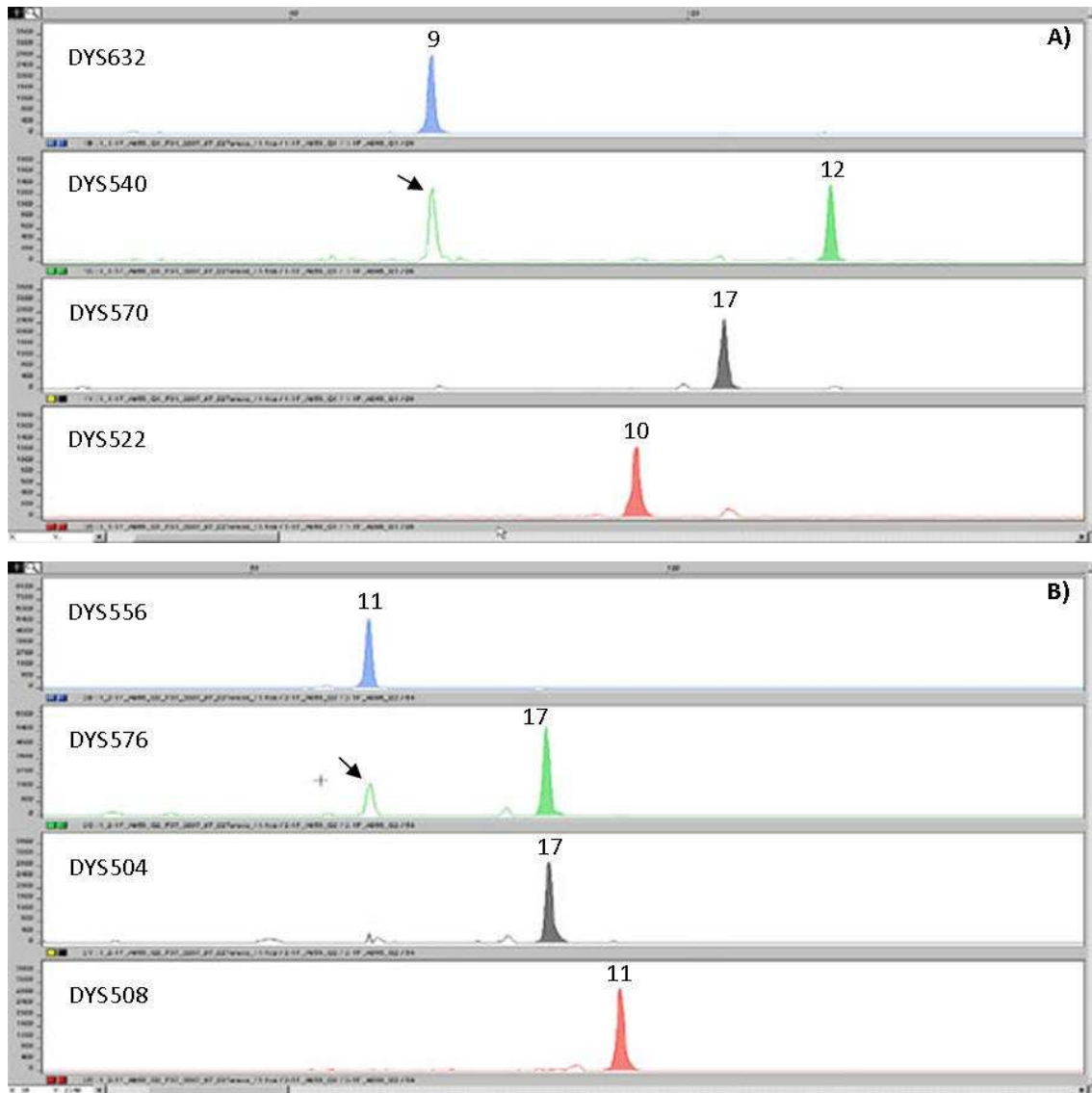


Figura 4. Exemplo dos electroforetogramas obtidos para uma das amostras analisadas. A) *quadruplex 1*; B) *quadruplex 2*; as setas indicam *pull-ups*.

Quando novos marcadores são introduzidos na rotina de um laboratório forense, é necessário proceder previamente à caracterização da respectiva população relativamente a esses marcadores. Neste estudo, os oito Y-miniSTR – divididos em dois *quadruplexes* – foram analisados numa amostra da população do sexo masculino do Norte de Portugal (N=272).

Todos os *loci* estudados são marcadores de cópia única e, como tal, todas as amostras analisadas exibiram um único pico para cada *locus*, há excepção de uma amostra que, para o marcador DYS576, revelou dois picos nas três réplicas de amplificação efectuada. Para confirmar se se trataria de uma duplicação do marcador

pretendia-se isolar os dois fragmentos em gel de poliacrilamida, sendo posteriormente excisados do gel e sequenciados [71]. Como tal não foi possível, a amostra em causa foi retirada da análise estatística por persistir a dúvida se se estava perante uma duplicação ou uma qualquer contaminação.

Os haplótipos obtidos para todas as amostras analisadas podem ser consultados no final do trabalho (Anexo 1).

Na Tabela 5 encontram-se as frequências alélicas obtidas para os oito Y-miniSTR estudados e respectivas diversidades génicas (DG).

Tabela 5. Frequências alélicas e diversidade génica para os 8 Y-miniSTR estudados na população do Norte de Portugal (N=272).

Alelo	DYS632	DYS540	DYS570	DYS522	DYS556	DYS576	DYS504	DYS508
6	0,00368							
8	0,38603			0,00368				0,00368
9	0,61029	0,00368		0,00735				0,00735
10		0,01471		0,50735				0,21691
11		0,25735		0,27573	0,67647			0,62500
12		0,65441		0,17647	0,30515		0,01471	0,11765
13		0,06250		0,02573	0,01838		0,03309	0,01103
14		0,00735	0,00368	0,00368		0,00368	0,05882	0,01103
15			0,01838			0,02941	0,12132	0,00735
16			0,08088			0,12500	0,20588	
17			0,43750			0,26103	0,46691	
18			0,22794			0,34559	0,08088	
19			0,08823			0,17647	0,01471	
20			0,05882			0,05147	0,00368	
21			0,02941			0,00368		
21.2			0,00368					
22			0,04779			0,00368		
24			0,00368					
NA	3	6	11	7	3	9	9	8
DG	0,4803	0,5032	0,7380	0,6370	0,4506	0,7649	0,7160	0,5501

NA: Número de alelos; DG: Diversidade génica

Nos oito Y-miniSTR estudados o número de alelos encontrados variou entre 3 e 11, e as respectivas frequências alélicas apresentaram, em todos os *loci*, uma distribuição unimodal. Os valores de diversidade génica (que equivale à heterozigotia esperada nos marcadores autossómicos [72]) variaram entre 0,4506 (DYS556) e 0,7649 (DYS576) (Tabela 5), com uma média de 0,6050. Estes valores não diferem muito

daqueles que foram reportados por Gusmão *et al.* [73] para os marcadores constituintes do haplótipo mínimo, numa amostra da população do Norte de Portugal (N=212) (Tabela 6).

Tabela 6. Diversidades génicas (DG) obtidas para os loci do haplótipo mínimo [73].

Locus	DYS 385a/b	DYS 389II	DYS 390	DYS 389I	DYS 392	DYS 19	DYS 391	DYS 393	Valor médio
DG	0,8358	0,5838	0,5838	0,5780	0,5757	0,5642	0,5630	0,4673	0,5939

Em média, os valores de diversidade génica para o *quadriplex* 2 foram ligeiramente superiores aos do Q1 (0,6204 e 0,5896, respectivamente). Se se considerar um hipotético *quadriplex* com os loci que registaram valores de DG mais elevados (DYS576, DHS570, DHS504 e DHS522) obtém-se uma diversidade génica média de 0,7140.

Uma vez que o cromossoma Y não goza da presença de um cromossoma homólogo e, como tal, é herdado em bloco, torna-se mais informativa a análise dos resultados sob a forma de um haplótipo do que dos diversos marcadores individualmente.

As Tabelas 7 e 8 apresentam os haplótipos e respectivas frequências haplotípicas obtidos para os *quadriplexes* 1 e 2, respectivamente.

Tabela 7. Haplótipos e frequências haplotípicas para o *quadriplex* 1 (N=272).

Haplótipo	DYS632	DYS540	DYS570	DYS522	n	Frequência haplotípica
Q1h001	6	11	19	12	1	0,0036765
Q1h002	8	9	15	12	1	0,0036765
Q1h003	8	10	17	12	1	0,0036765
Q1h004	8	10	18	11	1	0,0036765
Q1h005	8	10	18	12	1	0,0036765
Q1h006	8	10	19	12	1	0,0036765
Q1h007	8	11	15	11	1	0,0036765
Q1h008	8	11	16	12	2	0,0073529
Q1h009	8	11	17	11	5	0,0183823
Q1h010	8	11	17	12	2	0,0073529
Q1h011	8	11	18	11	7	0,0257353
Q1h012	8	11	18	12	5	0,0183823
Q1h013	8	11	19	11	2	0,0073529

Continua

Tabela 7. (continuação)

Q1h014	8	11	19	12	4	0,0147059
Q1h015	8	11	20	11	2	0,0073529
Q1h016	8	11	20	12	6	0,0220588
Q1h017	8	11	20	13	3	0,0110294
Q1h018	8	11	21	11	4	0,0147059
Q1h019	8	11	21	12	3	0,0110294
Q1h020	8	11	22	11	1	0,0036765
Q1h021	8	11	22	12	9	0,0330882
Q1h022	8	11	22	13	2	0,0073529
Q1h023	8	11	24	12	1	0,0036765
Q1h024	8	12	15	11	1	0,0036765
Q1h025	8	12	16	10	1	0,0036765
Q1h026	8	12	16	11	1	0,0036765
Q1h027	8	12	16	12	1	0,0036765
Q1h028	8	12	17	10	1	0,0036765
Q1h029	8	12	17	11	5	0,0183823
Q1h030	8	12	17	12	3	0,0110294
Q1h031	8	12	17	13	2	0,0073529
Q1h032	8	12	18	11	3	0,0110294
Q1h033	8	12	18	12	2	0,0073529
Q1h034	8	12	18	14	1	0,0036765
Q1h035	8	12	19	11	5	0,0183823
Q1h036	8	12	19	12	1	0,0036765
Q1h037	8	12	20	11	1	0,0036765
Q1h038	8	12	21	11	1	0,0036765
Q1h039	8	12	21.2	12	1	0,0036765
Q1h040	8	12	22	11	1	0,0036765
Q1h041	8	13	17	11	5	0,0183823
Q1h042	8	13	18	11	2	0,0073529
Q1h043	8	13	19	11	2	0,0073529
Q1h044	8	14	17	12	1	0,0036765
Q1h045	9	11	16	10	1	0,0036765
Q1h046	9	11	17	10	6	0,0220588
Q1h047	9	11	18	10	1	0,0036765
Q1h048	9	11	18	11	2	0,0073529
Q1h049	9	12	14	10	1	0,0036765
Q1h050	9	12	15	10	2	0,0073529
Q1h051	9	12	16	10	12	0,0441177
Q1h052	9	12	16	11	1	0,0036765
Q1h053	9	12	17	9	1	0,0036765
Q1h054	9	12	17	10	68	0,2500000
Q1h055	9	12	17	11	15	0,0551471
Q1h056	9	12	17	12	2	0,0073529
Q1h057	9	12	18	9	1	0,0036765
Q1h058	9	12	18	10	27	0,0992647
Q1h059	9	12	18	11	5	0,0183823
Q1h060	9	12	19	10	7	0,0257353
Q1h061	9	12	19	11	1	0,0036765
Q1h062	9	12	20	10	3	0,0110294
Q1h063	9	12	20	11	1	0,0036765

Continua

Tabela 7. (continuação)

Q1h064	9	13	16	10	3	0,0110294
Q1h065	9	13	17	8	1	0,0036765
Q1h066	9	13	17	10	1	0,0036765
Q1h067	9	13	18	10	3	0,0110294
Q1h068	9	14	18	10	1	0,0036765
					272	1

Tabela 8. Haplótipos e frequências haplotípicas para o *quadriplex 2* (N=272).

Haplótipo	DYS556	DYS576	DYS504	DYS508	n	Frequência haplotípica
Q2h001	11	15	17	10	1	0,0036765
Q2h002	11	15	18	11	1	0,0036765
Q2h003	11	16	14	11	1	0,0036765
Q2h004	11	16	14	12	1	0,0036765
Q2h005	11	16	15	10	1	0,0036765
Q2h006	11	16	15	11	2	0,0073529
Q2h007	11	16	16	10	1	0,0036765
Q2h008	11	16	16	11	3	0,0110294
Q2h009	11	16	17	10	2	0,0073529
Q2h010	11	16	17	11	2	0,0073529
Q2h011	11	16	17	12	1	0,0036765
Q2h012	11	16	17	13	1	0,0036765
Q2h013	11	16	18	10	2	0,0073529
Q2h014	11	16	19	11	1	0,0036765
Q2h015	11	16	20	11	1	0,0036765
Q2h016	11	17	12	11	1	0,0036765
Q2h017	11	17	15	11	1	0,0036765
Q2h018	11	17	15	12	1	0,0036765
Q2h019	11	17	16	10	2	0,0073529
Q2h020	11	17	16	11	8	0,0294118
Q2h021	11	17	17	10	3	0,0110294
Q2h022	11	17	17	11	23	0,0845588
Q2h023	11	17	17	12	2	0,0073529
Q2h024	11	17	18	11	4	0,0147059
Q2h025	11	17	19	11	1	0,0036765
Q2h026	11	18	13	11	1	0,0036765
Q2h027	11	18	14	11	1	0,0036765
Q2h028	11	18	14	12	1	0,0036765
Q2h029	11	18	15	10	1	0,0036765
Q2h030	11	18	15	11	2	0,0073529
Q2h031	11	18	16	11	18	0,0661765
Q2h032	11	18	16	12	2	0,0073529
Q2h033	11	18	17	8	1	0,0036765
Q2h034	11	18	17	10	2	0,0073529
Q2h035	11	18	17	11	30	0,1102941
Q2h036	11	18	17	12	5	0,0183823
Q2h037	11	18	17	14	1	0,0036765

Continua

Tabela 8. (continuação)

