

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**FREQÜÊNCIA ALÉLICA DE 14 LOCOS DO CROMOSSOMO X DE
INDIVÍDUOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Larissa Siqueira Penna

Orientador: Prof. Dr. José Antônio de Azevedo Magalhães

Dissertação de Mestrado

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**FREQÜÊNCIA ALÉLICA DE 14 LOCOS DO CROMOSSOMO X DE
INDIVÍDUOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Larissa Siqueira Penna

Orientador: Prof. Dr. José Antônio de Azevedo Magalhães

Dissertação de Mestrado

2010

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Antônio Magalhães pela sua orientação, dedicação e pela contribuição imensurável à minha formação acadêmica.

Ao Professor Luiz Fernando Jobim, pela confiança, atenção, sugestão do tema para a realização do Mestrado e por ter aberto as portas do laboratório para o desenvolvimento do projeto.

Às minhas incansáveis colaboradoras, Fernanda Gamio Silva e Gisele Ewald, essenciais para a realização desse trabalho e com quem muito aprendi.

À colega e amiga Patrícia Salim, pela disponibilidade, dedicação e pelo essencial auxílio em estatística e demais partes do trabalho.

À professora Sidia Callegari pela assistência com as análises estatísticas.

A todos os colegas do Serviço de Imunologia, pela compreensão e auxílio.

Aos meus amigos e familiares que, mesmo muitas vezes distantes, torceram por mim e fazem parte desta conquista!

À minha sobrinha querida, pela alegria que soma à minha vida.

Aos meus pais e aos meus irmãos pelo amor, carinho, estímulo, apoio incondicional e paciência durante estes anos.

Ao FIPE-HCPA e CAPES, pelo auxílio financeiro.

“É absolutamente certo que neste mundo
nunca se consegue o possível se não se tentar,
constantemente, fazer o impossível”

Max Webber

Dedicatória

Aos meus pais, Geraldo e Marindia,
pelo incentivo na busca do conhecimento,
por terem sempre colocado os estudos entre as prioridades,
pelo amor incondicional e pelos valores ensinados.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
JUSTIFICATIVA	16
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1 Estrutura do genoma humano.....	17
1.2 DNA repetitivo não codificador.....	19
1.3 Técnica de PCR aplicada aos microssatélites e análise por eletroforese capilar.....	21
1.4 Aplicações dos microssatélites na atualidade.....	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Amostras.....	29
3.2 Extração de DNA.....	30
3.3 Amplificação.....	30
3.4 Identificação dos Alelos com Seqüenciador ABI 3100 Avant	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
4. ARTIGO ORIGINAL	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
APÊNDICE	72
A – TABELAS COMPLEMENTARES DO ARTIGO	72
B – GRÁFICOS COMPLEMENTARES.....	86

ANEXOS..... 94

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HCPA 9494

ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: *Deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucléico

F_{ST}: *Fixation Indices* – Índice de fixação

GEP-ISFG: Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense

HET: *Expected heterozygosity* – Heterozigose esperada

HWE: *Hardy Weinberg equilibrium* – Equilíbrio de Hardy Weinberg

LD: *Linkage disequilibrium* – Desequilíbrio de ligação

MDS: *Multidimensional scaling* - Escalonamento multidimensional

MEC_{duo}: *Mean exclusion chance in father/daughter cases* – Chance de exclusão média na ausência da mãe (casos com pai e filha)

MEC_{trio}: *Mean exclusion chance in trios involving daughters* – Chance de exclusão média em trios envolvendo filhas

OR: *Odds Ratio* – Razão de chances

PCR: *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PD_F: *Power of discrimination in females* – Poder de discriminação em mulheres

PD_M: *Power of discrimination in males* – Poder de discriminação em homens

PIC: *Polymorphism information content* – Conteúdo de informação polimórfica

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism* – Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

STRs: *Short tandem repeats* – Repetições curtas consecutivas

VNTRs: *Variable number of tandem repeats* – Número variável de repetições consecutivas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Composição do DNA	p. 18
Figura 2	Estrutura do DNA – Íntrons e Éxons	p. 19
Figura 3	STRs	p. 20
Figura 4	Amplificação do segmento de DNA	p. 22
Figura 5	Eletroforese Capilar	p. 24
Figura 6	Localização dos STRs no cromossomo X	p. 27
Figura 7	Cidades dos indivíduos estudados	p. 29
Figura 8	Cartão FTA [®]	p. 30
Figura 9	Eletroferograma da K562 para o Multiplex1	p. 35
Figura 10	Eletroferograma da K562 para o Multiplex2	p. 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos <i>primers</i> utilizados	p. 32
Tabela 2	Localização citogenética e número de nucleotídeos dos STRs	p. 32
Tabela 3	Perfil da K562	p. 34

RESUMO

Dois sistemas para amplificação simultânea de *short tandem repeats* (STRs) do cromossomo X foram desenvolvidos neste trabalho. O *Multiplex 1* foi composto por HPRTB, DXS101, DXS7424, DXS6807, DXS6800 e GATA172D05 e o *Multiplex 2* foi composto por DXS8378, DXS7133, DXS9898, DXS7423, DXS6809, DXS6789, DXS8377 e DXS6801. Além do desenvolvimento de dois sistemas *multiplex*, nós apresentamos, neste estudo, a frequência alélica para esses locos na população do Rio Grande do Sul, Brasil. A amostra foi composta por um total de 266 indivíduos, sendo 125 mulheres e 141 homens. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi testado na amostra feminina e não foram encontrados desvios significativos após a correção de Bonferroni. Os testes de desequilíbrio de ligação (LD) foram realizados para todos os pares de locos e três resultados significativos, após a correção de Bonferroni, de 91 comparações, foram obtidos entre DXS101 e DXS8377 ($P < 0,001$), DXS7133 e DXS6809 ($P < 0,001$) e DXS7423 e DXS6809 ($P < 0,001$). O poder de discriminação em mulheres (PD_F) variou entre 0,832 para DXS6801 e 0,987 para DXS8377. DXS6801 foi o marcador menos informativo ($PIC = 0,605$), enquanto o DXS8377 foi o loco mais polimórfico ($PIC = 0,911$), seguido pelo DXS101 ($PIC = 0,872$).

PALAVRAS-CHAVE: Cromossomo X. STRs. Frequência alélica. Rio Grande do Sul. Brasil

ABSTRACT

We developed two multiplex systems for the coamplification of X-chromosomal short tandem repeats (STRs). X-Multiplex 1 consisted of HPRTB, DXS101, DXS7424, DXS6807, DXS6800 and GATA172D05 and X-Multiplex 2 consisted of DXS8378, DXS7133, DXS9898, DXS7423, DXS6809, DXS6789, DXS8377 and DXS6801. In addition, we present allele frequencies for this loci in a south Brazilian population comprising 125 females and 141 males. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested in the female sample and no significant deviations were found, after applying Bonferroni's correction. Linkage disequilibrium (LD) tests were performed for all pairs of loci and three significant results, even after applying Bonferroni's correction, out of 91 pairwise comparisons, were obtained between DXS101 and DXS8377 ($P < 0.001$), DXS7133 and DXS6809 ($P < 0.001$) and DXS7423 and DXS6809 ($P < 0.001$). The power of discrimination in females (PD_F) varied between 0,832 for DXS6801 and 0,987 for DXS8377. DXS6801 was the least informative marker ($PIC=0,605$), while DXS8377 was the most polymorphic ($PIC=0,911$), followed by DXS101 ($PIC=0,872$).

KEYWORDS: X-chromosome. STRs. Population data. Rio Grande do Sul. Brazil

INTRODUÇÃO

A análise de microssatélites do DNA, conhecidos como STRs (*short tandem repeats* ou repetições curtas consecutivas) vem sendo amplamente utilizada na identificação humana, em casos de investigação de paternidade ou maternidade e especialmente em casos forenses como estupro, identificação de corpos em crimes ou acidentes em massa.

A utilização de STRs na identificação genética possibilita a amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) de diversos marcadores no mesmo tubo de reação (sistema *multiplex*), tornando o procedimento mais rápido, fácil e de custo mais acessível, além de possibilitar a amplificação de DNA a partir de uma quantidade mínima de amostra devido à sua elevada sensibilidade.

Os STRs autossômicos são comumente aplicados na rotina laboratorial de identificação humana. Contudo, STRs dos cromossomos sexuais vêm revelando sua eficiência em complementar as análises de microssatélites autossômicos. Os STRs do cromossomo X estão emergindo como uma ferramenta útil no campo forense. Como o pai possui apenas um cromossomo X, somente este pode ser transmitido às suas filhas. Sendo assim, STRs do X são particularmente úteis em casos de paternidade inconclusivos quando a criança é do sexo feminino. Esses microssatélites também são úteis na investigação de maternidade.

Portanto, o presente trabalho tem o objetivo de desenvolver dois sistemas *multiplex* com um total de 14 marcadores STRs do cromossomo X para formação de

um banco de dados de frequências alélicas de indivíduos da região Sul do Brasil. Este projeto contou com o apoio financeiro do FIPE (Fundo de Investimento a Pesquisa e Eventos do HCPA) e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA, sob o número 09-169.

JUSTIFICATIVA

Apesar de muitos STRs do cromossomo X estarem validados para a utilização forense, pouco conhecemos sobre a variação desses polimorfismos em diferentes populações. A maior parte das investigações foi conduzida em populações da Europa e Ásia, enquanto são raros os estudos em populações da África e América Latina.

Existe a necessidade de estudos de frequências alélicas para o conhecimento desses locos. Esses dados são importantes nos estudos estatísticos em genética forense, motivo da relevância da realização de análise do DNA do cromossomo X na região Sul do Brasil. Assim, será possível estabelecer um banco de dados de referência para estudos antropológicos e casos forenses.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Estrutura do genoma humano

O genoma humano é o conjunto total de ácido desoxirribonucléico (DNA) existente nas células humanas. O genoma nuclear, que compreende a quase totalidade do DNA humano, está contido nos 22 pares de cromossomos autossômicos e no par de cromossomos sexuais^{1,2}.

A estrutura do DNA possui uma configuração helicoidal, com duas longas cadeias antiparalelas compostas por nucleotídeos^{3, 4, 5}. Cada nucleotídeo é composto por um açúcar desoxirribose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada. Existem quatro tipos de bases nitrogenadas que compõem o DNA: citosina (C) e timina (T) que são denominadas pirimidinas e adenina (A) e guanina (G) que são denominadas purinas, sendo que a adenina liga-se (pareia-se) especificamente com a timina e a citosina especificamente com a guanina (Figura 1)^{1, 5-10}.