Q2h038	11	18	18	10	3	0,0110294
Q2h039	11	18	18	11	5	0,0183823
Q2h040	11	18	18	14	1	0,0036765
Q2h041	11	19	12	11	1	0,0036765
Q2h042	11	19	14	12	1	0,0036765
Q2h043	11	19	15	11	1	0,0036765
Q2h044	11	19	16	11	4	0,0147059
Q2h045	11	19	16	12	1	0,0036765
Q2h046	11	19	17	10	3	0,0110294
Q2h047	11	19	17	11	17	0,0625000
Q2h048	11	19	17	12	1	0,0036765
Q2h049	11	19	18	11	2	0,0073529
Q2h050	11	19	19	10	1	0,0036765
Q2h051	11	20	16	10	1	0,0036765
Q2h052	11	20	16	11	1	0,0036765
Q2h053	11	20	16	12	1	0,0036765
Q2h054	11	20	17	11	5	0,0183823
Q2h055	11	20	17	12	1	0,0036765
Q2h056	11	20	18	11	1	0,0036765
Q2h057	11	22	17	11	1	0,0036765
Q2h058	12	14	16	10	1	0,0036765
Q2h059	12	15	13	15	1	0,0036765
Q2h060	12	15	17	10	2	0,0073529
Q2h061	12	15	17	12	2	0,0073529
Q2h062	12	15	19	10	1	0,0036765
Q2h063	12	16	15	10	2	0,0073529
Q2h064	12	16	15	11	3	0,0110294
Q2h065	12	16	16	10	3	0,0110294
Q2h066	12	16	17	10	3	0,0110294
Q2h067	12	16	18	10	2	0,0073529
Q2h068	12	17	12	12	1	0,0036765
Q2h069	12	17	13	11	1	0,0036765
Q2h070	12	17	13	12	3	0,0110294
Q2h071	12	17	13	13	1	0,0036765
Q2h072	12	17	14	10	1	0,0036765
Q2h073	12	17	14	11	1	0,0036765
Q2h074	12	17	14	12	1	0,0036765
Q2h075	12	17	15	10	2	0,0073529
Q2h076	12	17	15	11	2	0,0073529
Q2h077	12	17	15	12	1	0,0036765
Q2h078	12	17	16	10	2	0,0073529
Q2h079	12	17	17	10	3	0,0110294
Q2h080	12	17	17	11	5	0,0183823
Q2h081	12	17	18	11	1	0,0036765
Q2h082	12	18	12	15	1	0,0036765
Q2h083	12	18	13	12	1	0,0036765
Q2h084	12	18	14	10	1	0,0036765
Q2h085	12	18	14	12	1	0,0036765
Q2h086	12	18	15	10	3	0,0110294
Q2h087	12	18	15	11	1	0,0036765

Continua

Tabela 8. (continuação)

Q2h088	12	18	16	9	1	0,0036765
Q2h089	12	18	16	10	2	0,0073529
Q2h090	12	18	16	11	1	0,0036765
Q2h091	12	18	16	13	1	0,0036765
Q2h092	12	18	17	10	1	0,0036765
Q2h093	12	18	17	11	4	0,0147059
Q2h094	12	19	13	14	1	0,0036765
Q2h095	12	19	14	11	2	0,0073529
Q2h096	12	19	14	12	1	0,0036765
Q2h097	12	19	15	10	4	0,0147059
Q2h098	12	19	15	11	3	0,0110294
Q2h099	12	19	15	12	1	0,0036765
Q2h100	12	19	17	11	4	0,0147059
Q2h101	12	20	15	12	1	0,0036765
Q2h102	12	20	16	10	1	0,0036765
Q2h103	12	20	16	11	1	0,0036765
Q2h104	12	20	17	11	1	0,0036765
Q2h105	13	16	14	10	1	0,0036765
Q2h106	13	16	15	12	1	0,0036765
Q2h107	13	18	14	10	1	0,0036765
Q2h108	13	18	14	11	1	0,0036765
Q2h109	13	21	16	9	1	0,0036765
				272	1	

Para o *quadriplex* 1 foram obtidos 68 haplótipos diferentes, revelando assim uma capacidade de discriminação (número de haplótipos/tamanho da amostra) de 25% (Tabela 7). Por sua vez o *quadriplex* 2 apresentou uma capacidade de discriminação superior – 40% – dado que foram observados 109 haplótipos distintos em 272 indivíduos analisados (Tabela 8).

O haplótipo mais frequente no Q1 – 9-12-17-10 para DYS632, DYS540, DYS570 e DYS522, respectivamente – foi observado em 68 indivíduos (25% da população estudada) (Tabela 7), enquanto que no Q2 o haplótipo mais frequente surgiu 30 vezes (11% da população) e era constituído pelos alelos 11-18-17-11 para os *loci* DYS556, DYS576, DYS504 e DYS508, respectivamente (Tabela 8).

Se ambos os *quadriplexes* forem analisados em conjunto, constituindo-se haplótipos com os oito *loci* Y-miniSTR estudados, numa amostra de 272 indivíduos obtêm-se 195 haplótipos distintos (Tabela 9), o que se traduz numa capacidade de discriminação de aproximadamente 72%. Uma vez mais, o valor obtido para os Y-miniSTR é equiparável aos 74% de capacidade de discriminação obtidos para os *loci*

do haplótipo mínimo numa amostra da população do Norte de Portugal (157 haplótipos / 212 indivíduos) [73].

Oitenta e seis por cento (167/195) dos haplótipos foram observados uma única vez na análise dos 272 indivíduos, seguindo-se 14 haplótipos (7%) partilhados por dois indivíduos cada e 2 haplótipos (1%) observados em três indivíduos cada um. Surgiram ainda 5 haplótipos partilhados por quatro indivíduos cada, 2 haplótipos partilhados por cinco indivíduos e outros dois idênticos em 6 dos homens analisados. Registaram-se ainda oito indivíduos que apresentavam um mesmo haplótipo. Por último, os dois haplótipos mais comuns foram observados 11 (H141) e 10 (H127) vezes, o que representa 4 e 3,7% da amostra populacional estudada, respectivamente (Tabela 9). Estes haplótipos diferem apenas num único alelo, correspondente ao *locus* DYS576 (alelo 19 no H141 e alelo 17 no H127). Nos restantes marcadores apresentam os seguintes alelos: 9 para DYS632, 12 para DYS540, 17 para DYS570, 10 para DYS522, 11 para DYS556, 17 para DYS504 e 11 para DYS508, que são precisamente os alelos mais frequentes de cada um dos *loci*.

Tabela 9. Haplótipos e frequências haplotípicas para os 8 Y-miniSTR estudados na população do Norte de Portugal (N=272).

Haplótipo	DYS 632	DYS 540	DYS 570	DYS 522	DYS 556	DYS 576	DYS 504	DYS 508	n	Frequência haplotípica
H001	6	11	19	12	12	17	17	11	1	0,0036765
H002	8	9	15	12	12	16	16	10	1	0,0036765
H003	8	10	17	12	11	16	17	11	1	0,0036765
H004	8	10	18	11	11	16	18	10	1	0,0036765
H005	8	10	18	12	12	18	17	11	1	0,0036765
H006	8	10	19	12	12	17	13	13	1	0,0036765
H007	8	11	15	11	11	16	16	11	1	0,0036765
H008	8	11	16	12	12	16	15	10	1	0,0036765
H009	8	11	16	12	12	18	16	9	1	0,0036765
H010	8	11	17	11	11	18	16	12	1	0,0036765
H011	8	11	17	11	11	19	14	12	1	0,0036765
H012	8	11	17	11	11	19	19	10	1	0,0036765
H013	8	11	17	11	12	17	14	10	1	0,0036765
H014	8	11	17	11	12	19	15	10	1	0,0036765
H015	8	11	17	12	11	17	15	11	1	0,0036765
H016	8	11	17	12	12	18	13	12	1	0,0036765
H017	8	11	18	11	11	15	17	10	1	0,0036765
H018	8	11	18	11	11	16	15	10	1	0,0036765
H019	8	11	18	11	11	16	17	10	1	0,0036765
H020	8	11	18	11	11	17	17	10	2	0,0073529

Continua

Tabela 9. (continuação)

H021	8	11	18	11	11	18	15	10	1	0,0036765
H022	8	11	18	11	12	16	17	10	1	0,0036765
H023	8	11	18	12	11	16	16	11	1	0,0036765
H024	8	11	18	12	11	17	16	10	1	0,0036765
H025	8	11	18	12	11	18	18	10	1	0,0036765
H026	8	11	18	12	12	18	14	12	1	0,0036765
H027	8	11	18	12	13	16	15	12	1	0,0036765
H028	8	11	19	11	11	18	17	11	1	0,0036765
H029	8	11	19	11	12	19	14	11	1	0,0036765
H030	8	11	19	12	11	16	14	11	1	0,0036765
H031	8	11	19	12	11	20	16	10	1	0,0036765
H032	8	11	19	12	12	18	16	13	1	0,0036765
H033	8	11	19	12	12	19	13	14	1	0,0036765
H034	8	11	20	11	11	18	14	11	1	0,0036765
H035	8	11	20	11	12	17	13	11	1	0,0036765
H036	8	11	20	12	11	18	16	12	1	0,0036765
H037	8	11	20	12	11	18	18	14	1	0,0036765
H038	8	11	20	12	12	17	13	12	2	0,0073529
H039	8	11	20	12	12	19	14	12	1	0,0036765
H040	8	11	20	12	12	19	15	12	1	0,0036765
H041	8	11	20	13	11	17	12	11	1	0,0036765
H042	8	11	20	13	11	18	16	11	1	0,0036765
H043	8	11	20	13	12	17	13	12	1	0,0036765
H044	8	11	21	11	11	17	16	10	1	0,0036765
H045	8	11	21	11	12	17	14	11	1	0,0036765
H046	8	11	21	11	12	17	15	12	1	0,0036765
H047	8	11	21	11	12	19	14	11	1	0,0036765
H048	8	11	21	12	11	18	15	11	1	0,0036765
H049	8	11	21	12	12	17	14	12	1	0,0036765
H050	8	11	21	12	12	18	15	10	1	0,0036765
H051	8	11	22	11	11	16	16	10	1	0,0036765
H052	8	11	22	12	11	16	15	11	2	0,0073529
H053	8	11	22	12	12	17	15	10	2	0,0073529
H054	8	11	22	12	12	17	15	11	1	0,0036765
H055	8	11	22	12	12	18	15	10	1	0,0036765
H056	8	11	22	12	12	19	15	10	3	0,0110294
H057	8	11	22	13	12	18	15	10	1	0,0036765
H058	8	11	22	13	12	18	16	10	1	0,0036765
H059	8	11	24	12	12	17	15	11	1	0,0036765
H060	8	12	15	11	13	21	16	9	1	0,0036765
H061	8	12	16	10	11	17	18	11	1	0,0036765
H062	8	12	16	11	11	16	18	10	1	0,0036765
H063	8	12	16	12	13	16	14	10	1	0,0036765
H064	8	12	17	10	11	16	14	12	1	0,0036765
H065	8	12	17	11	11	17	15	12	1	0,0036765
H066	8	12	17	11	12	15	17	10	1	0,0036765
H067	8	12	17	11	12	15	19	10	1	0,0036765
H068	8	12	17	11	12	17	16	10	1	0,0036765
H069	8	12	17	11	12	18	16	10	1	0,0036765
H070	8	12	17	12	12	16	15	10	1	0,0036765

Continua

Tabela 9. (continuação)

H071	8	12	17	12	12	17	17	10	1	0,0036765
H072	8	12	17	12	12	19	15	11	1	0,0036765
H073	8	12	17	13	12	16	16	10	1	0,0036765
H074	8	12	17	13	12	19	15	11	1	0,0036765
H075	8	12	18	11	11	16	17	10	1	0,0036765
H076	8	12	18	11	12	16	17	10	1	0,0036765
H077	8	12	18	11	12	18	17	10	1	0,0036765
H078	8	12	18	12	12	18	12	15	1	0,0036765
H079	8	12	18	12	12	19	15	11	1	0,0036765
H080	8	12	18	14	12	20	15	12	1	0,0036765
H081	8	12	19	11	12	14	16	10	1	0,0036765
H082	8	12	19	11	12	15	13	15	1	0,0036765
H083	8	12	19	11	12	15	17	10	1	0,0036765
H084	8	12	19	11	12	16	16	10	1	0,0036765
H085	8	12	19	11	12	17	17	10	1	0,0036765
H086	8	12	19	12	12	17	12	12	1	0,0036765
H087	8	12	20	11	12	16	18	10	1	0,0036765
H088	8	12	21	11	12	17	17	10	1	0,0036765
H089	8	12	21.2	12	11	17	16	11	1	0,0036765
H090	8	12	22	11	12	16	18	10	1	0,0036765
H091	8	13	17	11	12	15	17	12	2	0,0073529
H092	8	13	17	11	12	16	15	11	1	0,0036765
H093	8	13	17	11	12	16	17	10	1	0,0036765
H094	8	13	17	11	12	17	16	10	1	0,0036765
H095	8	13	18	11	12	16	15	11	1	0,0036765
H096	8	13	18	11	13	18	14	10	1	0,0036765
H097	8	13	19	11	12	16	15	11	1	0,0036765
H098	8	13	19	11	12	20	16	10	1	0,0036765
H099	8	14	17	12	12	18	14	10	1	0,0036765
H100	9	11	16	10	11	18	16	11	1	0,0036765
H101	9	11	17	10	11	17	17	11	1	0,0036765
H102	9	11	17	10	11	17	17	12	1	0,0036765
H103	9	11	17	10	11	18	16	11	1	0,0036765
H104	9	11	17	10	12	19	17	11	2	0,0073529
H105	9	11	17	10	12	20	16	11	1	0,0036765
H106	9	11	18	10	11	17	17	10	1	0,0036765
H107	9	11	18	11	11	18	18	11	1	0,0036765
H108	9	11	18	11	12	17	17	11	1	0,0036765
H109	9	12	14	10	11	17	17	11	1	0,0036765
H110	9	12	15	10	11	17	17	12	1	0,0036765
H111	9	12	15	10	11	19	16	12	1	0,0036765
H112	9	12	16	10	11	17	17	11	1	0,0036765
H113	9	12	16	10	11	18	16	11	1	0,0036765
H114	9	12	16	10	11	18	17	11	4	0,0147059
H115	9	12	16	10	11	19	16	11	1	0,0036765
H116	9	12	16	10	11	20	16	12	1	0,0036765
H117	9	12	16	10	11	20	17	11	2	0,0073529
H118	9	12	16	10	12	17	17	11	1	0,0036765
H119	9	12	16	10	12	18	17	11	1	0,0036765
H120	9	12	16	11	11	17	17	11	1	0,0036765

Continua

Tabela 9. (continuação)

H121	9	12	17	9	11	18	14	12	1	0,0036765
H122	9	12	17	10	11	15	18	11	1	0,0036765
H123	9	12	17	10	11	16	16	11	1	0,0036765
H124	9	12	17	10	11	16	17	11	1	0,0036765
H125	9	12	17	10	11	16	19	11	1	0,0036765
H126	9	12	17	10	11	17	16	11	3	0,0110294
H127	9	12	17	10	11	17	17	11	10	0,0367647
H128	9	12	17	10	11	17	18	11	2	0,0073529
H129	9	12	17	10	11	17	19	11	1	0,0036765
H130	9	12	17	10	11	18	13	11	1	0,0036765
H131	9	12	17	10	11	18	16	11	5	0,0183823
H132	9	12	17	10	11	18	17	10	1	0,0036765
H133	9	12	17	10	11	18	17	11	6	0,0220588
H134	9	12	17	10	11	18	17	12	4	0,0147059
H135	9	12	17	10	11	18	17	14	1	0,0036765
H136	9	12	17	10	11	18	18	10	1	0,0036765
H137	9	12	17	10	11	18	18	11	4	0,0147059
H138	9	12	17	10	11	19	12	11	1	0,0036765
H139	9	12	17	10	11	19	15	11	1	0,0036765
H140	9	12	17	10	11	19	17	10	1	0,0036765
H141	9	12	17	10	11	19	17	11	11	0,0404412
H142	9	12	17	10	11	19	17	12	1	0,0036765
H143	9	12	17	10	11	19	18	11	1	0,0036765
H144	9	12	17	10	11	20	17	11	2	0,0073529
H145	9	12	17	10	11	22	17	11	1	0,0036765
H146	9	12	17	10	12	17	17	11	2	0,0073529
H147	9	12	17	10	12	17	18	11	1	0,0036765
H148	9	12	17	10	12	18	16	11	1	0,0036765
H149	9	12	17	10	12	18	17	11	1	0,0036765
H150	9	12	17	10	12	20	17	11	1	0,0036765
H151	9	12	17	11	11	16	20	11	1	0,0036765
H152	9	12	17	11	11	17	16	11	1	0,0036765
H153	9	12	17	11	11	18	17	8	1	0,0036765
H154	9	12	17	11	11	18	17	11	6	0,0220588
H155	9	12	17	11	11	19	16	11	2	0,0073529
H156	9	12	17	11	11	19	17	11	2	0,0073529
H157	9	12	17	11	11	20	16	11	1	0,0036765
H158	9	12	17	11	12	18	17	11	1	0,0036765
H159	9	12	17	12	11	19	17	11	1	0,0036765
H160	9	12	17	12	11	20	17	12	1	0,0036765
H161	9	12	18	9	11	17	18	11	1	0,0036765
H162	9	12	18	10	11	16	17	12	1	0,0036765
H163	9	12	18	10	11	17	16	11	2	0,0073529
H164	9	12	18	10	11	17	17	11	4	0,0147059
H165	9	12	18	10	11	18	15	11	1	0,0036765
H166	9	12	18	10	11	18	16	11	5	0,0183823
H167	9	12	18	10	11	18	17	11	8	0,0294117
H168	9	12	18	10	11	18	17	12	1	0,0036765
H169	9	12	18	10	11	18	18	10	1	0,0036765
H170	9	12	18	10	11	19	16	11	1	0,0036765

Continua

Tabela 9. (continuação)

H171	9	12	18	10	11	19	17	11	1	0,0036765
H172	9	12	18	10	12	18	15	11	1	0,0036765
H173	9	12	18	10	12	19	17	11	1	0,0036765
H174	9	12	18	11	11	17	17	11	1	0,0036765
H175	9	12	18	11	11	18	17	11	1	0,0036765
H176	9	12	18	11	11	19	17	11	1	0,0036765
H177	9	12	18	11	11	19	18	11	1	0,0036765
H178	9	12	18	11	12	19	17	11	1	0,0036765
H179	9	12	19	10	11	17	17	11	1	0,0036765
H180	9	12	19	10	11	18	16	11	4	0,0147059
H181	9	12	19	10	11	19	17	11	1	0,0036765
H182	9	12	19	10	13	18	14	11	1	0,0036765
H183	9	12	19	11	11	18	17	11	1	0,0036765
H184	9	12	20	10	11	16	17	13	1	0,0036765
H185	9	12	20	10	11	17	16	11	1	0,0036765
H186	9	12	20	10	11	19	17	10	1	0,0036765
H187	9	12	20	11	11	20	18	11	1	0,0036765
H188	9	13	16	10	11	17	17	11	1	0,0036765
H189	9	13	16	10	11	18	17	11	2	0,0073529
H190	9	13	17	8	11	17	17	11	1	0,0036765
H191	9	13	17	10	11	17	17	11	1	0,0036765
H192	9	13	18	10	11	18	17	10	1	0,0036765
H193	9	13	18	10	11	19	17	10	1	0,0036765
H194	9	13	18	10	11	20	17	11	1	0,0036765
H195	9	14	18	10	11	18	17	11	1	0,0036765
									272	1

Em termos de diversidade haplotípica (DH) registaram-se valores de $0,9182 \pm 0,0085$ para o *quadriplex* 1 e $0,9694 \pm 0,0032$ para o *quadriplex* 2. Na análise global dos 8 Y-miniSTR o valor de DH ascende a $0,9938 \pm 0,0009$, sendo apenas ligeiramente superior ao valor de diversidade haplotípica obtido para os *loci* do haplótipo mínimo (0,9925) na população do Norte de Portugal [73].

Todos estes valores de diversidade, bem como os de capacidade de discriminação, inserem-se no intervalo previamente reportado por Kayser *et al.* [74] para populações Europeias.

Na análise de marcadores genéticos específicos do cromossoma Y a diversidade haplotípica é numericamente idêntica a dois parâmetros de interesse médico-legal comumente usados em genética forense: poder de discriminação (PD) [75] e probabilidade de exclusão *a priori* (Pex) [76]. Reciprocamente, a probabilidade de se obter um haplótipo idêntico em dois indivíduos não aparentados e escolhidos ao acaso

da população (probabilidade de *matching*) pode ser estimada como 1-DH. Isto significa que, no conjunto da população do Norte de Portugal, dois indivíduos não aparentados escolhidos ao acaso apresentarão, em média, o mesmo haplótipo para estes oito Y-miniSTR em apenas 0,6% dos casos.

2. Mutações

Um grande número de mutações em Y-STR tem sido referido [27,71,77], permitindo uma boa estimativa das taxas de mutação específicas destes marcadores. Contudo a informação disponível considera apenas um número limitado de *loci*, o que pode ser considerado insuficiente para inferir valores de taxas de mutação específicas para cada *locus*. Por este motivo a DNA Commission da International Society for Forensic Genetics, nas últimas recomendações para o uso de Y-STR na prática forense [50], reconheceu a importância de dilatar a informação disponível.

Para se avaliarem as taxas de mutação dos marcadores do cromossoma Y o método mais fiável é a análise directa de pares pai/filho com paternidade confirmada. No presente trabalho foram estudados 98 pares pai/filho cuja probabilidade de paternidade era superior a 99,9999%.

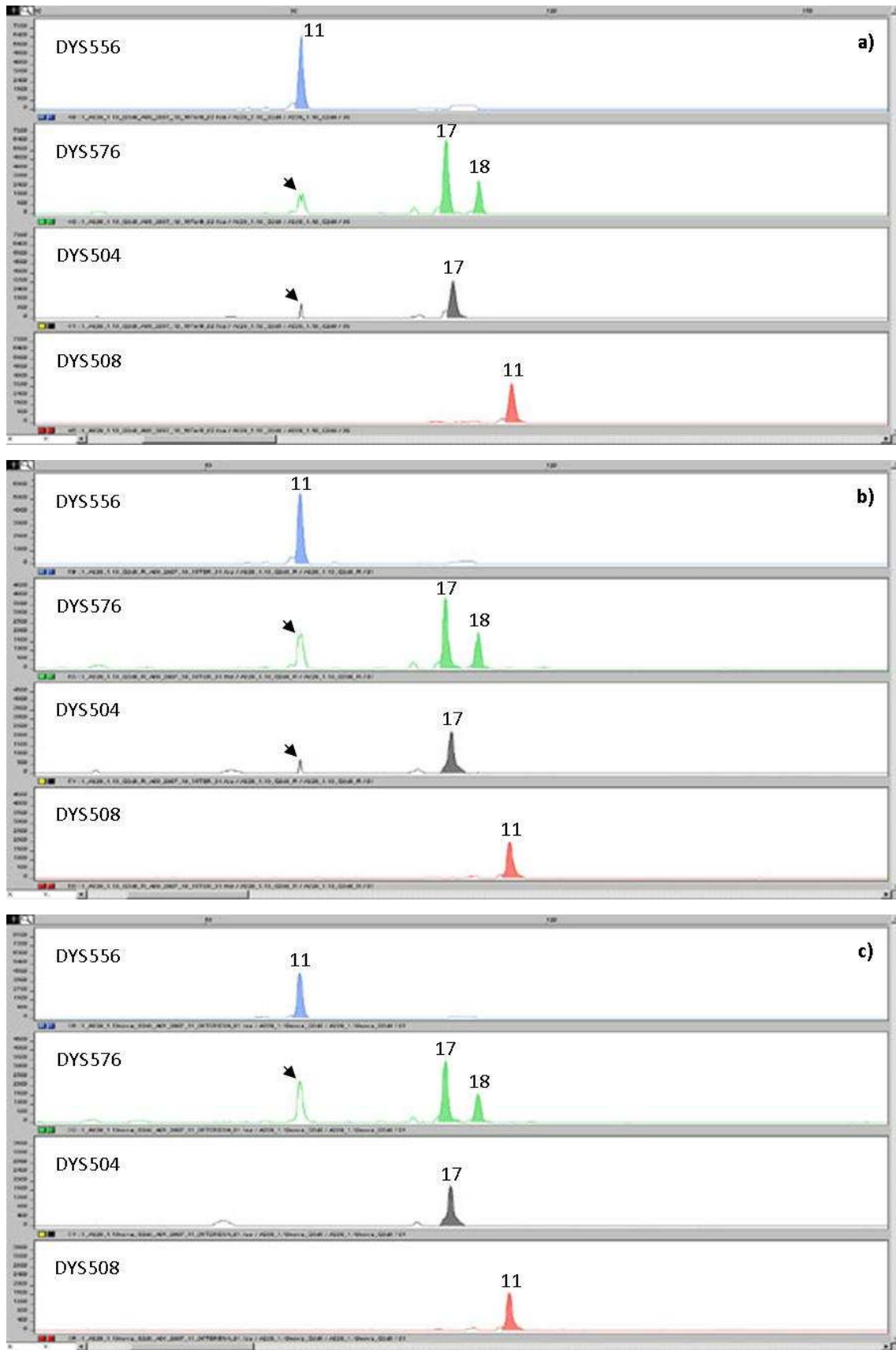
Face às taxas de mutação reportadas para marcadores do cromossoma Y [62,63] seria de esperar que se tivessem encontrado algumas divergências entre os alelos apresentados por pai e filho. No entanto, num total de 784 meioses analisadas não foi encontrada qualquer dissemelhança entre alelos, isto é, não foi detectada nenhuma mutação. Um dos motivos que poderá explicar este facto é o número relativamente baixo de transmissões alélicas estudado (quando comparado com os milhares que são geralmente utilizados).

Os pares pai/filho analisados, bem como os respectivos haplótipos, podem ser consultados no final do trabalho (Anexo 2).

Como foi previamente referido, aquando da análise das amostras para o estudo populacional, uma dessas amostras aparentou ostentar uma duplicação do *locus* DYS576. A Figura 5 (a-c) mostra os electroforetogramas obtidos nas três réplicas da

análise efectuadas para a referida amostra. Em todas elas se observam dois picos no painel verde do *quadriplex 2* (DYS576), correspondentes aos alelos 17 e 18. Como foi também supramencionado, não foi possível proceder à separação dos fragmentos e posterior genotipagem e/ou sequenciação, em separado, para confirmar que se trataria de uma duplicação do marcador. Todavia, e atendendo ao facto de mais nenhum *locus* apresentar mais do que um pico, a hipótese de contaminação poderá ser descartada com um certo grau de segurança.

Quando, numa fase posterior, se procedeu ao estudo de pares pai/filho, com o objectivo de determinar taxas de mutação para os oito Y-miniSTR, constatou-se que o filho deste indivíduo não apresentava essa duplicação, exibindo apenas um pico para o marcador *DYS576*, correspondente ao alelo 17 (Figura 5 d).



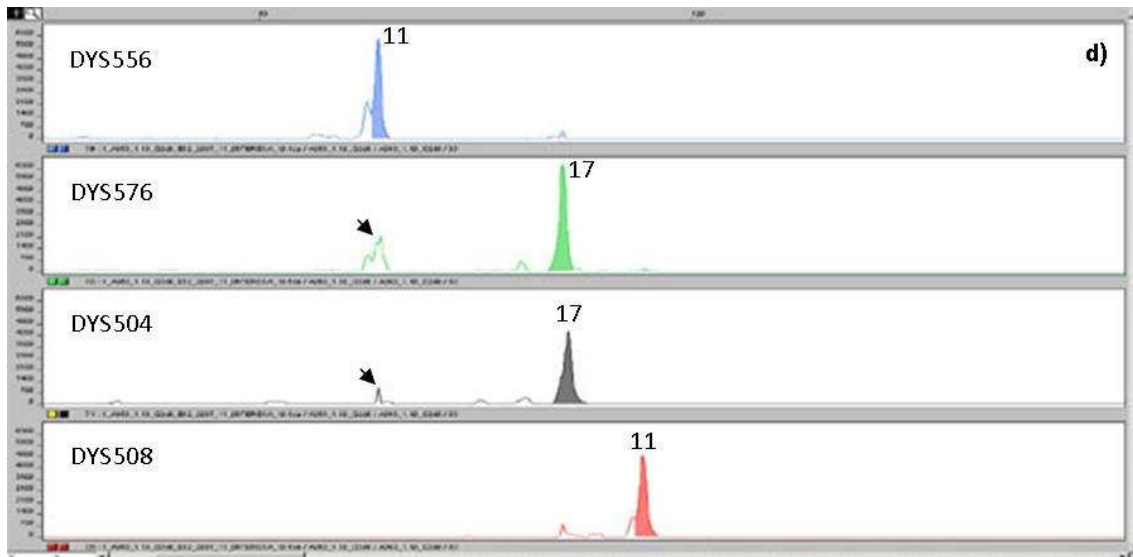


Figura 5. a - c) Electroforetogramas obtidos nas três réplicas da análise com o *quadriplex 2* efectuadas para a amostra A229 que, aparentemente, apresenta uma duplicação no *locus* DYS576; d) electroforetograma obtido na análise da amostra A363 (filho do indivíduo A229), o qual não aparenta possuir essa duplicação. As setas assinalam *pull-ups*.