A seqüência de nucleotídeos codifica a seqüência de aminoácidos através dos códons. Cada conjunto de três bases nitrogenadas constitui um códon específico para um determinado aminoácido e a seqüência de aminoácidos determina a estrutura das proteínas^{3, 9, 8}.

No entanto, somente cerca de 3 a 5% do conteúdo total de DNA codifica proteínas. Essas seqüências codificadoras são intercaladas por extensas seqüências de DNA inativo (não codificador)^{2, 5, 10}. As regiões do DNA que codificam proteínas são chamadas de éxons e as regiões que não codificam proteínas, pois

são removidas após a transcrição do DNA, são chamadas de íntrons (Figura 2)^{2, 3, 7, 8}. Os íntrons apresentam tamanho variável que pode ser de 50 até 10000 nucleotídeos, considerando-se que, em muitos casos, o tamanho cumulativo dos íntrons é muito maior do que o dos éxons^{1-3, 10}. Os íntrons contêm uma grande proporção de DNA repetitivo (grupos de pares de bases que se repetem, lado a lado). O DNA de cópia única constitui aproximadamente 50% do genoma humano. O genoma restante é composto por seqüências de DNA repetitivo que se intercalam com DNA de cópia única. A função da maior parte desse DNA repetitivo ainda não é conhecida, porém, aparentemente uma pequena parte dele atua na estabilização da estrutura do cromossomo^{1, 6, 8, 10}.

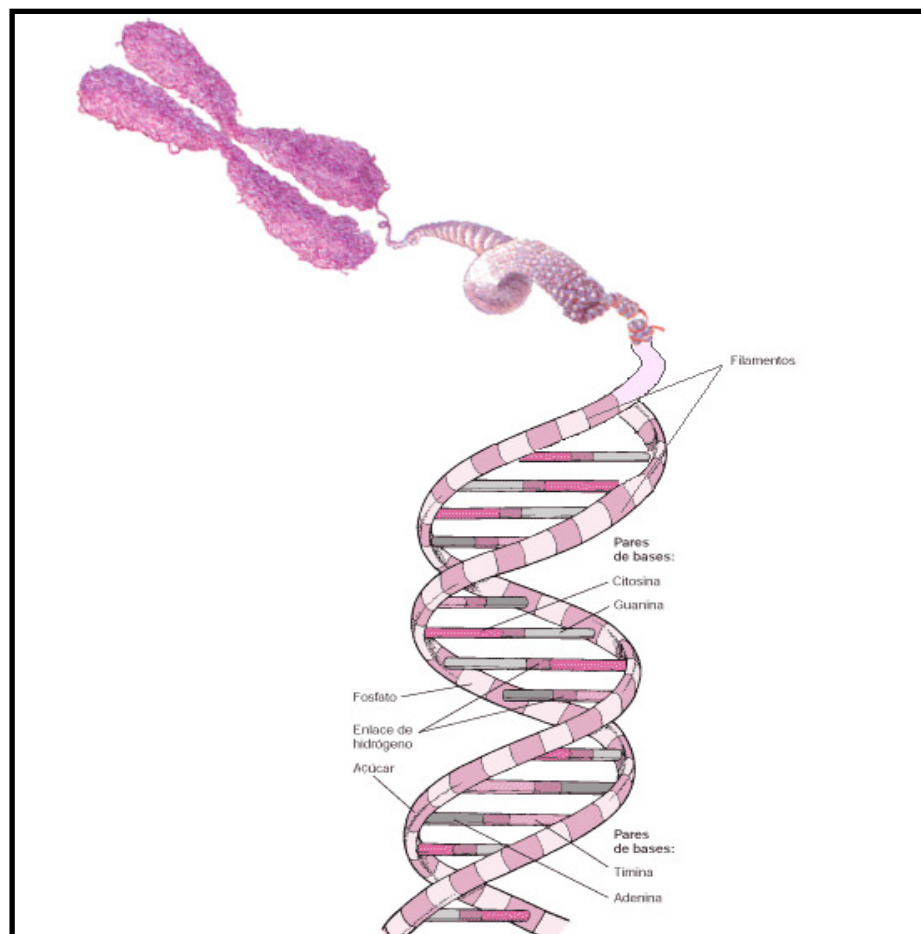


Figura 1. Cromossomo composto pela dupla fita de DNA, que por sua vez é formada pelo pareamento das bases adenina, timina, guanina e citosina (figura adaptada^{11,12}).

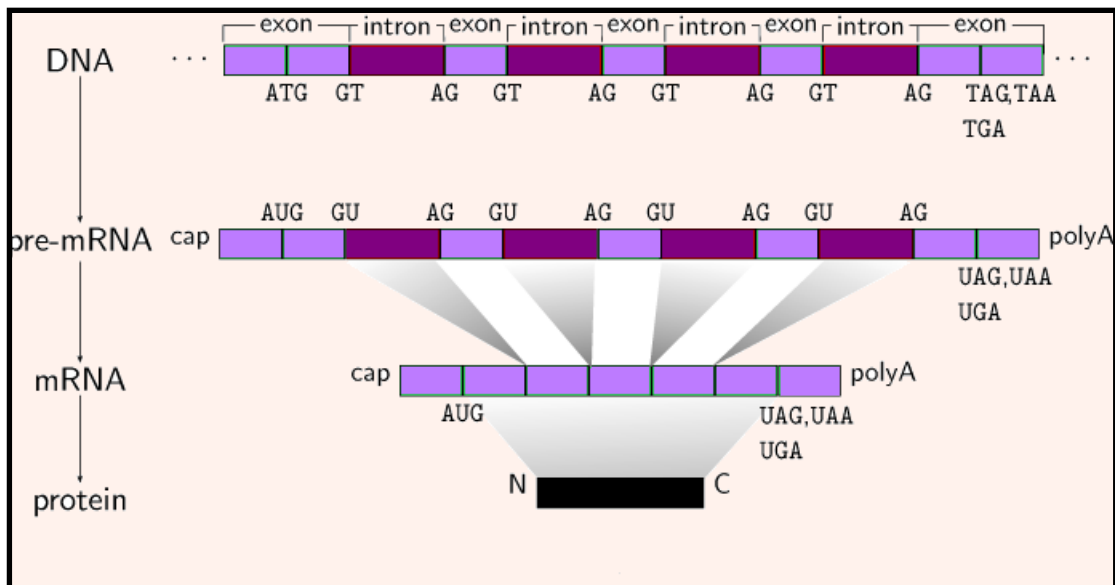


Figura 2. Estrutura do DNA composta por íntrons e éxons. Os íntrons são removidos após a transcrição, os éxons são unidos e então as proteínas são codificadas¹³.

1.2 DNA repetitivo não codificador

O DNA repetitivo não codificador pode ser classificado em DNA repetitivo disperso ou DNA satélite^{3, 5, 8, 10}. O DNA repetitivo disperso é composto por seqüências não agrupadas, mais complexas, espalhadas em numerosas localizações no genoma⁵. Já o DNA satélite possui seqüências agrupadas que constituem de 10 a 15% do genoma^{8, 10}. O DNA satélite é composto por seqüências altamente repetitivas simples ou moderadamente complexas. As repetições deste tipo de DNA ocorrem em *tandem*, ou seja, de maneira consecutiva^{4, 6, 10} e sua classificação é realizada segundo a localização no genoma, número total de repetições e comprimento das unidades repetidas^{2, 8}. O DNA satélite pode ser agrupado em duas subclasses principais: minissatélites ou VNTRs (*variable number*

of tandem repeats ou número variável de repetições consecutivas) e microssatélites ou STRs (*short tandem repeats* ou repetições curtas consecutivas)^{2, 5}.

As diferentes variações no número de repetições do DNA em um determinado local do cromossomo (loco) são chamados de alelos (Figura 3), que constituem o que é conhecido como polimorfismo genético. Nos indivíduos, em cada loco há dois alelos, com exceção dos cromossomos sexuais no sexo masculino, que apresentam um alelo em cada loco tanto no cromossomo X quanto no cromossomo Y. Quando dois alelos são idênticos, o indivíduo é homocigoto e quando são diferentes ele é heterocigoto para esse loco².

[AATC] ₇	Alelo 7
[AATC] ₈	Alelo 8
[AATC] ₉	Alelo 9
[AATC] ₁₀	Alelo 10
[AATC] ₁₁	Alelo 11
[AATC] ₁₂	Alelo 12

Figura 3. Os STRs são repetições curtas consecutivas que vão determinar o alelo de cada indivíduo de acordo com o número de repetições.

Os minissatélites possuem seqüências repetitivas de tamanho médio (de 10 a 100pb) cujo número de repetições pode variar consideravelmente nas populações, desde duas até vinte ou mais repetições^{5, 7, 8, 10}.

Os microssatélites consistem de pequenas repetições, em geral de 1 a 4 nucleotídeos, que são substancialmente menores do que as repetições de minissatélites e são encontradas em abundância no DNA. Geralmente são observados até 30 alelos em uma população para apenas um loco^{1, 4-6, 14}. Como os

locos de microssatélites são geralmente bastante polimórficos, muitas vezes, a probabilidade de que um indivíduo seja heterozigoto fica acima de 70%⁸.

A análise de diversos fragmentos de DNA, contendo repetições em *tandem*, permite uma poderosa discriminação entre indivíduos. Os minissatélites possuem locos mais polimórficos do que os microssatélites. Geralmente, enquanto 5 locos de VNTRs são suficientes para obtenção de resultados satisfatórios na identificação humana, cerca de 12 ou mais locos de STRs são necessários para o mesmo resultado¹⁵⁻¹⁷. Contudo, os microssatélites vêm substituindo os minissatélites, pois possuem diversas vantagens. A análise de VNTRs é baseada no método de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism* ou polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), *Southern Blot* e hibridização com sondas de DNA, o que torna a técnica extremamente demorada. Os minissatélites possuem seqüências mais longas que os STRs, sendo necessárias amostras de DNA não degradadas para sua análise. Já os microssatélites, são baseados na rápida e prática tecnologia de PCR, que requer uma menor concentração de DNA. Devido ao seu pequeno tamanho, o STR pode ser utilizado para análise de amostras de DNA escassas ou parcialmente degradadas. Outra vantagem, é a de que como vários locos de STRs podem ser analisados em uma única reação, a quantidade necessária de DNA é menor¹⁶⁻¹⁸.

1.3 Técnica de PCR aplicada aos microssatélites e análise por eletroforese capilar

A PCR é um método específico, sensível, simples e rápido utilizado para amplificação do DNA (Figura 4). Esta técnica é capaz de amplificar milhões de

cópias de uma seqüência específica em poucas horas, até mesmo a partir de quantidades mínimas de DNA^{5, 6, 9, 10}. A reação de amplificação deve ser composta pela mistura de enzima DNA polimerase, dois oligonucleotídeos iniciadores marcados com corantes fluorescentes (*primers*), desoxirribonucleotídeos livres (A, G, T, C), tampão de reação, concentração apropriada de cloreto de magnésio e o DNA alvo a ser amplificado⁹.

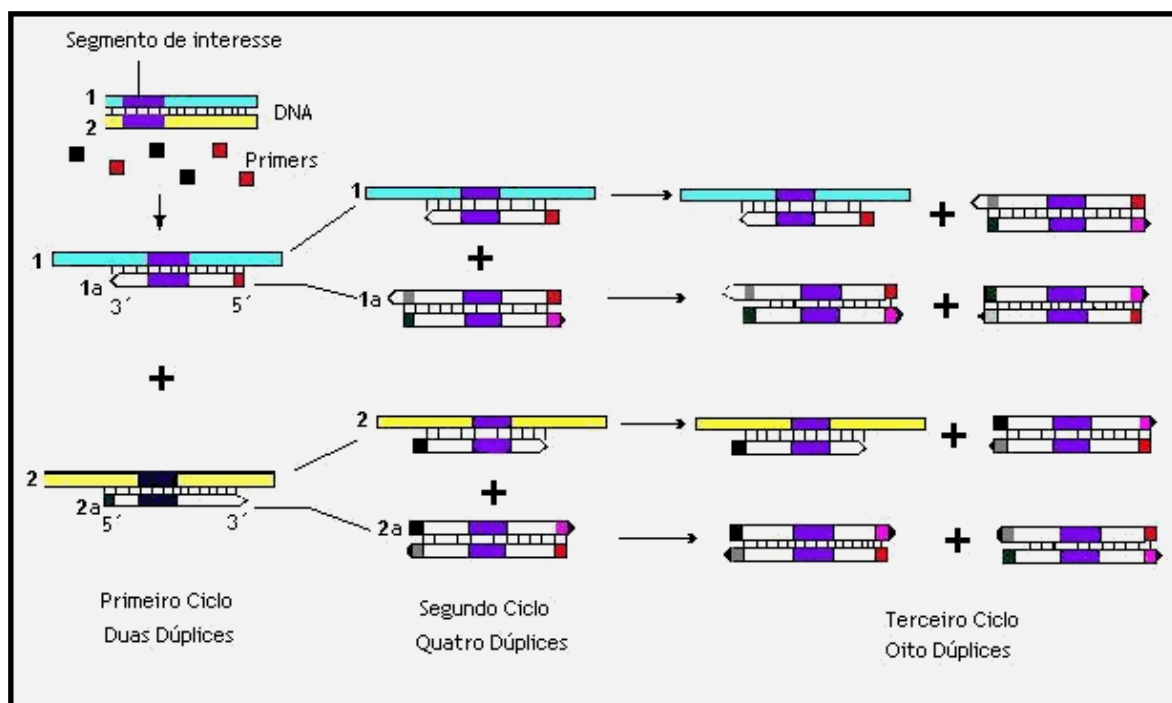


Figura 4. Ilustração esquemática da amplificação do segmento de DNA a cada ciclo¹⁹.

O processo de PCR é composto por três etapas básicas. A primeira etapa consiste no aquecimento da mistura dos componentes (aproximadamente 95°C) e é denominada desnaturação. Nesta etapa, as fitas de DNA separam-se tornando-se unifilamentares. A segunda etapa consiste na redução da temperatura (entre 40 e

72°C) para anelamento dos *primers* às seqüências de DNA complementares ao seu sítio-alvo. Os *primers* são seqüências sintéticas e específicas que geralmente apresentam de 15 a 30 nucleotídeos e que flanqueiam a região alvo de determinado microssatélite. Um dos *primers* é complementar a um filamento de DNA de um lado da região alvo e o outro é complementar ao outro filamento de DNA no lado oposto da região alvo. Finalmente, a terceira etapa consiste na extensão da cadeia de DNA a uma temperatura, geralmente, de 72°C. A presença de desoxirribonucleotídeos permite que uma nova fita de DNA, complementar ao DNA do segmento alvo, seja sintetizada pela enzima DNA polimerase, estendendo-se a partir da seqüência do *primer*. A enzima Taq DNA polimerase é geralmente utilizada nesse procedimento por ser resistente às altas temperaturas necessárias na desnaturação do DNA. A amplificação ocorre exponencialmente, duplicando a quantidade de produto formado a cada ciclo. Milhares de cópias da seqüência alvo são obtidas, após 30 a 40 ciclos.^{1, 5, 6, 8-10, 20}

A escolha de STRs para identificação genética permite a elaboração de sistemas *multiplex* para amplificação simultânea de diversos locos, acelerando os procedimentos laboratoriais, além de facilitar a análise de amostras que contêm baixa concentração de DNA²¹. Essa metodologia requer que a temperatura de anelamento dos *primers* seja semelhante e que os tamanhos dos fragmentos analisados sejam distintos quando marcados com o mesmo fluorocromo, ou seja, não podem se sobrepor^{17, 22-24}.

Atualmente, com a automação, uma das técnicas de grande destaque para avaliação dos produtos amplificados é a eletroforese capilar¹. Nesta técnica, cada amostra, já amplificada pela PCR, é processada em cerca de 30 minutos e os

produtos da PCR são separados por tamanho e cor do fluorocromo, utilizando eletroforese seguida por detecção baseada na fluorescência induzida por laser²⁵.

Uma voltagem é aplicada por um determinado tempo, para mover as moléculas da amostra através do polímero presente no capilar. Moléculas de DNA menores se deslocarão mais rápido do que moléculas maiores. Quando os fragmentos de DNA alcançam a janela de detecção, as moléculas marcadas com corantes são excitadas pelo laser, emitindo fluorescência. As emissões de fluorescência são coletadas simultaneamente e espectralmente separadas por um espectrógrafo reflexivo. Essas emissões são centradas como colunas de luz no dispositivo de carga acoplada. Um padrão interno, contendo fragmentos de DNA de tamanho conhecido e marcado com corante diferente, deve ser processado por eletroforese junto com cada amostra. Os dados, coletados na forma de eletroferogramas, são analisados por um *software* que automaticamente determina o tamanho dos alelos com base no padrão interno (Figura 5)²⁵.

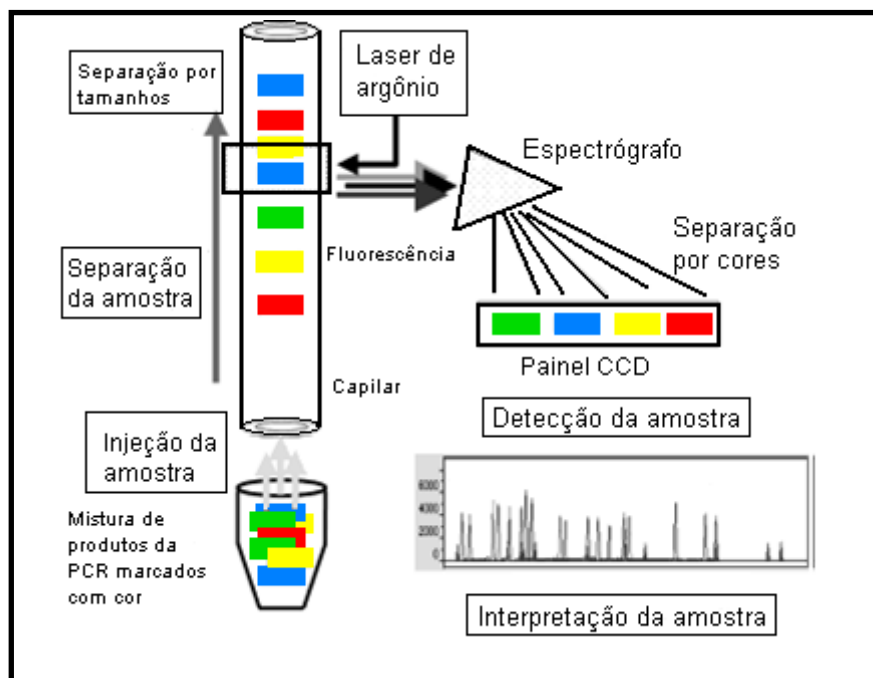


Figura 5. Funcionamento da eletroforese capilar²⁵.

1.4 Aplicações dos microssatélites na atualidade

Devido ao seu alto poder de discriminação entre indivíduos e praticidade, a análise de STRs se tornou rotina em testes de parentesco e genética forense²⁶. A sensibilidade, maior polimorfismo, elevado índice de discriminação e heterozigose são características importantes na escolha de determinados STRs para fins forenses¹⁷.

STRs localizados nos cromossomos autossômicos são os marcadores de escolha na investigação de paternidade. No entanto, em alguns casos complexos, independentemente do número de polimorfismos analisados, os marcadores autossômicos expressam muito pouca informação. Por esse motivo, atualmente, a genética forense vem também enfocando os polimorfismos gonossômicos²⁷⁻³⁶.

O cromossomo Y de um pai é transmitido para a descendência masculina, enquanto seu cromossomo X é transmitido para a descendência feminina, tornando a análise de polimorfismos gonossômicos altamente útil para casos especiais de teste de parentesco^{28, 30, 37}. Em casos forenses, onde a vítima não pode ser identificada pela necrópsia, caso seja do sexo feminino, a análise do perfil genético do cromossomo X permitirá a sua identificação por comparação com a tipagem do suposto pai, pois todos os alelos do cromossomo X do pai deverão estar presentes no DNA da filha.