Este facto coloca-nos perante uma possível mutação que, no entanto, teria de ser confirmada antes de ser reportada como tal. Para isso seria necessário proceder à já mencionada confirmação da ocorrência da duplicação por separação e posterior análise dos fragmentos, e, caso fosse possível, analisar com mais pormenor a linhagem paterna à qual estes indivíduos pertencem, através da análise dos perfis genéticos para os oito Y-miniSTR de familiares do sexo masculino dessa linhagem – como, por exemplo, pai, irmãos e outros filhos do indivíduo que aparentemente possui a duplicação.

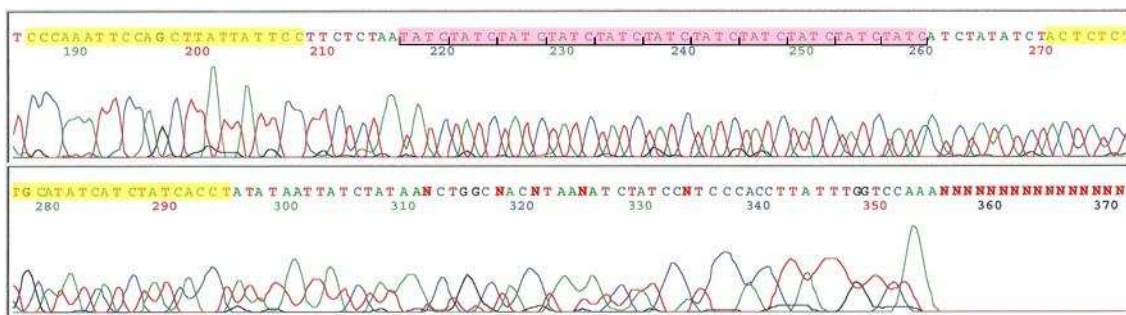
3. Sequenciação

Os *primers* e metodologias utilizados para sequenciar os Y-miniSTR revelaram-se eficientes, excepto para o *locus* DYS504. Apesar de terem sido feitas diversas tentativas, variando alguns parâmetros (como temperatura de *annealing* e concentração dos *primers*), não foi possível sequenciar eficazmente este marcador em nenhuma amostra. Para os restantes marcadores foram obtidos resultados satisfatórios.

Com o objectivo de confirmar o rigor da atribuição alélica realizada, vários alelos de cada *locus* foram sequenciados e o número de unidades de repetição presentes contado na sequência obtida. Todas as amostras revelaram um número de repetições igual à atribuição alélica que lhes havia sido feita.

Da mesma forma também o DNA padrão 9948 (Promega) foi sequenciado para todos os marcadores – para assegurar que o haplótipo obtido era o correcto (Tabela 4) – uma vez que, tanto quanto sabemos, até à data o seu haplótipo para os oito *loci* em estudo não se encontra publicado. Uma vez mais o número de repetições encontrado nas sequências coincidiu com a designação alélica atribuída (Figura 6 como exemplo).

A) Sequência “forward”



B) Sequência “reverse”

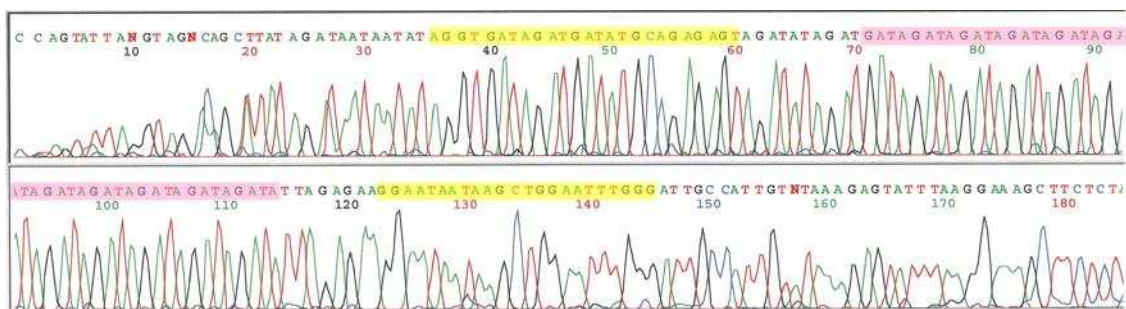


Figura 6. Electroforetogramas obtidos para as sequências das cadeias “forward” (A) e “reverse” (B) do DNA padrão 9948 (Promega). Sombreado a cor-de-rosa encontra-se a zona repetitiva que, na sequência “forward” (A), apresenta as 11 unidades de repetição individualizadas; a zona de ligação dos *primers* de amplificação encontra-se sombreada a amarelo.

Por fim, foram também sequenciadas todas as amostras que aparentemente apresentavam interalelos ou unidades de repetição incompletas. Ou seja, todas aquelas cujos fragmentos apresentavam um tamanho (em pares de bases) fora da escala alélica utilizada, foram sequenciadas para confirmar o número de repetições e

possível presença de anomalias na sequência, de acordo com as directivas da ISFG para a tipagem de STR do cromossoma Y [50].

Num total de 24 amostras que aparentavam ostentar um interalelo (19 amostras para o *locus* DYS570 e 5 para o DYS576), a presença de unidades de repetição incompletas confirmou-se apenas em 2 delas. Para o *locus* DYS570 as amostras A027 e A308 (pai e filho, respectivamente) apresentaram o alelo 21.2 com a seguinte composição: (TTTC)₁₄TT(TTTC)₇ (Figura 7).

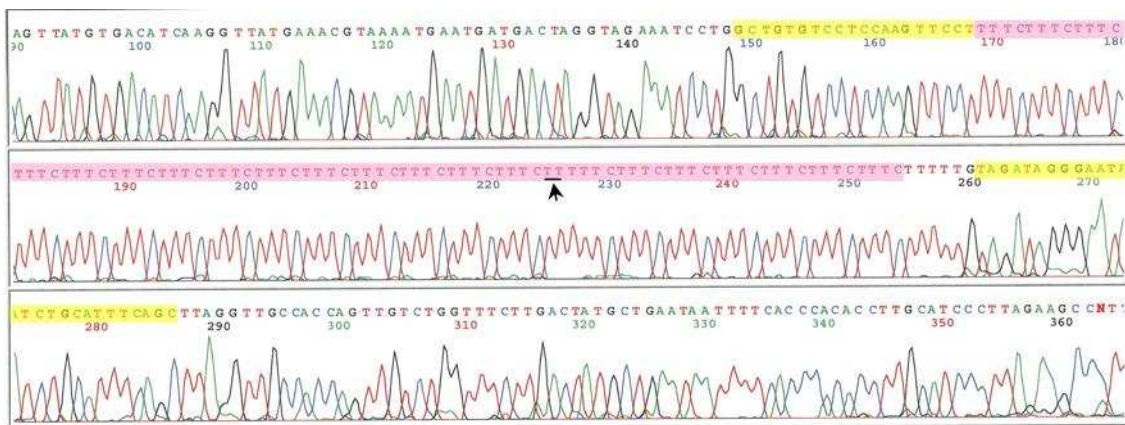


Figura 7. Electroforetograma obtido para a sequência da cadeia “forward” da amostra A027, no qual se vê a inserção de duas timinas entre as 14ª e a 15ª unidades de repetição (assinalada pela seta); sombreada a cor-de-rosa está a zona repetitiva do marcador e sombreadas a amarelo estão as zonas de ligação dos *primers* de amplificação.

Ao sequenciar o marcador DYS570 foi possível constatar que algumas amostras apresentavam uma microvariação na sexta unidade de repetição: em vez de TTTC exibiam TCTC. Das 23 amostras sequenciadas para este marcador (incluindo DNA padrão 9948 (Promega) e amostras para confirmação da atribuição alélica) 13 apresentaram uma citosina em vez de uma timina, na segunda base da sexta unidade de repetição (Figura 8).

estudo são específicos do cromossoma Y uma vez que não hibridizam em mais nenhuma região da molécula de DNA humano.

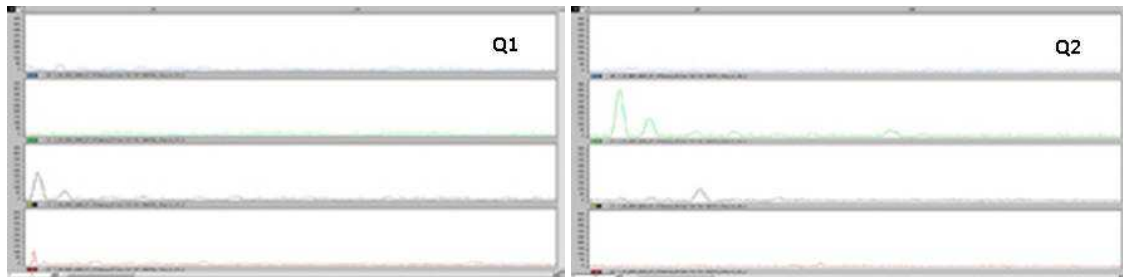


Figura 9. Electroforetogramas obtidos na análise de 10ng de DNA padrão feminino 9947A (Applied Biosystems). Todos os painéis têm o eixo dos yy com o intervalo 0-500 RFU. Os picos visíveis no painel verde da imagem do lado direito (DYS576) correspondem provavelmente a *dye-blobs* que em nada interferiram com a análise de amostras com DNA masculino.

5. Teste de sensibilidade

Com o intuito de determinar o limite de detecção dos *quadriplexes* foram genotipadas variadas quantidades de DNA padrão 9948 (Promega): 1.000, 750, 500, 300, 250, 150 e 100pg. Para todas foi obtido o haplótipo esperado, exibindo electroforetogramas cujos picos eram superiores ao limiar de detecção de 100 RFU em todos os alelos.

Mesmo na análise de 100pg de DNA – valor que está abaixo dos limites de sensibilidade recomendados pelos fabricantes de kits comerciais (que rondam os 250pg) e que é, por isso, susceptível de ser analisado pela técnica de LCN (Low Copy Number) [78] – o resultado obtido foi bastante satisfatório, como se pode confirmar na Figura 10.

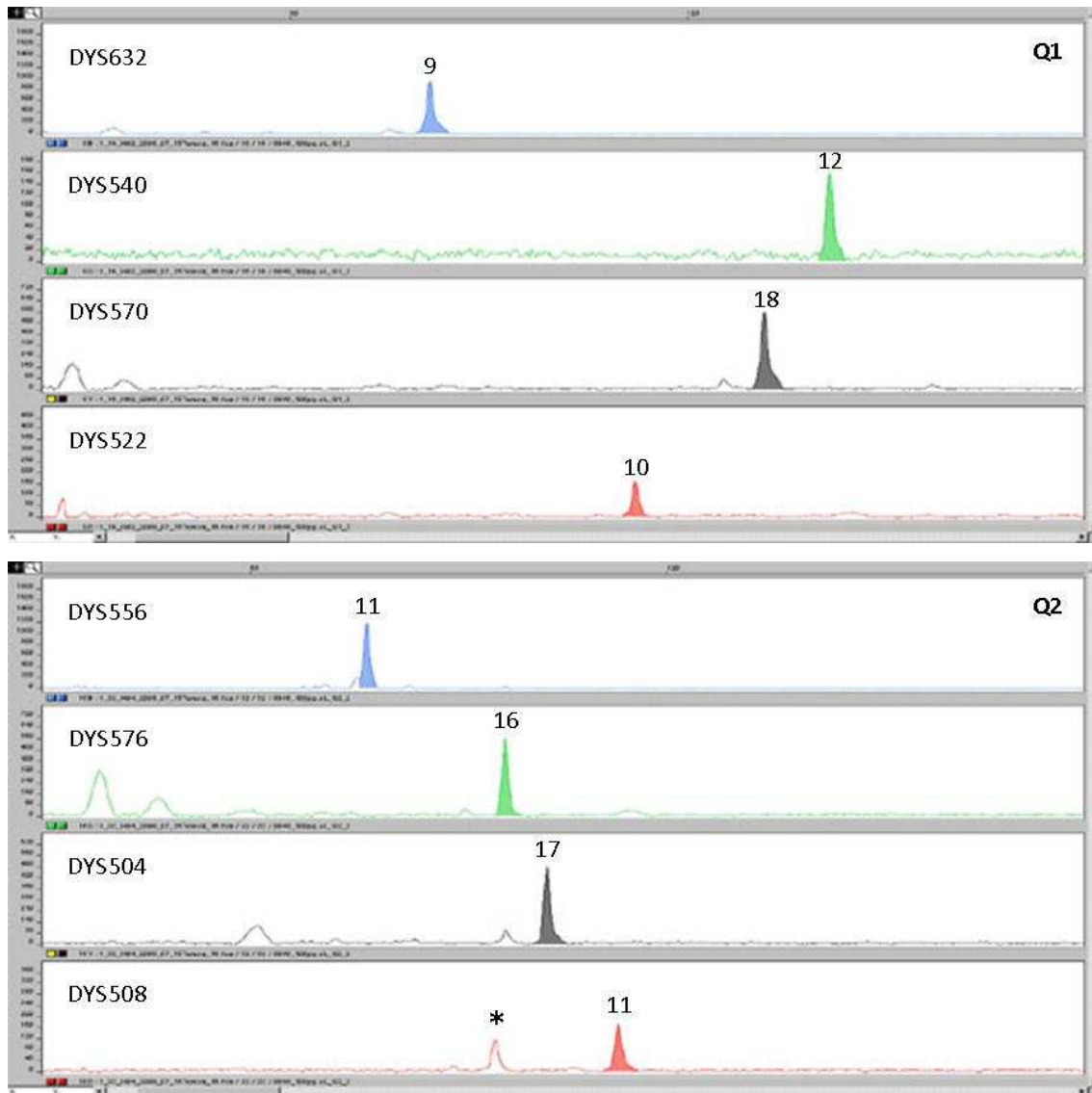


Figura 10. Electroforetogramas obtidos na análise de 100pg de DNA padrão 9948 (Promega) com os *quadruplexes* Q1 e Q2. Os números correspondem aos alelos; * assinala uma qualquer interferência que, no entanto, poderia causar alguma dúvida caso estivéssemos perante uma amostra com haplótipo desconhecido e o seu tamanho (em pares de bases) coincidissem com um alelo.

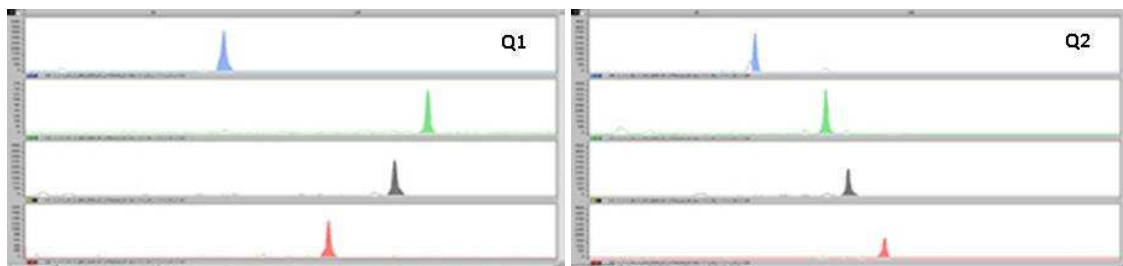
6. Análise de misturas

Os marcadores específicos do cromossoma Y são geralmente apresentados como uma grande vantagem para a análise de amostras que contêm mistura de material biológico proveniente de indivíduos de sexo distinto, uma vez que “actuam” exclusivamente sobre a fracção masculina dessa mistura.

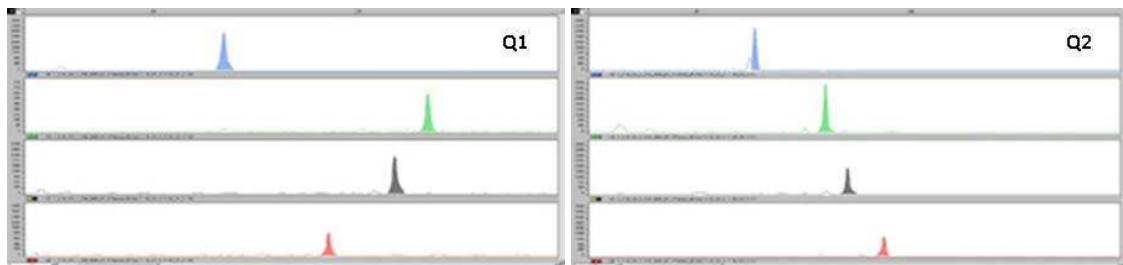
Na análise de misturas artificiais de DNA masculino (DNA padrão 9948 (Promega)) com DNA feminino (DNA padrão 9947A (Applied Biosystems)), em diferentes proporções, ambos os *quadriplexes* provaram ser eficazes na tipagem da componente masculina, mesmo quando esta representava apenas 0,2% da totalidade do DNA presente na amostra (1:500).

A imagem que se segue (Figura 11) mostra os electroforetogramas obtidos na análise das proporções masculino:feminino 1:1 (A), 1:10 (B), 1:100 (C) e 1:500 (D).

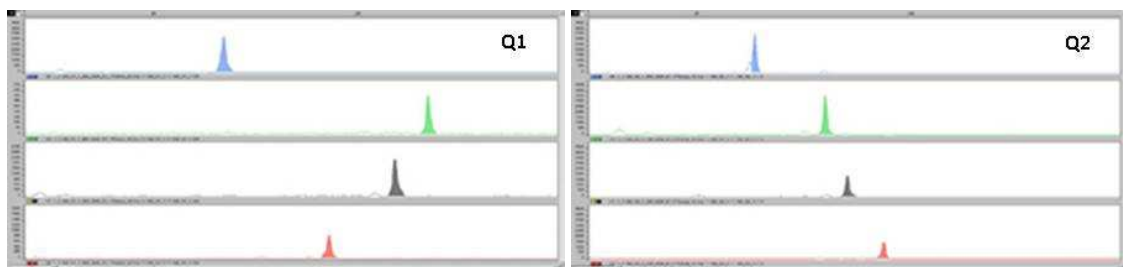
A) 1:1



B) 1:10



C) 1:100



D) 1:500

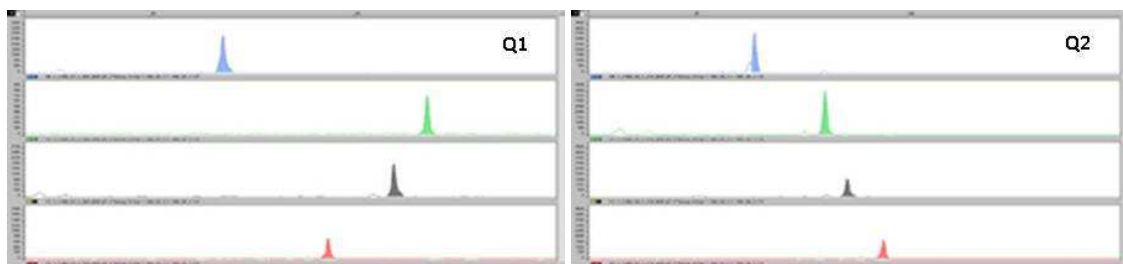


Figura 11. Electroforetogramas obtidos na análise de misturas de DNA masculino com DNA feminino nas seguintes proporções masculino:feminino - 1:1 (A), 1:10 (B), 1:100 (C) e 1:500 (D).

Em todas elas se detecta claramente o haplótipo do DNA padrão 9948 (Promega): 9-12-18-10-11-16-17-11 para os marcadores DYS632, DYS540, DYS570, DYS522 (*quadriplex 1*), DYS556, DYS576, DYS504 e DYS508 (*quadriplex 2*), respectivamente. Todos os picos apresentam uma altura superior a 100 RFU.

Estes resultados comprovam a eficácia destes *loci* para a análise de misturas de DNA de diferentes proveniências, como é o caso de grande parte das amostras relativas a agressões sexuais.

7. Aplicação a amostras forenses

De forma a comprovar a utilidade dos novos marcadores em estudo para a prática forense, diversas amostras da casuística do Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Norte do INML, IP – nomeadamente de criminalística biológica, investigação de paternidade e identificação genética individual de restos cadavéricos – foram analisadas com os oito Y-miniSTR.

Da análise dos 7 ossos resultaram 4 perfis completos (oito *loci* Y-miniSTR), 2 perfis incompletos e um dos ossos não deu qualquer resultado.

Estes resultados (perfis incompletos ou total falha de amplificação) podem provavelmente dever-se, em parte, ao facto destas amostras terem sido submetidas, ao longo do tempo, a diversas congelações/descongelações, bem como ao tempo decorrido desde a sua recepção até à análise com os Y-miniSTR.

No entanto, é de salientar o facto de se ter conseguido obter um perfil completo para mais de metade das amostras, o que comprova a eficácia destes marcadores na análise de amostras vulgarmente consideradas “difíceis”.

Quando as amostras Re., J., N. e Ri. – cujos perfis para os marcadores genéticos constantes do kit comercial PowerPlex[®] Y System (Promega) são idênticos dois a dois (Tabela 10, em cima) – foram analisadas com os Y-miniSTR tornou-se possível distingui-las (Tabela 10, em baixo).

Tabela 10. Haplótipos de 4 amostras da casuística forense obtidos para os marcadores presentes no kit Power Plex Y (Promega) e para os 8 Y-miniSTR em estudo.

	DYS 391	DYS 389I	DYS 439	DYS 389II	DYS 438	DYS 437	DYS 19	DYS 392	DYS 393	DYS 390	DYS 385a/b
Re.	11	13	12	29	12	15	14	13	13	23	11,14
J.	11	13	12	29	12	15	14	13	13	23	11,14
N.	11	13	13	29	12	15	14	13	13	24	11,14
Ri.	11	13	13	29	12	15	14	13	13	24	11,14

	DYS 632	DYS540	DYS570	DYS522	DYS556	DYS576	DYS504	DYS508
Re.	9	12	17	11	11	18	17	11
J.	9	12	17	11	11	18	16	11
N.	9	12	17	10	12	18	17	8
Ri.	9	11	17	11	11	18	17	11

Sombreado a azul encontram-se os alelos correspondentes aos Y-miniSTR que permitem diferenciar as amostras.

Uma vez mais, estes resultados evidenciam a utilidade da aplicação destes *loci*, neste caso para a distinção de amostras indistinguíveis quando analisadas com outros marcadores do cromossoma Y.

Por fim foi analisada, com ambos os *quadriplexes*, uma amostra da criminalística biológica que consistia numa “zaragatoa com extremidade de algodão manchada de substância de cor acastanhada” e cuja pesquisa de sangue havia resultado positiva.

Aquando de uma primeira análise, com os kits geralmente utilizados no laboratório, os resultados obtidos não tinham sido satisfatórios. Na análise com o kit AmpF ℓ STR[®]Identifiler[®]PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) não foi possível obter qualquer perfil genético; recorrendo ao kit específico de cromossoma Y AmpF ℓ STR[®]Yfiler[®]PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) conseguiu-se obter um perfil masculino incompleto (5 em 16 *loci* proporcionaram resultados). Posteriormente, a mesma amostra foi analisada com o kit de miniSTR autossómicos AmpF ℓ STR[®]MiniFiler[™]PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), análise essa que se revelou bastante mais proveitosa – a totalidade dos oito miniSTR foi eficazmente amplificada (Tabela 11).

Quando, no âmbito do presente trabalho, esta amostra foi genotipada por recurso aos dois *quadriplexes* de Y-miniSTR foi possível obter um perfil masculino completo (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados obtidos nas diversas análises efectuadas para uma amostra de criminalística biológica.

Identifiler		Y-Filer		Minifiler		Y-miniSTR	
D8S1179	-	DYS456	-	D13S317	+	DYS632	+
D21S11	-	DYS389I	+	D7S820	+	DYS540	+
D7S820	-	DYS390	-	D2S1338	+	DYS570	+
CSF1PO	-	DYS389II	-	D21S11	+	DYS522	+
D3S1358	-	DYS458	+	D16S539	+	DYS556	+
TH01	-	DYS19	-	D18S51	+	DYS576	+
D13S317	-	DYS385a/b	-	CSF1PO	+	DYS504	+
D16S539	-	DYS393	+	FGA	+	DYS508	+
D2S1338	-	DYS391	+				
D19S433	-	DYS439	-				
vWA	-	DYS635	+				
TPOX	-	DYS392	-				
D18S51	-	Y GATA H4	-				
Amelog.	+	DYS437	-				
D5S818	-	DYS438	-				
FGA	-	DYS448	-				

+ detecção de alelo; - não se registava qualquer pico no electroforetograma.

Uma vez mais fica confirmada a eficácia dos miniSTR na análise de amostras degradadas. Apenas os sistemas que produzem fragmentos de amplificação de menor tamanho originaram perfis completos, quer para autosomas (MiniFiler) como para o cromossoma Y (Y-miniSTR).

IV. CONCLUSÕES FINAIS

Os Y-miniSTR estudados evidenciaram ser um valioso acréscimo ao conjunto de marcadores já bem estabelecidos na casuística forense, uma vez que:

- demonstraram ser específicos do cromossoma Y e possuir elevado grau de sensibilidade – permitiram a análise de apenas 100pg de DNA;
- possibilitaram a genotipagem da componente masculina presente em misturas de DNA masculino com DNA feminino, mesmo quando esta representava apenas 0,2% da totalidade de DNA da amostra;
- provaram ser úteis na diferenciação de amostras que eram indistinguíveis através da análise de outros Y-STR;
- permitiram a obtenção de um perfil genético completo na análise de uma amostra que havia proporcionado maus resultados quando analisada com os kits comumente usados no laboratório.

Na caracterização de uma amostra da população do Norte de Portugal com os oito Y-miniSTR em estudo foi possível obter uma capacidade de discriminação de 72% e uma diversidade haplotípica de 0,9938, valor este que equivale ao poder de discriminação e à probabilidade de exclusão *a priori* dos marcadores autossómicos.

De uma maneira geral o *quadriplex 2* apresentou melhores resultados do que o *quadriplex 1*. No entanto, se se tivesse que optar por um só *quadriplex*, o ideal seria juntar os marcadores DYS576, DYS570, DYS504 e DYS522, uma vez que estes revelaram valores de diversidade génica mais elevados.

Num total de 784 transmissões alélicas analisadas não foi detectada qualquer inconsistência, ou seja, não se registou nenhuma mutação.

Foi determinado e confirmado por sequenciação o perfil genético para os oito Y-miniSTR do DNA padrão 9948 (Promega) – 17 (DYS504), 11 (DYS508), 10 (DYS522), 12 (DYS540), 11 (DYS556), 18 (DYS570), 16 (DYS576), 9 (DYS632) –, até à data não publicado.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Butler JM (2005) *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, 2nd Edition, Elsevier Academic Press, USA.
- [2] Collins JR, Stephens RM, Gold B, Long B, Dean M, Burt SK, An exhaustive DNA micro-satellite map of the human genome using high performance computing, *Genomics* 82 (2003) 10-19.
- [3] Subramanian S, Mishra RK, Singh L, Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions, *Genome Biology* 4 (2003) R13.
- [4] Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT, DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *Am J Hum Genet* 49 (1991) 746-756.
- [5] Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ, Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis, *Nature* 352 (1991) 427-429.
- [6] Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A, Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis, *Forensic Sci Int* 56 (1992) 65-76.
- [7] Schneider PM, Bender K, Mayr WR, Parson W, Hoste B, Decorte R, Cordonnier J, Vanek D, Morling N, Karjalainen M, Carlotti CM, Sabatier M, Hohoff C, Schmitter H, Pflug W, Wenzel R, Patzelt D, Lessig R, Dobrowolski P, O'Donnell G, Garafano L, Dobosz M, de Knijff P, Mevag B, Pawlowski R, Gusmão L, Vide MC, Alonso AA, Fernández OG, Nicolás PS, Kihlgreen A, Bar W, Meier V, Teyssier A, Coquoz R, Brandt C, Germann U, Gill P, Hallett J, Greenhalgh M, STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative exercise, *Forensic Sci Int* 139 (2004) 123-134.
- [8] Pfeiffer H, Hühne J, Seitz B, Brinkmann B, Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth, *Int J Legal Med* 112 (1999) 142-144.
- [9] Whitaker JP, Clayton TM, Urquhart AJ, Millican ES, Downes TJ, Kimpton CP, Gill P, Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples, *Biotechniques* 18 (1995) 670-677.
- [10] Alvarez Garcia A, Munoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodriguez-Calvo MS, Carracedo A, Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp, *Int J Legal Med* 109 (1996) 125-129.
- [11] Bar W, Kratzer A, Machler M, Schmid W, Postmortem stability of DNA, *Forensic Sci Int* 39 (1988) 59-70.
- [12] Wiegand P, Kleiber M, Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers, *Int J Legal Med* 114 (2001) 285-287.
- [13] Whitaker JP, Clayton TM, Urquhart AJ, Millican ES, Downes TJ, Kimpton CP, Gill P, Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples, *BioTechniques* 18 (1995) 670-677.