Os marcadores STRs do cromossomo X são capazes de complementar, eficientemente, a análise de STRs de Y e autossômicos, como em testes de paternidade envolvendo trios comuns de mãe, suposto pai e filha^{21, 34, 35, 38-42}. A análise de STRs do X resulta em uma maior probabilidade de exclusão de uma falsa

paternidade em trios em que a criança é menina (MEC ou *mean exclusion chance*) do que para locos autossômicos^{38, 40, 43-46} além de aumentar a capacidade de discriminação dos STRs autossômicos nas análises de parentesco que envolvem pares de indivíduos, fornecendo um poder estatístico mais elevado nessas situações especiais¹⁷. Esse é o caso de testes de relação entre suposto pai e filha e suposta mãe e filho. Já para testes de parentesco entre mãe e filha, os marcadores do cromossomo X não fornecem nenhuma vantagem específica^{47, 78}. A maior vantagem da utilização de STRs do X ocorre em casos em que o DNA do suposto pai não está disponível, sendo necessária, então, a análise do DNA de seus parentes. Isso é possível através da confirmação da relação genética entre avó paterna e neta e entre filhas do mesmo pai, pois compartilham ao menos um alelo idêntico em cada loco desse cromossomo^{30, 32, 33, 47-49}.

Para interpretar os resultados da análise de DNA nos casos forenses, os STRs do cromossomo X precisam ser comparados com uma população de referência⁵⁰. A maioria dos estudos de marcadores STRs do X foram realizados em populações asiáticas^{26, 28-31, 33, 46, 49, 51-62} e populações européias^{21, 27, 32, 37, 38, 43-45, 50, 63-76}, enquanto poucos estudos em populações africanas^{42, 77} e populações latino americanas^{36, 78-84}. Muitos STRs do cromossomo X foram validados para o uso forense (Figura 6), porém, mais estudos de freqüências alélicas são necessários na avaliação dos polimorfismos em diferentes populações e no estabelecimento de um banco de dados útil para aplicações forenses e para estudos antropológicos³⁸.

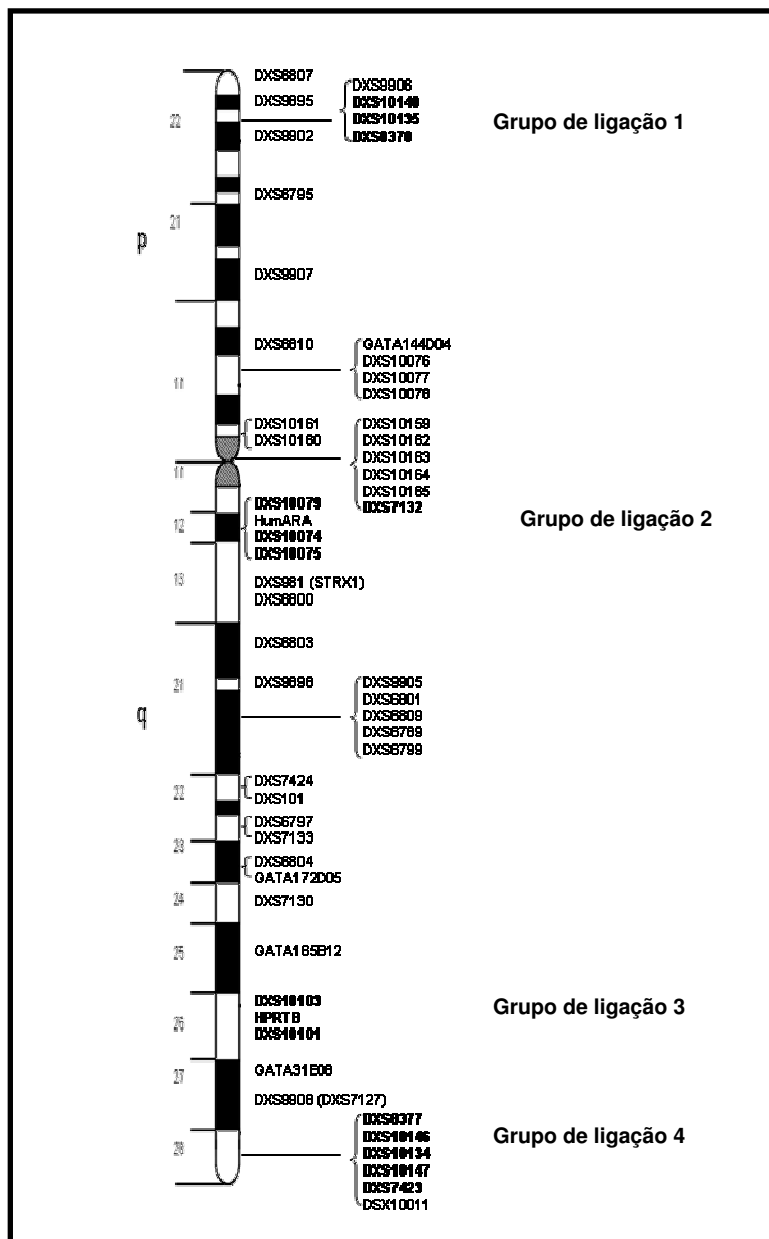


Figura 6. STRs do cromossomo X e sua localização⁸⁵.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as frequências alélicas de 14 marcadores STRs do cromossomo X da população do Rio Grande do Sul.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver dois sistemas *multiplex* com um total de 14 marcadores STRs do cromossomo X;
- Comparar as frequências alélicas dos STRs estudados com diversas populações do mundo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Amostras de sangue periférico em cartão FTA[®] de 266 indivíduos (125 mulheres e 141 homens) de diferentes cidades do Rio Grande do Sul (Figura 7), foram selecionadas, evitando parentesco entre os participantes.

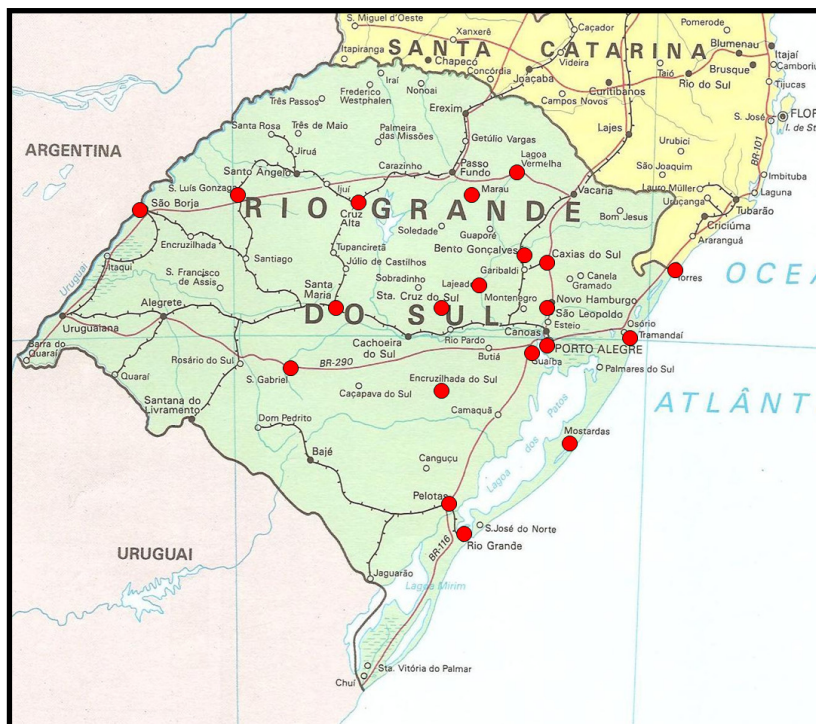


Figura 7. Localização das principais cidades dos indivíduos estudados (figura adaptada⁸⁶).

A coleta destas amostras foi realizada por punção digital com lanceta. As gotas de sangue foram adicionadas no cartão, lado a lado, sem deixar espaços em branco até que boa parte do círculo estivesse coberta com sangue (Figura 8).



Figura 8. Cartão FTA®.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA, a partir do cartão FTA®, baseia-se na lise de células, liberando ácido nucléico que fica aderido no interior da matriz do cartão. Esse procedimento é realizado com reagente de purificação FTA® Whatman e água ultrapura, pela lavagem de impurezas e inibidores, deixando o DNA imobilizado nas fibras de celulose.

A extração do DNA das amostras deste estudo foi realizada com a seguinte técnica: dois discos de 2.0mm foram cortados do papel filtro, utilizando-se Harris Micro-Punch®, colocados em um tubo de 0,2mL e submetidos a duas lavagens de 30 minutos, com agitação manual por inversão a cada 5 minutos, uma com 200µL de reagente de purificação FTA® Whatman e outra com 200µL de água ultrapura. Após as duas lavagens, os discos contendo DNA secaram em temperatura ambiente por algumas horas antes da amplificação.

3.3 Amplificação

A técnica de PCR permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado milhares de vezes em apenas algumas horas e é constituída por 3

etapas: desnaturação, anelamento e extensão da cadeia de DNA. A partir desta técnica é possível obter-se cópias da seqüência alvo do estudo em quantidade suficiente para sua análise.

A amplificação do DNA presente nos dois discos de cartão FTA[®] foi realizada em uma reação de 7,5µL, composta por 6,25µL do Qiagen Multiplex PCR Kit e 1,25µL da mistura de *primers* para cada *multiplex*. Porém, essa reação também pode ser realizada em um volume final de 12,5µL contendo 6,25µL do Qiagen Multiplex PCR Kit, 1,25µL da mistura de primers e 5µL de DNA extraído (10 a 15 ng de DNA), sem ser necessário ajustar a concentração dos *primers* tanto utilizando DNA extraído em solução quanto DNA extraído em discos na reação de PCR. Os 14 marcadores STRs do cromossomo X foram escolhidos, procurando-se selecionar os mais polimórficos, com temperatura de anelamento semelhante e com tamanho do fragmento que permitissem seu agrupamento em dois sistemas *multiplex*. A seqüência, concentração e marcador fluorescente de cada *primer*, bem como a variação do tamanho dos alelos de cada loco, estão apresentados na Tabela 1 e a localização citogenética e número de nucleotídeos que compõe cada repetição dos marcadores analisados estão apresentados na Tabela 2.

O programa de amplificação do *Multiplex 1* consistiu em uma desnaturação inicial de 15 minutos a 95°C, seguida por 30 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 63°C (temperatura de anelamento) e 60 segundos a 72°C, com uma extensão final de 1 hora e 30 minutos a 72°C. O programa de amplificação do *Multiplex 2* consistiu em uma desnaturação inicial de 15 minutos a 95°C, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 59°C (temperatura de anelamento)

e 60 segundos a 72°C, além de uma extensão final de 1 hora a 72°C no Termociclador Technne CT-412.