- [14] Coble MD, Butler JM, Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA, *J Forensic Sci* 50 (2005) 43-53.
- [15] Butler JM, Shen Y, McCord BR, The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA, *J Forensic Sci* 48 (2003) 1054-1064.
- [16] Grubwieser P, Mühlmann R, Berger B, Niederstätter H, Pavlic M, Parson W, A new "miniSTR-multiplex" displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA, *Int J Legal Med* 120 (2006) 115-120.
- [17] Wiegand P, Klein R, Braunschweiger G, Hohoff C, Brinkmann B, Short amplicon STR multiplex for stain typing, *Int J Legal Med* 120 (2006) 160-164.
- [18] Hellmann A, Rohleder U, Schmitter H, Wittig M, STR typing of human telogen hairs – a new approach, *Int J Legal Med* 114 (2001) 269-273.
- [19] Tsukada K, Takayanagi K, Asamura H, Ota M, Fukushima H, Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO and vWA loci, *Legal Med* 4 (2002) 239-245.
- [20] Chung DT, Drábek J, Opel KL, Butler JM, McCord R, A Study on the Effects of Degradation and Template Concentration on the Amplification Efficiency of the STR Miniplex Primer Sets, *J Forensic Sci* 49 (2004) 733-740.
- [21] Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, Parson W, Berger B, Grubwieser P, Mogensen HS, Morling N, Nielsen K, Sanchez JJ, Petkovski E, Carracedo A, Sanchez-Diz P, Ramos-Luis E, Brión M, Irwin JA, Just RS, Loreille O, Parsons TJ, Syndercombe-Court D, Schmitter H, Stramann-Bellinghausen B, Bender K, Gill P, Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs – results of a collaborative European (EDNAP) exercise, *Forensic Sci Int* 164 (2006) 33-44.
- [22] Roewer L, Kayser M, Dieltjes P, Nagy M, Bakker E, Krawczak M, de Knijff P, Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations, *Human Molecular Genetics* 5 (1996) 1029-1033.
- [23] Lahn BT, Page DC, Functional coherence of the human Y chromosome, *Science* 278 (1997) 675-680.
- [24] Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C, The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing, *Int J Legal Med* 110 (1997) 118-124.
- [25] National Institute of Standards and Technology (NIST), Recent Developments in Y-Short tandem repeat and Y-Single nucleotide polymorphism analysis, *Forensic Sci Rev* 15 (2003) 91-111.
- [26] Hanson EK, Ballantyne J, Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: Forensic implications, *Legal Med* 8 (2006) 110-120.

- [27] Kayser M, Cagià A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Weichhold G, de Knijff P, Roewer L, Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study, *Int J Legal Med* 110 (1997) 125-133.
- [28] Pascali VL, Dobosz M, Brinkmann B, Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts, *Int J Legal Med* 112 (1998) 1.
- [29] Schneider PM, d'Aloja E, Dupuy BM, Eriksen B, Jangblad A, Kloosterman AD, Kratzer A, Lareu MV, Pfitzinger H, Rand S, Scheithauer R, Schmitter H, Skitsa I, Syndercombe-Court D, Vide MC, Results of a collaborative study regarding the standardization of the Y-linked STR system DYS385 by the European DNA Profiling (EDNAP) group, *Forensic Sci Int* 102 (1999) 159-165.
- [30] Butler JM, Recent developments in Y-short tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis, *Forensic Sci Rev* 15 (2003) 91-111.
- [31] Ayub Q, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi SQ, Tyler-Smith C, Identification and characterization of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information, *Nucleic Acids Research* 28 (2000) e8.
- [32] Redd AJ, Agellon AB, Kearney VA, Contreras VA, Karafet T, Park H, de Knijff P, Butler JM, Hammer MF, Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome, *Forensic Sci Int* 130 (2002) 97-111.
- [33] Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, Mehdi SQ, Rosser Z, Stoneking M, Jobling MA, Sajantila A, Tyler-Smith C, A Comprehensive Survey of Human Y-Chromosomal Microsatellites, *Am J Hum Genet* 74 (2004) 1183-1197.
- [34] Hanson EK, Ballantyne J, A Highly Discriminating 21 Locus Y-STR "Megaplex" System Designed to Augment the Minimal Haplotype Loci for Forensic Casework, *J Forensic Sci* 49 (2004) 40-51.
- [35] Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ, Forensic application of DNA "fingerprints", *Nature* 318 (1985) 577-579.
- [36] Prinz M, Boll K, Baum H, Shaler B, Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples, *Forensic Sci Int* 85 (1997) 209-218.
- [37] Parson W, Niederstätter H, Köchl S, Steinlechner M, Berger B, When Autosomal Short Tandem Repeats Fail: Optimized Primer and Reaction Design for Y-chromosome Short Tandem Repeat Analysis in Forensic Casework, *Croatian Medical Journal* 42 (2001) 285-287.
- [38] Cerri N, Ricci U, Sani I, Verzeletti A, de Ferrari F, Mixed Stains from Sexual Assault Cases: Autosomal or Y-Chromosome Short Tandem Repeats?, *Croatian Medical Journal* 44 (2003) 289-292.
- [39] Delfin FC, Madrid BJ, Tan MP, de Ungria CA, Y-STR analysis for detection and objective confirmation of child sexual abuse, *Int J Legal Med* 119 (2005) 158-163.

- [40] Hall A, Ballantyne J, Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples, *Forensic Sci Int* 136 (2003) 58-72.
- [41] Parson W, Niederstätter H, Brandstätter A, Berger B, Improved specificity of Y-STR typing in DNA mixture samples, *Int J Legal Med* 117 (2003) 109-114.
- [42] Sibille I, Duverneuil C, de la Grandmaison GL, Guerrouache K, Teissière F, Durigon M, de Mazancourt P, Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa, *Forensic Sci Int* 125 (2002) 212-216.
- [43] Dekairelle AF, Hoste B, Application of a Y-STR-pentaplex PCR (DYS19, DYS389I and II, DYS390 and DYS393) to sexual assault cases, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 122-125.
- [44] Betz A, Bäßler G, Dietl G, Steil X, Weyermann G, Pflug W, DYS STR analysis with epithelial cells in a rape case, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 126-130.
- [45] Prinz M, Ishii A, Coleman A, Baum HJ, Shaler RC, Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex, *Forensic Sci Int* 120 (2001) 177-188.
- [46] Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, Donnelly P, de Knijff P, Mieremet R, Zerjal T, Tyler-Smith C, Jefferson fathered slave's last child, *Nature* 396 (1998) 27-28.
- [47] Kayser M, Krüger C, Nagy M, Geserick G, de Knijff P, Roewer L (1998) Y-chromosomal DNA analysis in paternity testing: experiences and recommendations. In: Olaisen B, Brinkmann B, Lincoln PJ (eds) *Progress in forensic genetics 7*. Elsevier Science, Amsterdam, pp 494-496.
- [48] Chakraborty R, Paternity testing with genetic markers: are Y-linked genes more efficient than autosomal ones?, *Am J Med Genet* 21 (1985) 297-305.
- [49] Kishida T, Wang W, Fukuda M, Tamaki Y, Two deficiency cases of disputed paternity: sibling or half-sibling?, *Nippon Hoigaku Zasshi* 50 (1996) 78-81.
- [50] Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Mayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM, DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis, *Forensic Sci Int* 157 (2006) 187-197.
- [51] Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, Anslinger K, Augustin C, Betz A, Bosch E, Cagliá A, Carracedo A, Corach D, Dekairelle A-F, Dobosz T, Dupuy BM, Füredi S, Gehrig C, Gusmão L, Henke J, Henke L, Hidding M, Hohoff C, Hoste B, Jobling MA, Kärger HJ, de Knijff P, Lessig R, Liebeherr E, Lorente M, Martínez-Jarreta B, Nievas P, Nowak M, Parson W, Pascali VL, Penacino G, Ploski R, Rolf B, Sala A, Schmidt U, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Kayser M, Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 106-113.
- [52] Willuweit S, Roewer L, Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update, *FSI: Genetics* 1 (2007) 83-87.

- [53] YHRD, Y Chromosome Haplotype Reference Database. <http://www.yhrd.org>
- [54] Rolf B, Keil W, Brinkmann B, Roewer L, Fimmers R, Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability in cases of mutation, *Int J Legal Med* 115 (2001) 12-15.
- [55] ReliaGene Technologies, Y-STR Haplotype Reference Database for U.S. Populations. http://www.reliagene.com/index.asp?content_id=y_frq&menu_id=rd
- [56] Promega Corporation, PowerPlex[®] Y Haplotype Database. <http://www.promega.com/techserv/tools/pplexy>
- [57] Applied Biosystems, YFiler Haplotype Database. <http://www.appliedbiosystems.com/yfilerdatabase>
- [58] Gusmão L and Carracedo A, Y Chromosome-Specific STRs, Profiles in DNA 6 (1) (2003) 3-6.
- [59] Roewer L, Kayser M, de Knijff P, Anslinger K, Betz A, Caglià A, Corach D, Füredi S, Henke L, Hidding M, Kärigel HJ, Lessig R, Nagy M, Pascali VL, Parson W, Rolf B, Schmitt C, Szibor R, Teifel-Greding J, Krawczak M, A new method for the evaluation of matches in non-recombining genomes: application to Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males, *Forensic Sci Int* 114 (2000) 31-43.
- [60] Krawczak M, Forensic evaluation of Y-STR haplotype matches: a comment, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 114-115.
- [61] Ballantyne J, Fatolitis L, Roewer L, Creating and Managing Effective Y-STR Databases, Profiles in DNA 9 (2) (2006) 10-13.
- [62] Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, Krüger C, Krawczak M, Nagy M, Dobosz T, Szibor R, de Knijff P, Stoneking M, Sajantila A, Characteristics and Frequency of Germline Mutations at Microsatellite Loci from the Human Y Chromosome, as Revealed by Direct Observation in Father/Son Pairs, *Am J Hum Genet* 66 (2000) 1580-1588.
- [63] Dupuy BM, Stenersen M, Egeland T, Olaisen B, Y-Chromosomal Microsatellite Mutation Rates: Differences in Mutation Rate Between and Within Loci, *Human Mutation* 23 (2004) 117-124.
- [64] Brinkmann B, Klitschar M, Neuhuber F, Hühne J, Rolf B, Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat, *Am J Hum Genet* 62 (1998) 1408-1415.
- [65] Kayser M, sajantila A, Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis, *Forensic Sci Int* 118 (2001) 116-121.
- [66] Asamura H, Sakai H, Ota M, Fukushima H, Mini Y-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples, *FSI: Genetics* 1 (2007) 56-61.

- [67] Vallone PM and Butler JM, AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structure, *BioTechniques* 37 (2004) 226-231.
- [68] Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, University Press, New York
- [69] Butler JM, Decker AE, Vallone PM, Kline MC, Allele frequencies for 27 Y-STR loci with U.S. Caucasian, African American, and Hispanic samples, *Forensic Sci Int* 156 (2006) 250-260.
- [70] Yoshida K, Sekiguchi K, Kasai K, Sato H, Seta S, Sensabaugh GF, Evaluation of new primers for CSF1PO, *Int J Legal Med* 110 (1997) 36-38.
- [71] Ballard DJ, Philips C, Wright G, Thacker CR, Robson C, Revoir AP, Court DS, A study of mutation rates and the characterisation of intermediate, null and duplicated alleles for 13 Y chromosome STRs, *Forensic Sci Int* 155 (2005) 65-70.
- [72] Bosch E, Lee AC, Calafell F, Arroyo E, Henneman P, de Knijff P, Jobling MA, High resolution Y chromosome typing: 19 STRs amplified in three multiplex reactions, *Forensic Sci Int* 125 (2002) 42-51.
- [73] Gusmão L, Alves C, Beleza S, Amorim A, Forensic evaluation and population data on the new Y-STRs DYS434, DYS437, DYS438, DYS439 and GATA A10, *Int J Legal Med* 116 (2002) 139-147.
- [74] Kayser M, de Knijff P, Dieltjes P, Krawczak M, Nagy M, Zerjal T, Pandya A, Tyler-Smith C, Roewer L, Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping, *Electrophoresis* 18 (1997) 1602-1607.
- [75] Sensabaugh GF, Biochemical markers of individuality, in: Saferstein R (Ed), *Forensic Science Handbook*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1982, pp. 340-415. In: Ayadi I, Ammar-Keskes L, Rebai A, Haplotypes for 13 Y-chromosomal STR loci in South Tunisian population (Sfax region), *Forensic Sci Int* 164 (2006) 249-253.
- [76] Chakravarti A, Li CC, The effect of linkage on paternity calculations, in: Walker RH (Ed), *Inclusion Probabilities in Parentage Testing*, American Association of Blood Banks, Arlington, VA, 1983, pp. 411-420. In: Ayadi I, Ammar-Keskes L, Rebai A, Haplotypes for 13 Y-chromosomal STR loci in South Tunisian population (Sfax region), *Forensic Sci Int* 164 (2006) 249-253.
- [77] Sánchez-Diz P, Alves C, Carvalho E, Carvalho M, Espinheira R, Garcia O, Pinheiro MF, Pontes L, Porto MJ, Santapa O, Silva C, Sumita D, Valente S, Whittle M, Yurrebaso I, Carracedo A, Amorim A, Gusmão L, Population and segregation data on 17 Y-STR: results of a GEP-ISFG collaborative study, *Int J Legal Med* 122 (2008) 529-533.
- [78] Gill P, Application of Low Copy Number DNA Profiling, *Croatian Medical Journal*, 42 (2001) 229-232.

ANEXOS

ANEXO 1. Haplótipos obtidos para as 371 amostras analisadas no estudo

	DYS632	DYS540	DYS570	DYS522	DYS556	DYS576	DYS504	DYS508
A001	9	13	17	10	11	17	17	11
A002	8	10	18	11	11	16	18	10
A003	9	12	18	10	11	18	17	11
A004	9	12	14	10	11	17	17	11
A005	8	11	18	12	13	16	15	12
A006	9	11	17	10	12	19	17	11
A007	9	12	17	10	11	18	17	11
A008	8	11	20	12	11	18	16	12
A009	8	11	17	11	12	19	15	10
A010	8	12	17	11	12	18	16	10
A011	9	12	15	10	11	19	16	12
A012	9	13	18	10	11	18	17	10
A013	8	11	22	12	12	17	15	11
A014	8	13	17	11	12	17	16	10
A015	9	12	17	10	12	18	17	11
A016	9	12	17	11	11	18	17	11
A017	9	12	17	10	11	19	17	11
A018	9	12	17	10	11	19	17	11
A019	9	12	17	10	11	17	17	11
A020	8	11	18	12	11	18	18	10
A021	9	12	17	10	11	17	16	11
A022	8	9	15	12	12	16	16	10
A023	9	12	16	11	11	17	17	11
A024	8	11	18	11	11	17	17	10
A025	9	12	18	10	11	18	16	11
A026	8	10	18	12	12	18	17	11
A027	8	12	21.2	12	11	17	16	11
A028	9	12	18	11	11	17	17	11
A029	8	11	22	12	12	17	15	10
A030	9	12	17	10	12	18	16	11
A031	9	12	17	10	11	16	17	11
A032	8	11	22	13	12	18	15	10
A033	8	11	20	12	12	19	15	12
A034	9	11	18	11	12	17	17	11
A035	8	11	22	12	11	16	15	11
A036	8	12	16	10	11	17	18	11
A037	8	12	16	11	11	16	18	10
A038	9	13	16	10	11	17	17	11
A039	8	11	18	12	12	18	14	12
A040	9	12	17	11	11	18	17	11
A041	9	12	17	10	11	19	17	11
A042	9	12	17	10	11	18	17	11
A043	9	12	18	10	11	18	15	11
A044	9	12	18	9	11	17	18	11
A045	8	11	22	12	12	19	15	10
A046	9	12	18	10	11	17	17	11

Continua

Anexo 1. (continuação)

A047	9	12	19	10	11	18	16	11
A048	9	12	17	10	11	18	18	10
A049	6	11	19	12	12	17	17	11
A050	8	12	18	11	11	16	17	10
A051	9	12	18	11	12	19	17	11
A052	9	13	16	10	11	18	17	11
A053	8	11	17	11	12	17	14	10
A054	9	12	17	11	11	16	20	11
A055	9	12	17	10	11	18	16	11
A056	9	12	17	10	11	17	17	11
A057	9	11	17	10	12	20	16	11
A058	8	11	18	11	11	16	15	10
A059	9	12	17	10	11	17	17	11
A060	9	13	18	10	11	19	17	10
A061	9	12	16	10	11	18	17	11
A062	9	12	18	10	11	17	17	11
A063	9	12	17	11	11	17	16	11
A064	9	12	18	10	11	18	17	11
A065	8	12	17	11	12	15	19	10
A066	8	13	19	11	12	16	15	11
A067	9	12	17	10	11	19	17	11
A068	9	12	17	10	11	17	19	11
A069	9	12	17	11	11	18	17	11
A070	9	12	17	10	11	15	18	11
A071	8	11	20	13	11	18	16	11
A072	8	12	17	13	12	19	15	11
A073	9	12	17	11	11	19	16	11
A074	9	12	17	10	11	20	17	11
A075	9	12	17	11	11	19	16	11
A076	8	11	19	11	12	19	14	11
A077	9	11	17	10	11	17	17	11
A078	9	12	18	10	11	18	16	11
A079	8	12	19	11	12	16	16	10
A080	9	12	17	10	12	17	18	11
A081	9	12	18	10	11	18	18	10
A082	8	11	19	12	12	18	16	13
A083	9	12	18	10	11	17	17	11
A084	9	12	17	10	11	16	19	11
A085	9	12	17	10	11	19	17	11
A086	9	12	18	10	11	17	16	11
A087	8	11	18	12	11	17	16	10
A088	9	12	17	10	11	19	18	11
A090	9	12	17	10	11	19	12	11
A091	8	12	19	11	12	15	17	10
A092	9	12	17	10	11	16	16	11
A093	9	12	16	10	11	20	17	11
A094	8	12	15	11	13	21	16	9
A095	9	12	17	10	11	17	17	11
A096	8	11	16	12	12	16	15	10
A097	9	12	19	10	11	19	17	11

Continua

Anexo 1. (continuação)

A098	9	12	18	10	11	16	17	12
A099	8	11	20	13	11	17	12	11
A100	9	12	17	10	11	18	17	11
A101	8	11	19	11	11	18	17	11
A102	9	12	15	10	11	17	17	12
A103	9	12	17	10	11	18	17	11
A104	9	12	18	10	12	18	15	11
A105	9	12	20	10	11	19	17	10
A106	8	11	21	11	12	17	14	11
A107	9	12	18	10	11	19	16	11
A108	9	12	19	10	11	18	16	11
A109	8	11	20	11	12	17	13	11
A110	9	12	17	11	12	18	17	11
A111	9	12	17	10	12	17	17	11
A112	9	12	20	10	11	17	16	11
A113	9	12	17	10	11	22	17	11
A114	9	12	17	10	11	19	17	11
A115	9	11	16	10	11	18	16	11
A116	9	12	17	11	11	18	17	8
A117	8	13	17	11	12	16	15	11
A118	8	11	17	11	11	19	19	10
A119	9	12	17	11	11	20	16	11
A120	9	12	18	10	11	18	17	12
A121	9	12	17	10	11	18	17	11
A122	9	12	17	10	11	19	17	12
A123	8	11	21	11	12	19	14	11
A124	8	11	19	12	11	16	14	11
A125	9	12	17	10	11	18	18	11
A126	8	12	19	12	12	17	12	12
A127	9	12	17	10	11	17	17	11
A128	9	12	17	11	11	18	17	11
A129	9	12	17	10	11	19	17	11
A130	9	12	16	10	11	18	17	11
A131	9	12	17	11	11	18	17	11
A132	9	12	17	10	11	19	17	11
A133	8	11	17	12	12	18	13	12
A134	8	11	18	11	11	17	17	10
A135	8	12	18	11	12	16	17	10
A136	9	12	18	10	11	18	16	11
A137	8	13	17	11	12	15	17	12
A138	9	12	18	10	11	18	17	11
A139	9	11	17	10	11	17	17	12
A141	9	12	17	12	11	20	17	12
A142	9	12	17	10	11	17	17	11
A143	9	12	16	10	11	20	17	11
A144	9	12	17	10	11	17	17	11
A145	9	12	16	10	11	19	16	11
A146	9	12	17	11	11	18	17	11
A147	9	12	17	10	11	18	17	11
A148	9	12	17	10	11	18	17	12

Continua

Anexo 1. (continuação)

A150	8	11	24	12	12	17	15	11
A151	8	11	20	12	12	17	13	12
A152	8	14	17	12	12	18	14	10
A153	8	12	18	12	12	19	15	11
A154	8	11	17	12	11	17	15	11
A155	9	12	17	10	11	17	17	11
A156	9	12	17	10	11	18	18	11
A157	8	13	17	11	12	15	17	12
A158	9	12	16	10	11	18	17	11
A159	8	11	21	11	12	17	15	12
A160	9	11	17	10	11	18	16	11
A161	8	10	19	12	12	17	13	13
A162	8	11	18	11	11	16	17	10
A163	9	12	18	10	11	18	17	11
A164	9	12	18	10	12	19	17	11
A165	9	12	17	10	11	17	18	11
A167	9	12	16	10	12	17	17	11
A168	8	12	18	11	12	18	17	10
A169	9	12	19	10	11	18	16	11
A170	9	12	16	10	12	18	17	11
A171	8	12	18	12	12	18	12	15
A172	9	12	17	10	11	18	17	12
A173	8	13	17	11	12	16	17	10
A174	8	13	18	11	12	16	15	11
A175	8	12	18	14	12	20	15	12
A176	9	12	17	10	11	18	17	12
A177	9	12	17	10	11	20	17	11
A179	9	12	17	10	11	17	16	11
A180	8	12	17	11	11	17	15	12
A181	9	12	17	10	11	17	17	11
A182	8	11	16	12	12	18	16	9
A183	8	12	21	11	12	17	17	10
A184	9	12	18	10	11	18	17	11
A185	9	13	16	10	11	18	17	11
A186	9	12	17	9	11	18	14	12
A187	8	11	20	12	12	17	13	12
A188	8	11	22	13	12	18	16	10
A190	9	12	17	10	11	19	17	11
A191	8	11	18	11	11	18	15	10
A192	8	12	17	11	12	17	16	10
A193	9	12	17	10	11	18	16	11
A194	8	13	18	11	13	18	14	10
A195	9	12	18	10	11	17	16	11
A196	9	12	17	10	11	19	17	11
A197	9	12	16	10	11	18	16	11
A198	9	12	17	10	11	17	18	11
A199	9	12	19	10	11	17	17	11
A200	9	12	17	10	11	18	16	11
A201	8	13	19	11	12	20	16	10
A202	8	11	17	11	11	19	14	12

Continuação

Anexo 1. (continuação)

A203	9	13	18	10	11	20	17	11
A204	8	12	17	12	12	17	17	10
A205	8	11	22	12	12	19	15	10
A206	8	11	18	12	11	16	16	11
A207	8	12	17	12	12	16	15	10
A208	9	12	18	10	11	18	16	11
A209	9	12	17	10	11	19	15	11
A210	9	13	17	8	11	17	17	11
A211	9	12	18	10	11	17	17	11
A212	9	12	17	10	12	17	17	11
A213	9	12	18	10	11	19	17	11
A214	9	12	17	11	11	19	17	11
A215	9	12	20	10	11	16	17	13
A216	8	12	22	11	12	16	18	10
A217	8	11	21	11	11	17	16	10
A218	9	12	19	11	11	18	17	11
A219	9	12	17	10	12	20	17	11
A220	9	12	17	10	11	18	17	12
A221	8	11	15	11	11	16	16	11
A223	9	12	16	10	11	20	16	12
A224	8	11	22	12	12	18	15	10
A225	8	11	22	11	11	16	16	10
A226	9	12	16	10	11	17	17	11
A227	8	11	21	12	12	17	14	12
A229	9	11	18	10	11	17-18(?)	17	11
A230	8	11	18	11	11	15	17	10
A231	9	12	17	10	11	17	17	11
A232	9	12	17	10	11	17	16	11
A233	8	11	19	12	12	19	13	14
A234	9	12	17	10	11	18	18	11
A235	9	12	17	10	11	18	18	11
A236	9	12	17	10	11	18	13	11
A237	8	11	19	12	11	20	16	10
A238	9	12	17	10	11	19	17	10
A239	8	11	20	13	12	17	13	12
A240	8	11	21	12	11	18	15	11
A241	9	12	18	11	11	18	17	11
A242	8	11	20	12	12	19	14	12
A243	8	11	17	11	11	18	16	12
A244	9	12	18	10	11	18	17	11
A245	8	10	17	12	11	16	17	11
A246	9	12	17	12	11	19	17	11
A247	8	12	17	11	12	15	17	10
A248	8	11	22	12	12	17	15	10
A249	9	12	16	10	11	18	17	11
A250	8	12	19	11	12	17	17	10
A251	8	12	17	13	12	16	16	10
A252	8	12	19	11	12	15	13	15
A253	9	12	17	10	11	18	16	11
A254	9	12	18	10	11	18	17	11

Continua

Anexo 1. (continuação)

A255	9	11	17	10	12	19	17	11
A256	8	11	20	11	11	18	14	11
A257	9	12	17	10	11	18	17	14
A258	8	11	18	11	12	16	17	10
A259	8	11	22	12	11	16	15	11
A260	9	12	18	11	11	19	18	11
A261	9	12	17	11	11	19	17	11
A262	9	12	19	10	13	18	14	11
A263	9	12	17	10	11	18	17	10
A264	9	14	18	10	11	18	17	11
A265	9	12	18	10	11	18	16	11
A266	8	12	16	12	13	16	14	10
A267	8	12	17	10	11	16	14	12
A268	9	12	18	10	11	18	17	11
A269	9	12	17	10	11	19	17	11
A270	9	12	20	11	11	20	18	11
A271	8	11	21	12	12	18	15	10
A272	9	12	19	10	11	18	16	11
A273	9	11	18	11	11	18	18	11
A274	9	12	17	10	11	18	16	11
A275	8	11	22	12	12	19	15	10
A276	9	12	18	11	11	19	17	11
A277	8	12	19	11	12	14	16	10
A278	8	12	20	11	12	16	18	10
A279	8	12	17	12	12	19	15	11
A280	8	11	20	12	11	18	18	14
A281	9	11	18	10	11	17	17	10
A282	9	13	17	10	11	17	17	11
A283	8	10	18	11	11	16	18	10
A284	9	12	18	10	11	18	17	11
A285	9	12	14	10	11	17	17	11
A286	8	11	18	12	13	16	15	12
A287	9	11	17	10	12	19	17	11
A288	9	12	17	10	11	18	17	11
A289	8	11	20	12	11	18	16	12
A291	8	12	17	11	12	18	16	10
A292	9	12	15	10	11	19	16	12
A293	9	13	18	10	11	18	17	10
A294	8	11	22	12	12	17	15	11
A295	8	13	17	11	12	17	16	10
A296	9	12	17	10	12	18	17	11
A297	9	12	17	11	11	18	17	11
A298	9	12	17	10	11	19	17	11
A299	9	12	17	10	11	19	17	11
A300	9	12	17	10	11	17	17	11
A301	8	11	18	12	11	18	18	10
A302	9	12	17	10	11	17	16	11
A303	8	9	15	12	12	16	16	10
A304	9	12	16	11	11	17	17	11
A305	8	11	18	11	11	17	17	10

Continua

Anexo 1. (continuação)