Tabela 1. Seqüência, marcador fluorescente, concentração e tamanho do fragmento (pb) de cada *primer* utilizado.

Loco STR do cromossomo X	Marcador fluorescente	Sense (5'-3')	Anti sense (5'-3')	Concentração* (µM)	Tamanho do fragmento (pb)	Ref.
X-Multiplex 1						
DXS6800	NED	GTGGGACCTTGATTGTGT	CTGGCTGACACTTAGGGAAA	1	194 - 218	[87]
DXS6807	FAM	GAGCAATGATCTCATTGCA	AAGTAAACATGTATAGGAAAAAGCT	5	247 - 275	[88]
GATA172D05	PET	TAGTGGTGATGGTTGCACAG	ATAATTGAAAGCCCGGATTC	3	108 - 136	[87]
DXS7424	FAM	CTGCTTGAGTCCAGGAATCAA	GAACACGCACATTTGAGAACATA	1,5	145 - 175	[43]
HPRTB	VIC	TCTCTATTTCCATCTCTGTCTCC	TCACCCCTGTCTATGGTCTCG	2	144 - 176	[27]
DXS101	VIC	ACTCTAAATCAGTCCAAATATCT	AAATCACTCCATGGCACATGTAT	7	180 - 220	[89]
X-Multiplex 2						
DXS8378	VIC	TTAGGCAACCCGGTGGTCC	ACAAGAACGAAACTCCAACCTC	5	110 - 134	[87]
DXS7133	FAM	GCTTCCTTAGATGGCATTCA	CTTCCAAGAATCAGAAGTCTCC	2	104 - 132	[87]
DXS9898	FAM	CGAGCACACCTACAAAAGCT	TCGATTAGGTTCAAGTCCCA	4,5	188 - 215	[90]
DXS7423	NED	GTCTTCCTGTCTCTCCCAAC	TAGCTTAGCGCCTGGCACATA	2	175 - 199	[87]
DXS6809	NED	TGAACCTTCCTAGCTCAGGA	TCTGGAGAATCCAATTTTGC	5	235 - 279	[21]
DXS6789	PET	GTTGGTACTTAATAAACCTCTTT	AAGAAGTATTTGATGTCTATTGT	4	154 - 198	[63]
DXS8377	PET	CACCTTATGGCTTACCACAG	GACCTTTGAAAGCTAGTGT	5	207 - 252	[87]
DXS6801	PET	CATTTCTCTAACAAGTCTCC	CAGAGAGTCAGAATCAGTAG	1	113 - 137	[66]

* Concentração na mistura de *primers*

Tabela 2. Localização citogenética e número de nucleotídeos que compõe cada repetição dos marcadores estudados⁸⁵.

MARCADOR	LOCALIZAÇÃO CITOGENÉTICA	NÚMERO DE NUCLEOTÍDEOS QUE COMPÕE CADA REPETIÇÃO
HPRTB	q 26.2	4
DXS101	q 22.1	3
DXS7424	q 22.1	3
DXS6807	p 22.33	4
DXS6800	q 13.3	4
GATA172DO5	q 23	4
DXS8378	p 22.31	4
DXS7133	q 22.3	4
DXS9898	q 21.31	4
DXS7423	q 28	4
DXS6809	q 21.33	4
DXS6789	q 21.33	4
DXS8377	q 28	3
DXS6801	q 21.32	4

3.4 Identificação dos Alelos com Seqüenciador ABI 3100 Avant

O Analisador Genético ABI PRISM 3100 Avant é um sistema de análise de eletroforese capilar automatizado que separa, detecta e analisa automaticamente alelos de DNA, utilizando 4 capilares. Os *primers* que identificam os diversos alelos são marcados com fluorocromos, permitindo identificar todos os alelos de acordo com seu peso molecular em comparação com controles internos e externos.

Para a análise das amostras, foram pipetados 8,7µL de formamida HiDi (agente desnaturante) e 0,3µL de GeneScan-500 LIZ (padrão interno) em placas de 96 orifícios. Após a pipetagem de 1,5 µL do produto amplificado, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos e, em seguida, a placa foi colocada a -20°C por 5 minutos. Finalmente, as amostras foram colocadas no aparelho ABI 3100 Avant preparado com o polímero POP 4. Após a eletroforese, os dados obtidos foram analisados no software GeneMapper ID v. 3.2 (Applied Biosystems, USA).

3.5 CONTROLES

O DNA da célula K562 foi utilizado como controle da reação de amplificação e para a certificação do correto alinhamento da escada alélica. Seu perfil (alelos) para cada loco avaliado está representado na tabela 3 e nas figuras 9 e 10 através de imagens de eletroferograma obtidas após eletroforese pelo programa GeneMapper ID v.3.2.

Amostras do controle de qualidade do GEP-ISFG (Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense) de 2008 e 2009 foram

amplificadas para testar a qualidade dos dois sistemas *multiplex* desenvolvidos.

Todos os resultados obtidos estavam de acordo com o controle de qualidade.

Tabela 3. Perfil da K562 para os locos deste estudo⁸⁵.

Loco	ALELO
HPRTB	13
DXS101	24
DXS7424	17
DXS6807	11
DXS6800	21
GATA172D05	12
DXS8378	10
DXS7133	10
DXS9898	12
DXS7423	17
DXS6809	34
DXS6789	21
DXS8377	52
DXS6801	11

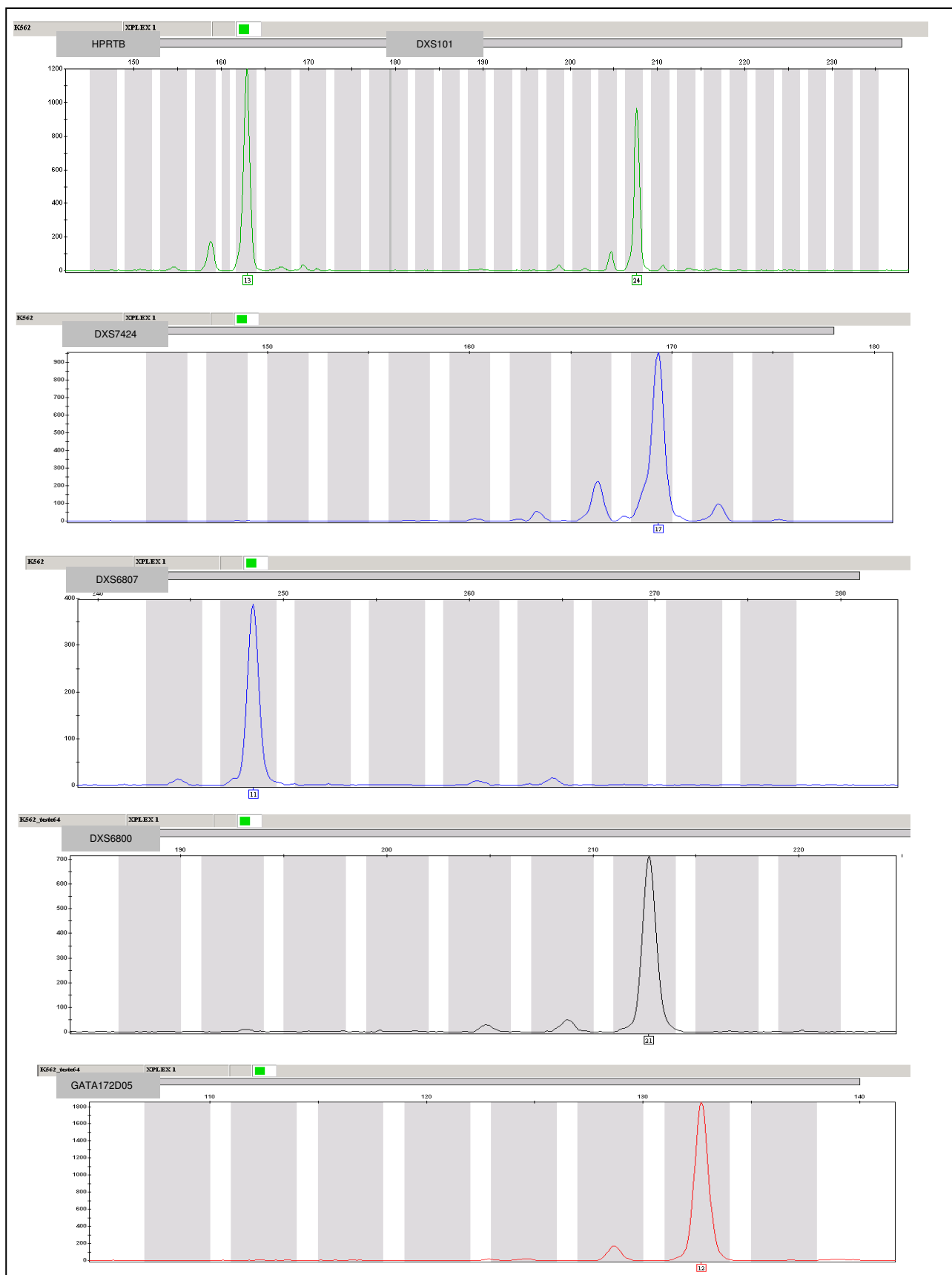
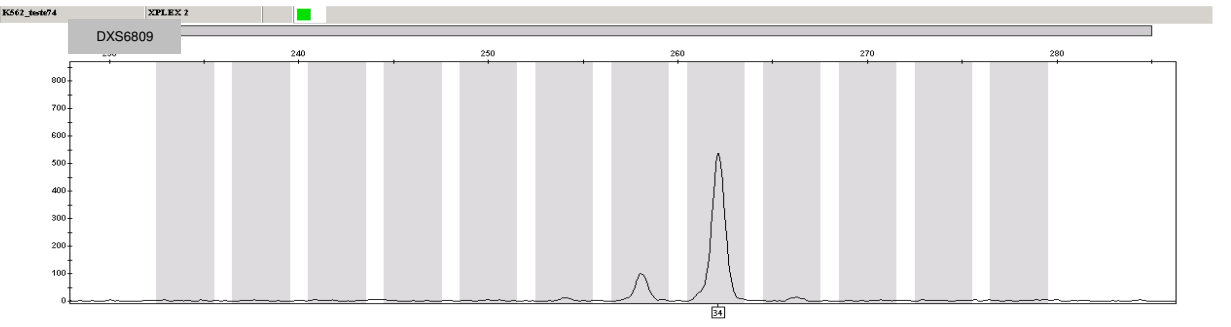
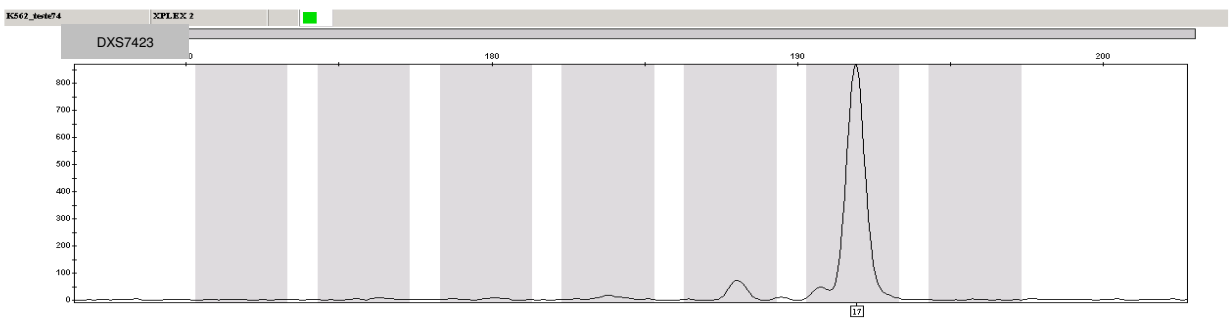
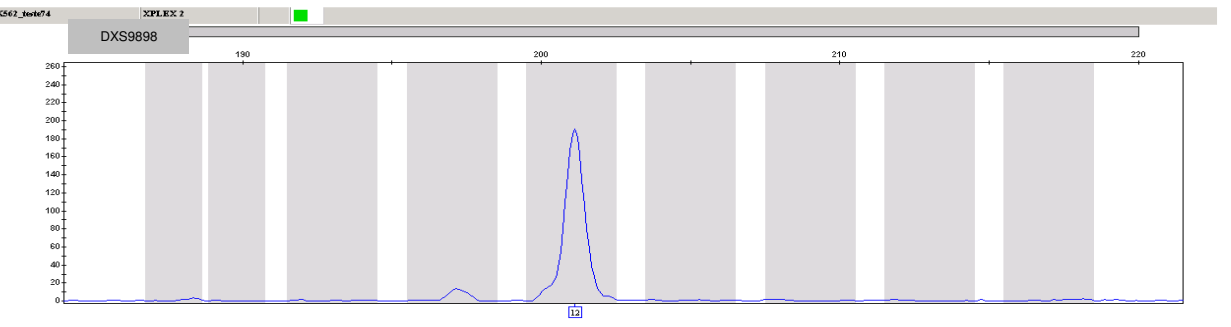
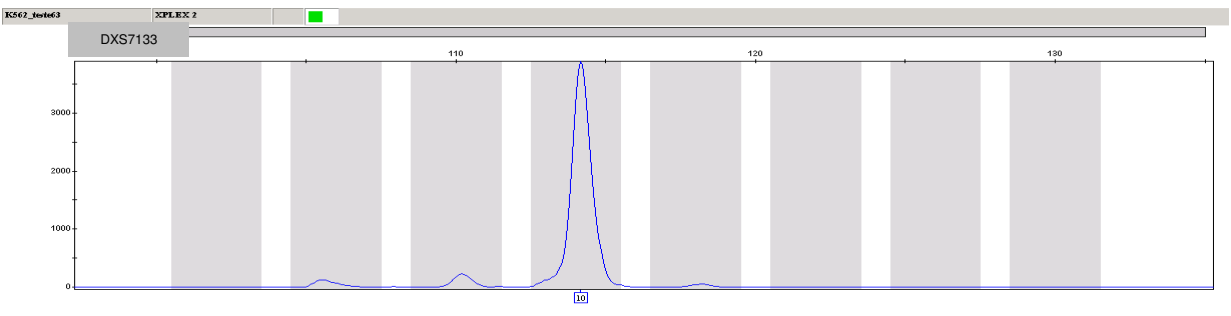
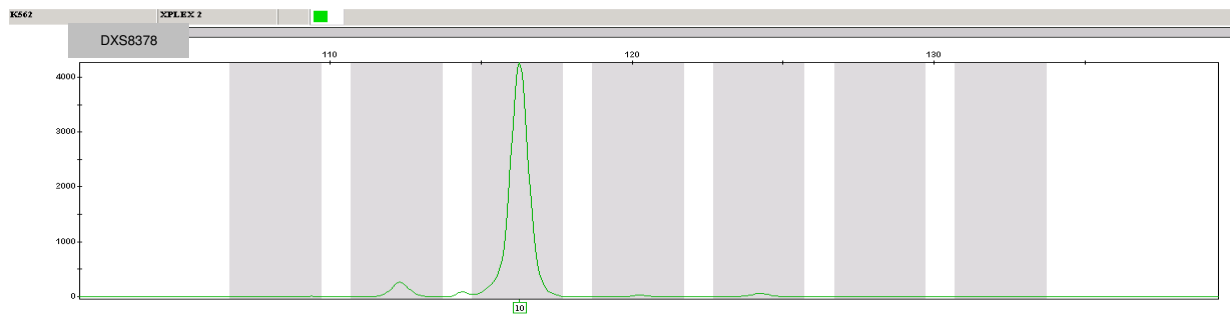


Figura 9. Perfil da K562, em eletroferograma, no Multiplex 1 após análise com ABI 3100



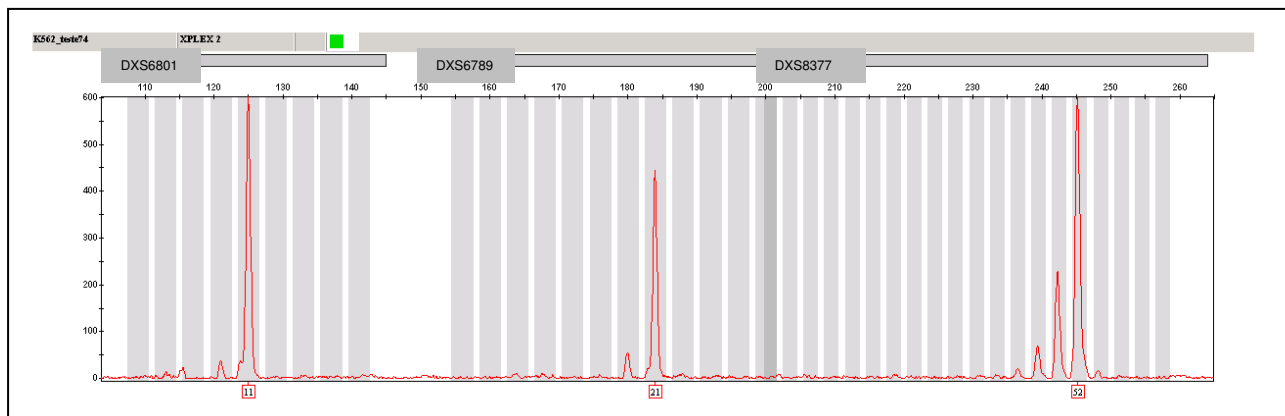


Figura 10. Perfil da K562, em eletroferograma, no Multiplex 2 após análise com ABI 3100

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Marques EK, Rocha AB, Fonseca ASK. Diagnóstico genético-molecular. Canoas: Editora da Ulbra; 2003.
- ² Otto PG, Otto PA, Frota-Pessoa O. Genética Humana e Clínica. 2ª ed. São Paulo: ROCA; 2004.
- ³ Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, *et al.* Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular. Porto Alegre: Artmed; 1999.
- ⁴ Borges-Osório MR, Robinson WM. Genética Humana. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
- ⁵ Strachan T, Read AP. Genética Molecular Humana. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.
- ⁶ Vogel F, Motulsky AG. Genética Humana. Problemas e Abordagens. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- ⁷ Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Introdução à Genética. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
- ⁸ Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genética Médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
- ⁹ Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP. Biologia Molecular Básica. 3ª ed. Porto Alegre: Mercado Aberto; 2003.
- ¹⁰ Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Genética Médica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
- ¹¹ Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Galeria de imagens: Cromossomos. [Acesso em: 6 mar. 2009] Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/prodabi/grupog/subdir/fotos.html>

- ¹² Manual Merck. Genética: Inativação do cromossoma X. [Acesso em: 25 nov. 2009]
Disponível em: <http://www.manualmerck.net/>
- ¹³ Bem-Hur A, Ong CS, Sonnenburg S, Schölkopf B, Rätsch G. Tutorial: Support vector machines and kernels for computational biology. [Acesso em: 15 jun. 2009]
Disponível em: <http://svmcompbio.tuebingen.mpg.de/splicing.html>
- ¹⁴ Fan H, Chu J-Y. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. *Geno Prot Bioinfo*. 2007; 5:7-14.
- ¹⁵ Schneider PM. Basic issues in forensic DNA typing. *Forensic Sci Int*. 1997; 88:17-22.
- ¹⁶ Carey L, Mitnik L. Trends in DNA forensic analysis. *Electrophoresis*. 2002; 23:1386-1397.
- ¹⁷ Jobim LF, Costa LR, Silva M. Identificação Humana. v. 2. Campinas: Millenium Editora; 2005.
- ¹⁸ Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: Implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*. 1999; 20:1682-1696.
- ¹⁹ Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. PCR. [Acesso em: 8 abr. 2009]
Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/mor/pad-morf/pcr2.htm>.
- ²⁰ McPherson MJ, Moller SG. PCR. Oxford: Bios, 2000.
- ²¹ Robino C, Giolitti A, Gino S, Torre C. Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample. *Int J Legal Med*. 2006; 120:315-318.
- ²² Hohoff C, Brinkmann B. Human Identity Testing with PCR-based Systems. *Mol Biotechnol*. 1999; 13:123-136.