A306	9	12	18	10	11	18	16	11
A307	8	10	18	12	12	18	17	11
A308	8	12	21.2	12	11	17	16	11
A309	8	11	20	12	12	19	15	12
A310	9	12	17	10	11	19	17	11
A311	9	12	17	10	11	18	17	11
A312	9	12	18	9	11	17	18	11
A314	9	12	17	10	11	17	17	11
A315	8	11	18	11	11	16	15	10
A316	9	12	17	10	11	17	17	11
A317	9	12	18	10	11	17	17	11
A318	9	12	18	10	11	18	17	11
A319	8	12	17	13	12	19	15	11
A320	9	12	17	11	11	19	16	11
A321	9	12	18	10	11	18	16	11
A322	8	12	19	11	12	16	16	10
A323	9	12	18	10	11	18	18	10
A324	9	12	17	10	11	16	19	11
A325	8	11	18	12	11	17	16	10
A326	9	12	17	10	11	16	16	11
A327	8	11	20	13	11	17	12	11
A328	9	12	17	10	11	18	17	11
A329	9	12	17	10	11	18	17	11
A330	9	12	18	10	12	18	15	11
A331	9	12	17	11	12	18	17	11
A332	9	12	20	10	11	17	16	11
A333	9	12	17	10	11	19	17	11
A334	8	13	17	11	12	16	15	11
A335	9	12	17	10	11	18	17	11
A336	9	12	17	10	11	19	17	12
A337	9	11	17	10	11	17	17	12
A338	9	12	17	12	11	20	17	12
A340	9	12	16	10	11	20	17	11
A341	9	12	17	10	11	17	17	11
A342	9	12	17	10	11	18	17	11
A343	8	11	24	12	12	17	15	11
A344	8	12	18	12	12	19	15	11
A345	9	12	17	10	11	17	17	11
A346	8	11	18	11	11	16	17	10
A347	9	12	17	10	11	17	18	11
A349	9	12	19	10	11	18	16	11
A350	8	12	18	12	12	18	12	15
A352	9	12	17	10	11	17	16	11
A353	8	12	17	11	11	17	15	12
A354	9	12	17	10	11	17	17	11
A355	9	12	18	10	11	18	17	11
A356	9	12	17	10	11	18	16	11
A357	8	13	18	11	13	18	14	10
A358	9	12	19	10	11	17	17	11
A359	8	12	22	11	12	16	18	10

Continua

Anexo 1. (continuação)

A360	9	12	17	10	11	18	17	12
A361	8	11	15	11	11	16	16	11
A363	9	11	18	10	11	17	17	11
A362	8	11	21	12	12	17	14	12
A364	9	12	17	10	11	17	16	11
A365	9	12	17	10	11	18	13	11
A366	8	11	19	12	11	20	16	10
A367	9	12	17	10	11	19	17	10
A369	9	12	18	11	11	18	17	11
A370	9	12	18	11	11	18	17	11
A371	8	11	20	12	12	19	14	12
A372	8	11	17	11	11	18	16	12
A373	9	12	18	10	11	18	17	11
A374	8	10	17	12	11	16	17	11
A376	8	11	22	12	12	17	15	10
A377	9	11	17	10	12	19	17	11
A378	8	11	20	11	11	18	14	11
A379	9	12	17	10	11	18	17	14
A380	9	12	17	10	11	18	17	10
A381	9	14	18	10	11	18	17	11
A382	9	12	18	10	11	18	16	11
A383	9	12	17	10	11	19	17	11
A384	9	12	19	10	11	18	16	11
A385	9	12	17	10	11	18	16	11
A386	8	12	19	11	12	14	16	10
A387	8	12	17	12	12	19	15	11

ANEXO 2. Haplótipos dos 98 pares pai/filho estudados para pesquisa de mutações

	(nº)	DYS632	DYS540	DYS570	DYS522	DYS556	DYS576	DYS504	DYS508
Par 1	P A001	9	13	17	10	11	17	17	11
	F A282	9	13	17	10	11	17	17	11
Par 2	P A002	8	10	18	11	11	16	18	10
	F A283	8	10	18	11	11	16	18	10
Par 3	P A003	9	12	18	10	11	18	17	11
	F A284	9	12	18	10	11	18	17	11
Par 4	P A004	9	12	14	10	11	17	17	11
	F A285	9	12	14	10	11	17	17	11
Par 5	P A005	8	11	18	12	13	16	15	12
	F A286	8	11	18	12	13	16	15	12
Par 6	P A006	9	11	17	10	12	19	17	11
	F A287	9	11	17	10	12	19	17	11
Par 7	P A007	9	12	17	10	11	18	17	11
	F A288	9	12	17	10	11	18	17	11
Par 8	P A008	8	11	20	12	11	18	16	12
	F A289	8	11	20	12	11	18	16	12
Par 9	P A010	8	12	17	11	12	18	16	10
	F A291	8	12	17	11	12	18	16	10
Par 10	P A011	9	12	15	10	11	19	16	12
	F A292	9	12	15	10	11	19	16	12
Par 11	P A012	9	13	18	10	11	18	17	10
	F A293	9	13	18	10	11	18	17	10
Par 12	P A013	8	11	22	12	12	17	15	11
	F A294	8	11	22	12	12	17	15	11
Par 13	P A014	8	13	17	11	12	17	16	10
	F A295	8	13	17	11	12	17	16	10
Par 14	P A015	9	12	17	10	12	18	17	11
	F A296	9	12	17	10	12	18	17	11
Par 15	P A016	9	12	17	11	11	18	17	11
	F A297	9	12	17	11	11	18	17	11

Continua

Anexo 2. (continuação)

Par 16	P	A017	9	12	17	10	11	19	17	11
	F	A298	9	12	17	10	11	19	17	11
Par 17	P	A018	9	12	17	10	11	19	17	11
	F	A299	9	12	17	10	11	19	17	11
Par 18	P	A019	9	12	17	10	11	17	17	11
	F	A300	9	12	17	10	11	17	17	11
Par 19	P	A020	8	11	18	12	11	18	18	10
	F	A301	8	11	18	12	11	18	18	10
Par 20	P	A021	9	12	17	10	11	17	16	11
	F	A302	9	12	17	10	11	17	16	11
Par 21	P	A022	8	9	15	12	12	16	16	10
	F	A303	8	9	15	12	12	16	16	10
Par 22	P	A023	9	12	16	11	11	17	17	11
	F	A304	9	12	16	11	11	17	17	11
Par 23	P	A024	8	11	18	11	11	17	17	10
	F	A305	8	11	18	11	11	17	17	10
Par 24	P	A025	9	12	18	10	11	18	16	11
	F	A306	9	12	18	10	11	18	16	11
Par 25	P	A026	8	10	18	12	12	18	17	11
	F	A307	8	10	18	12	12	18	17	11
Par 26	P	A027	8	12	21,2	12	11	17	16	11
	F	A308	8	12	21,2	12	11	17	16	11
Par 27	P	A033	8	11	20	12	12	19	15	12
	F	A309	8	11	20	12	12	19	15	12
Par 28	P	A041	9	12	17	10	11	19	17	11
	F	A310	9	12	17	10	11	19	17	11
Par 29	P	A042	9	12	17	10	11	18	17	11
	F	A311	9	12	17	10	11	18	17	11
Par 30	P	A044	9	12	18	9	11	17	18	11
	F	A312	9	12	18	9	11	17	18	11
Par 31	P	A056	9	12	17	10	11	17	17	11
	F	A314	9	12	17	10	11	17	17	11
Par 32	P	A058	8	11	18	11	11	16	15	10
	F	A315	8	11	18	11	11	16	15	10

Continua

Anexo 2. (continuação)

Par 33	P	A059	9	12	17	10	11	17	17	11
	F	A316	9	12	17	10	11	17	17	11
Par 34	P	A062	9	12	18	10	11	17	17	11
	F	A317	9	12	18	10	11	17	17	11
Par 35	P	A064	9	12	18	10	11	18	17	11
	F	A318	9	12	18	10	11	18	17	11
Par 36	P	A072	8	12	17	13	12	19	15	11
	F	A319	8	12	17	13	12	19	15	11
Par 37	P	A073	9	12	17	11	11	19	16	11
	F	A320	9	12	17	11	11	19	16	11
Par 38	P	A078	9	12	18	10	11	18	16	11
	F	A321	9	12	18	10	11	18	16	11
Par 39	P	A079	8	12	19	11	12	16	16	10
	F	A322	8	12	19	11	12	16	16	10
Par 40	P	A081	9	12	18	10	11	18	18	10
	F	A323	9	12	18	10	11	18	18	10
Par 41	P	A084	9	12	17	10	11	16	19	11
	F	A324	9	12	17	10	11	16	19	11
Par 42	P	A087	8	11	18	12	11	17	16	10
	F	A325	8	11	18	12	11	17	16	10
Par 43	P	A092	9	12	17	10	11	16	16	11
	F	A326	9	12	17	10	11	16	16	11
Par 44	P	A099	8	11	20	13	11	17	12	11
	F	A327	8	11	20	13	11	17	12	11
Par 45	P	A100	9	12	17	10	11	18	17	11
	F	A328	9	12	17	10	11	18	17	11
Par 46	P	A103	9	12	17	10	11	18	17	11
	F	A329	9	12	17	10	11	18	17	11
Par 47	P	A104	9	12	18	10	12	18	15	11
	F	A330	9	12	18	10	12	18	15	11
Par 48	P	A110	9	12	17	11	12	18	17	11
	F	A331	9	12	17	11	12	18	17	11
Par 49	P	A112	9	12	20	10	11	17	16	11
	F	A332	9	12	20	10	11	17	16	11

Continua

Anexo 2. (continuação)

Par 50	P	A114	9	12	17	10	11	19	17	11
	F	A333	9	12	17	10	11	19	17	11
Par 51	P	A117	8	13	17	11	12	16	15	11
	F	A334	8	13	17	11	12	16	15	11
Par 52	P	A121	9	12	17	10	11	18	17	11
	F	A335	9	12	17	10	11	18	17	11
Par 53	P	A122	9	12	17	10	11	19	17	12
	F	A336	9	12	17	10	11	19	17	12
Par 54	P	A139	9	11	17	10	11	17	17	12
	F	A337	9	11	17	10	11	17	17	12
Par 55	P	A141	9	12	17	12	11	20	17	12
	F	A338	9	12	17	12	11	20	17	12
Par 56	P	A143	9	12	16	10	11	20	17	11
	F	A340	9	12	16	10	11	20	17	11
Par 57	P	A144	9	12	17	10	11	17	17	11
	F	A341	9	12	17	10	11	17	17	11
Par 58	P	A147	9	12	17	10	11	18	17	11
	F	A342	9	12	17	10	11	18	17	11
Par 59	P	A150	8	11	24	12	12	17	15	11
	F	A343	8	11	24	12	12	17	15	11
Par 60	P	A153	8	12	18	12	12	19	15	11
	F	A344	8	12	18	12	12	19	15	11
Par 61	P	A155	9	12	17	10	11	17	17	11
	F	A345	9	12	17	10	11	17	17	11
Par 62	P	A162	8	11	18	11	11	16	17	10
	F	A346	8	11	18	11	11	16	17	10
Par 63	P	A165	9	12	17	10	11	17	18	11
	F	A347	9	12	17	10	11	17	18	11
Par 64	P	A169	9	12	19	10	11	18	16	11
	F	A349	9	12	19	10	11	18	16	11
Par 65	P	A171	8	12	18	12	12	18	12	15
	F	A350	8	12	18	12	12	18	12	15
Par 66	P	A179	9	12	17	10	11	17	16	11
	F	A352	9	12	17	10	11	17	16	11

Continua

Anexo 2. (continuação)

Par 67	P	A180	8	12	17	11	11	17	15	12
	F	A353	8	12	17	11	11	17	15	12
Par 68	P	A181	9	12	17	10	11	17	17	11
	F	A354	9	12	17	10	11	17	17	11
Par 69	P	A184	9	12	18	10	11	18	17	11
	F	A355	9	12	18	10	11	18	17	11
Par 70	P	A193	9	12	17	10	11	18	16	11
	F	A356	9	12	17	10	11	18	16	11
Par 71	P	A194	8	13	18	11	13	18	14	10
	F	A357	8	13	18	11	13	18	14	10
Par 72	P	A199	9	12	19	10	11	17	17	11
	F	A358	9	12	19	10	11	17	17	11
Par 73	P	A216	8	12	22	11	12	16	18	10
	F	A359	8	12	22	11	12	16	18	10
Par 74	P	A220	9	12	17	10	11	18	17	12
	F	A360	9	12	17	10	11	18	17	12
Par 75	P	A221	8	11	15	11	11	16	16	11
	F	A361	8	11	15	11	11	16	16	11
Par 76	P	A227	8	11	21	12	12	17	14	12
	F	A362	8	11	21	12	12	17	14	12
Par 77	P	A229	9	11	18	10	11	17-18?	17	11
	F	A363	9	11	18	10	11	17	17	11
Par 78	P	A232	9	12	17	10	11	17	16	11
	F	A364	9	12	17	10	11	17	16	11
Par 79	P	A236	9	12	17	10	11	18	13	11
	F	A365	9	12	17	10	11	18	13	11
Par 80	P	A237	8	11	19	12	11	20	16	10
	F	A366	8	11	19	12	11	20	16	10
Par 81	P	A238	9	12	17	10	11	19	17	10
	F	A367	9	12	17	10	11	19	17	10
Par 82	P	A241	9	12	18	11	11	18	17	11
	F	A369	9	12	18	11	11	18	17	11
Par 83	P	A242	8	11	20	12	12	19	14	12
	F	A371	8	11	20	12	12	19	14	12

Continua

Anexo 2. (continuação)

Par 84	P	A243	8	11	17	11	11	18	16	12
	F	A372	8	11	17	11	11	18	16	12
Par 85	P	A244	9	12	18	10	11	18	17	11
	F	A373	9	12	18	10	11	18	17	11
Par 86	P	A245	8	10	17	12	11	16	17	11
	F	A374	8	10	17	12	11	16	17	11
Par 87	P	A248	8	11	22	12	12	17	15	10
	F	A376	8	11	22	12	12	17	15	10
Par 88	P	A255	9	11	17	10	12	19	17	11
	F	A377	9	11	17	10	12	19	17	11
Par 89	P	A256	8	11	20	11	11	18	14	11
	F	A378	8	11	20	11	11	18	14	11
Par 90	P	A257	9	12	17	10	11	18	17	14
	F	A379	9	12	17	10	11	18	17	14
Par 91	P	A263	9	12	17	10	11	18	17	10
	F	A380	9	12	17	10	11	18	17	10
Par 92	P	A264	9	14	18	10	11	18	17	11
	F	A381	9	14	18	10	11	18	17	11
Par 93	P	A265	9	12	18	10	11	18	16	11
	F	A382	9	12	18	10	11	18	16	11
Par 94	P	A269	9	12	17	10	11	19	17	11
	F	A383	9	12	17	10	11	19	17	11
Par 95	P	A272	9	12	19	10	11	18	16	11
	F	A384	9	12	19	10	11	18	16	11
Par 96	P	A274	9	12	17	10	11	18	16	11
	F	A385	9	12	17	10	11	18	16	11
Par 97	P	A277	8	12	19	11	12	14	16	10
	F	A386	8	12	19	11	12	14	16	10
Par 98	P	A279	8	12	17	12	12	19	15	11
	F	A387	8	12	17	12	12	19	15	11