- ²³ Rossetti ML, Silva CMD, Rodrigues JJS. Doenças Infecciosas. Diagnóstico Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- ²⁴ Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques*. 2007; 43 Suppl:Sii-v.
- ²⁵ Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*. 2004; 25:1397-1412.
- ²⁶ Chen D-P, Tseng C-P, Tsai S-H, Wang M-C, Lu S-C, Wu T-L, *et al.* Use of X-linked short tandem repeats loci to confirm mutations in parentage caseworks. *Clin Chim Acta*. 2009; 408:29-33.
- ²⁷ Poetsch M, Petersmann H, Repenning A, Lignitz E. Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population. *Forensic Sci Int*. 2005; 155:71-76.
- ²⁸ Asamura H, Sakai H, Kobayashi K, Ota M, Fukushima H. MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis. *Int J Legal Med*. 2006; 120:174-181.
- ²⁹ Asamura H, Sakai H, Ota M, Fukushima H. Japanese population data for eight X-STR loci using two new quadruplex systems. *Int J Legal Med*. 2006; 120:303-309.
- ³⁰ Gao S, Qiao K, Rakha A, Lai J, Li S. Allele frequencies for 10 X-STR loci in Nu population of Yunnan, China. *Legal Med*. 2007; 9:284-286.
- ³¹ Hou QF, Yu B, Li SB. Genetic Polymorphisms of Nine X-STR Loci in Four Population Groups from Inner Mongolia, China. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2007; 5:59-65.

- ³² Becker D, Rodig H, Augustin C, Edelmann J, Götz F, Hering S, *et al.* Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet.* 2008; 2:69-74.
- ³³ Liu QL, Lv DJ, Wu XL, Sun HY, Wu XY, Lu HL. Development of a five ChX STRs loci typing system. *Int J Legal Med.* 2008; 122:261-265.
- ³⁴ Nadeem A, Babar ME, Hussain M, Tahir MA. Development of pentaplex PCR and genetic analysis of X chromosomal STRs in Punjabi population of Pakistan. *Mol Biol Rep.* 2008; 36: 1671-1675.
- ³⁵ Ribeiro REM, Leite FP, Hutz MH, Palha TJ, Santos AKR, Santos SE. A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci Int Genet.* 2008; 2:154-158.
- ³⁶ Gusmão L, Sánchez-Diz P, Alves C, Gomes I, Zarrabeitia MT, Abovich M, *et al.* A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Legal Med.* 2009; 123:227-234.
- ³⁷ Zalán A, Völgyi A, Brabetz W, Schleinitz D, Pamjav H. Hungarian population data of eight X-linked markers in four linkage groups. *Forensic Sci Int.* 2008; 175:73-78.
- ³⁸ Bini C, Ceccardi S, Ferri G, Pelotti S, Alù M, Roncaglia E, *et al.* Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. A collaborative study. *Forensic Sci Int.* 2005; 153:231-236.
- ³⁹ Gomes I, Alves C, Maxzud K, Pereira R, Prata MJ, Sánchez-Diz P, *et al.* Analysis of 10 X-STRs in three African populations. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1:208-211.
- ⁴⁰ Gomes I, Prinz M, Pereira R, Meyers C, Mikulasovich RS, Amorim A, *et al.* Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex. *Int J Legal Med.* 2007; 121:198-203.

- ⁴¹ Hwa HL, Chang YY, Lee JC, Yin HY, Chen YH, Tseng LH, *et al.* Thirteen X-chromosomal short tandem repeat loci multiplex data from Taiwanese. *Int J Legal Med.* 2009; 123:263-269.
- ⁴² Poetsch M, El-Mostaqim D, Tschentscher F, Browne EN, Timmann C, Horstmann RD, *et al.* Allele frequencies of 11 X-chromosomal loci in a population sample from Ghana. *Int J Legal Med.* 2009; 123:81-83.
- ⁴³ Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R. Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. *Forensic Sci Int.* 2002; 125:217-222.
- ⁴⁴ Wiegand P, Berger B, Edelmann J, Parson W. Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. *Int J Legal Med.* 2003; 117:62-65.
- ⁴⁵ Pereira R, Gomes I, Amorim A, Gusmão L. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Legal Med.* 2007; 121:192-197.
- ⁴⁶ Lim EJ, Lee HY, Sim JE, Yang WI, Shin K-J. Genetic Polymorphism and Haplotype Analysis of 4 Tightly Linked X-STR duos in Koreans. *Croat Med J.* 2009; 50:305-312.
- ⁴⁷ Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med.* 2003; 117:67-74.
- ⁴⁸ Szibor R. X-chromosomal markers: Past, present and future. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1:93-99.
- ⁴⁹ Tariq MA, Ullah O, Riazuddin SA, Riazuddin S. Allele frequency distribution of 13 X-chromosomal STR loci in Pakistani population. *Int J Legal Med.* 2008; 122:525-528.
- ⁵⁰ Zarrabeitia MT, Mijares V, Riancho JA. Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome. *Int J Legal Med.* 2007; 121:433-437.

- ⁵¹ Son JY, Lee YS, Choung CM, Lee SD. Polymorphism of nine X chromosomal STR loci in Koreans. *Int J Legal Med.* 2002; 116:317-321.
- ⁵² Chen M-Y, Pu C-E. Population data on the X chromosome short tandem repeat loci DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377 and DXS9895 in Taiwan. *Forensic Sci Int.* 2004; 146:65-67.
- ⁵³ Lee HY, Park MJ, Jeong CK, Lee SY, Yoo J-E, Chung U, et al. Genetic characteristics and population study of 4 X-chromosomal STRs in Koreans: evidence for a null allele at DXS9898. *Int J Legal Med.* 2004; 118:355-360.
- ⁵⁴ Shin K-J, Kwon B-K, Lee S-S, Yoo J-E, Park MJ, Chung U, et al. Five highly informative X-chromosomal STRs in Koreans. *Int J Legal Med.* 2004; 118:37-40.
- ⁵⁵ Shin SH, Yu JS, Park SW, Min GS, Chung KW. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. *Forensic Sci Int.* 2005; 147:35-41.
- ⁵⁶ Yu B, Zhang H, Li S. X-chromosome STRs polymorphisms of Han ethnic group from Northwest China. *Forensic Sci Int.* 2005; 153:269-271.
- ⁵⁷ Gu S, Li S. X-chromosome STRs analysis of Ewenke ethnic population. *Forensic Sci Int.* 2006; 158:72-75.
- ⁵⁸ Kang L, Li S. X-chromosome STR polymorphism of Luoba Ethnic Group living in Tibet (SW China). *Forensic Sci Int.* 2006; 156:88-89.
- ⁵⁹ Liu Q, Li S. Patterns of genetic polymorphism at the 10 X-chromosome STR loci in Mongol population. *Forensic Sci Int.* 2006; 158:76-79.
- ⁶⁰ Tang WM, To KY. Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chinese population. *Forensic Sci Int.* 2006; 162:64-65.

- ⁶¹ Li H, Tang H, Zhang Q, Jiao Z, Bai J, Chang S. A multiplex PCR for 4 X chromosome STR markers and population data from Beijing Han ethnic group. *Legal Med.* 2009; 11:248-250.
- ⁶² Sim JE, Lee HY, Yang WI, Shin K-J. Population genetic study of four closely-linked X-STR trios in Koreans. *Mol Biol Rep. In press* 2009.
- ⁶³ Hering S, Kuhlisch E, Szibor R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker HumDXS6789 for forensic purposes. *Forensic Sci Int.* 2001; 119:42-46.
- ⁶⁴ Zarrabeitia MT, Amigo T, Sañudo C, Zarrabeitia A, González-Lamuño D, Riancho JA. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. *Forensic Sci Int.* 2002; 129:85-89.
- ⁶⁵ Edelmann J, Deichsel D, Plate I, Käser M, Szibor R. Validation of the X-chromosomal STR DXS6809. *Int J Legal Med.* 2003; 117:241-244.
- ⁶⁶ Edelmann J, Szibor R. Validation of the X-linked STR DXS6801. *Forensic Sci Int.* 2005; 148:219-220.
- ⁶⁷ Szibor R, Hering S, Kuhlisch E, Plate I, Demberger S, Krawczak M, *et al.* Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int J Legal Med.* 2005; 119:363-369.
- ⁶⁸ Aler M, Sánchez-Diz P, Gomes I, Gisbert M, Carracedo A, Amorim A, *et al.* Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample. *Forensic Sci Int.* 2007; 173:193-196.
- ⁶⁹ Turrina S, Atzei R, De Leo D. Polymorphism of four X-chromosomal STRs: DXS7423, DXS7424, DXS8378 and DXS6809 in a North Italian population sample and their use in kinship testing. *Forensic Sci Int.* 2007; 168:241-243.

- ⁷⁰ Turrina S, Atzei R, Filippini G, De Leo D. Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1:201-204.
- ⁷¹ Fracasso T, Schürenkamp M, Brinkmann B, Hohoff C. An X-STR meiosis study in Kurds and Germans: allele frequencies and mutation rates. *Int J Legal Med.* 2008; 122:353-356.
- ⁷² Hundertmark T, Hering S, Edelmann J, Augustin C, Plate I, Szibor R. The STR cluster DXS10148-DXS8378-DXS10135 provides a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp22. *Int J Legal Med.* 2008; 122:489-492.
- ⁷³ Edelmann J, Hering S, Augustin C, Kalis S, Szibor R. Validation of six closely linked STRs located in the chromosome X centromere region. *Int J Legal Med. In press* 2009.
- ⁷⁴ Hedman M, Palo JU, Sajantila A. X-STR diversity patterns in the Finnish and the Somali population. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 3:173-178.
- ⁷⁵ Silva F, Pereira R, Gusmão L, Santos C, Amorim A, Prata MJ, *et al.* Genetic Profiling of the Azores Islands (Portugal): Data from 10 X-Chromosome STRs. *Am J Hum Biol. In press* 2009.
- ⁷⁶ Zarrabeitia MT, Pinheiro F, Pancorbo MM, Cainé L, Cardoso S, Gusmão L, *et al.* Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 3:63-66.
- ⁷⁷ Gomes I, Pereira V, Gomes V, Prata MJ, Pinto N, Carracedo A, *et al.* The Karimojong from Uganda: Genetic characterization using an X-STR decaplex system. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 3:127-128.

- ⁷⁸ Cainé LM, Pontes L, Abrantes D, Lima G, Pinheiro F. Genetic Data of Four X-Chromosomal STRs in a Population Sample of Santa Catarina, Brazil. *J Forensic Sci.* 2007; 52:502-503.
- ⁷⁹ Rodrigues EMR, Leite FPN, Hutz MH, Palha TJBF, Santos AKCR, Santos SEB. A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci Int Genet.* 2008; 2:154-158.
- ⁸⁰ Martins JA, Silva RHA, Freschi A, Paneto GG, Oliveira RN, Cicarelli RMB. Population genetic data of five X-chromosomal loci in Bauru (São Paulo, Brazil). *Forensic Sci Int Genet Suppl Series.* 2008; 1:155-156.
- ⁸¹ Pico A, Castillo A, Vargas C, Amorim A, Gusmão L. Genetic profile characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander, Colombia. *Int J legal Med.* 2008; 122:347-351.
- ⁸² Tavares CC, Gusmão L, Domingues C, Domingues P, Silva DA, Aquino J, *et al.* Population data for six X-chromosome STR loci in a Rio de Janeiro (Brazil) sample: Usefulness in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet Suppl Series.* 2008; 1:164-166.
- ⁸³ Leite FPN, Santos SEB, Rodriguez EMR, Callegari-Jacques SM, Demarchi DA, Tsuneto LT, *et al.* Linkage Disequilibrium Patterns and Genetic Structure of Amerindian and Non-Amerindian Brazilian Populations Revealed by Long-Range X-STR Markers. *Am J Phys Anthropol.* 2009; 139:404-412.
- ⁸⁴ Martins JA, Costa JC, Paneto GG, Gusmão L, Sánchez-Diz P, Carracedo A, *et al.* Genetic data of 10 X-chromosomal loci in Vitória population (Espírito Santo State, Brazil). *Forensic Sci Int Genet.* *In press* 2009.
- ⁸⁵ Idiogram. [Acesso em: 25 nov. 2009] Disponível em: <http://www.chrx-str.org/>
- ⁸⁶ Simielli ME. Geoatlas. 26ª ed. São Paulo: Editora Ática, 1998.

⁸⁷ Edelmann J, Deichsel D, Hering S, Plate I, Szibor R. Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Sci Int.* 2002; 129:99-103.

⁸⁸ Edelmann J, Szibor R. Validation of the HumDXS6807 short tandem repeat polymorphism for forensic application. *Electrophoresis.* 1999; 20:2844-2846.

⁸⁹ Edelmann J, Szibor R. DXS101: a highly polymorphic X-linked STR. *Int J Legal Med.* 2001; 114:301-304.

⁹⁰ Hering S, Szibor R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker DXS9898 for forensic purposes. *J Forensic Sci.* 2000; 45:929-931

4. ARTIGO ORIGINAL

Conforme normas da Pós-Graduação em Ciências Médicas, os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigo original.

Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 14 X-chromosomal STR loci in a southern Brazilian population sample

**Larissa Siqueira Penna¹, Fernanda Gamio Silva², Patricia Hartstein Salim¹,
Gisele Ewald², Mariana Jobim², José Antônio Magalhães³, Luiz Fernando
Jobim⁴**

¹Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil. ²Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil. ³Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil. ⁴Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.

Supported by FIPE-HCPA and CAPES.

Mail address and reprint requests to Luiz Fernando Jobim, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Imunologia, 2ºandar. Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Bom Fim, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Telephone/Fax: +55 51 3359 8020 E-mail: ljobim@hcpa.ufrgs.br and larisp@sinos.net

Este artigo será submetido para a revista "International Journal of Legal Medicine".

Abstract

We developed two multiplex systems for the coamplification of X-chromosomal short tandem repeats (STRs). X-Multiplex 1 consisted of HPRTB, DXS101, DXS7424, DXS6807, DXS6800 and GATA172D05 and X-Multiplex 2 consisted of DXS8378, DXS7133, DXS9898, DXS7423, DXS6809, DXS6789, DXS8377 and DXS6801. In addition, we present allele frequencies for these loci in a south Brazilian population comprising 125 females and 141 males. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested in the female sample and no significant deviations were found, after applying Bonferroni's correction. Linkage disequilibrium (LD) tests were performed for all pairs of loci and three significant results, even after applying Bonferroni's correction, out of 91 pairwise comparisons, were obtained between DXS101 and DXS8377 ($P < 0.001$), DXS7133 and DXS6809 ($P < 0.001$) and DXS7423 and DXS6809 ($P < 0.001$). The power of discrimination in females (PD_F) varied between 0,832 for DXS6801 and 0,987 for DXS8377. DXS6801 was the least informative marker ($PIC=0,605$), while DXS8377 was the most polymorphic ($PIC=0,911$), followed by DXS101 ($PIC=0,872$).

Keywords X-chromosome. STRs. Population data. Rio Grande do Sul. Brazil.

Introduction

Autosomal and Y-chromosome short tandem repeat (STR) markers have been studied and widely applied as an effective tool for forensic analysis and human identification [1, 2]. In the last few years X-chromosome has been the focus of several population studies. Since a male's X-chromosome is transmitted only to his female offspring, X-STRs are helpful in some deficient and complex kinship tests

such as paternity cases when the disputed child is female (standard trios and father/daughter cases), maternity testing and cases where parents are not available and just some relatives are available (half-sisters and paternal-grandmother-granddaughter share at least one identical allele in each locus) [2-10]. An advantage of X-STRs is that in trios involving daughter, the MEC (Mean Exclusion Chance) proposed by Desmarais et al. [11] is higher than for autosomal loci with similar polymorphism information content (PIC) [3-5, 12-15].

Most studies of X-STRs have been conducted with Asian populations [1, 2, 8, 16-31] and European populations [3, 5-7, 10, 12-14, 32-44], while just a few with African populations [9, 45] and Latin American populations [15, 46-52]. Therefore, the aim of this study was to develop two multiplex PCR systems to study a population on the south of Brazil with an overall of 14 X-STRs markers, which includes the following loci: HPRTB, DXS101, DXS7424, DXS6807, DXS6800, GATA172D05, DXS8378, DXS7133, DXS9898, DXS7423, DXS6809, DXS6789, DXS8377 and DXS6801. Population data of several places, including Latin America are scarce and allele frequency is essential to establish population databases, an important tool in forensic cases and anthropological researches. Thus, we present and compare our allele frequencies with other population groups.

Materials and Methods

Samples and DNA extraction

DNA was extracted from FTA[®] cards containing blood spots collected from fingertip puncture of 266 (125 females and 141 males) unrelated individuals living in Rio Grande do Sul, a state located on the south of Brazil. Two 2.0mm discs were

placed in a PCR amplification tube. Two washes of 30 minutes, one with FTA purification reagent and the other with sterile water, were carried out. The samples were dried at room temperature for some hours. This study was approved by the Research Ethics Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (IRB0000921).

PCR amplification and fragment analysis

After several tests with different STRs and optimization of PCR parameters, the 14 X-STRs were combined in two multiplex systems. X-Multiplex 1 consisted of HPRTB, DXS101, DXS7424, DXS6807, DXS6800 and GATA172D05 and X-Multiplex 2 consisted of DXS8378, DXS7133, DXS9898, DXS7423, DXS6809, DXS6789, DXS8377 and DXS6801. The two discs containing DNA were amplified in a 7,5 μ L reaction mix that included 6,25 μ L of Qiagen Multiplex PCR Kit and 1,25 μ L of primer mix. However, this amplification can also be done in a 12,5 μ L volume containing 6,25 μ L of Qiagen Multiplex PCR Kit, 1,25 μ L of primer mix and 5 μ L of extracted DNA (10-15 ng DNA). It was not necessary to adjust primer concentration when using extracted DNA or discs in PCR reaction. Primer sequences, dye labeling, concentrations, fragment size and references are shown in Table 1. The X-Multiplex 1 amplification conditions consisted of an initial denaturation of 15 min at 95°C, followed by 30 cycles of 1 min at 95°C, annealing at 63°C for 1 min and 1 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 90 min. The X-Multiplex 2 amplification conditions were an initial denaturation of 15 min at 95°C, followed by 30 cycles of 30s at 94°C, annealing at 59°C for 90s and 60s at 72°C, and a final extension step at 72°C for 60min. Electrophoresis was performed with an ABI 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Each PCR product (1,5 μ L) was mixed with 8,4 μ L of HiDi formamide and 0,3 μ L of GeneScan-500 LIZ size standard. Fragment size was

determined using GeneMapper ID (v.3.2). Allele typing was based on the comparison to the alleles of the cell line K562. We also amplified GEP-ISFG quality control samples from 2008 and 2009 to adjust and test the quality of the typing protocol for both X-Multiplex.

Table 1 Primer sequences, dye labeling, concentrations and PCR sizes for both multiplex systems.

Locus	Dye labeling	Foward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Concentration* (μM)	PCR size (bp)	Ref.
X-Multiplex 1						
DXS6800	NED	GTGGGACCTTGTGATTGTGT	CTGGCTGACACTTAGGGAAA	1	194 - 218	[53]
DXS6807	FAM	GAGCAATGATCTCATTGCA	AAGTAAACATGTATAGGAAAAAGCT	5	247 - 275	[54]
GATA172D05	PET	TAGTGGTGATGGTTGCACAG	ATAATTGAAAGCCCGGATTC	3	108 - 136	[53]
DXS7424	FAM	CTGCTTGAGTCCAGGAATTCAA	GAACACGCACATTTGAGAACATA	1,5	145 - 175	[13]
HPRTB	VIC	TCTCTATTCCATCTCTGTCTCC	TCACCCCTGTCTATGGTCTCG	2	144 - 176	[34]
DXS101	VIC	ACTCTAAATCAGTCCAAATATCT	AAATCACTCCATGGCACATGTAT	7	180 - 220	[55]
X-Multiplex 2						
DXS8378	VIC	TTAGGCAACCCGGTGGTCC	ACAAGAACGAAACTCCAACCTC	5	110 - 134	[53]
DXS7133	FAM	GCTTCCTTAGATGGCATTCA	CTTCCAAGAATCAGAAGTCTCC	2	104 - 132	[53]
DXS9898	FAM	CGAGCACACCTACAAAAGCT	TCGATTAGGTTTCAGTTCCCA	4,5	188 - 215	[56]
DXS7423	NED	GTCTTCTGTCTATCTCCAAC	TAGCTTAGCGCCTGGCACATA	2	175 - 199	[53]
DXS6809	NED	TGAACCTTCTAGCTCAGGA	TCTGGAGAATCCAATTTTGC	5	235 - 279	[57]
DXS6789	PET	GTTGGTACTTAATAAACCTCTTT	AAGAAGTTATTTGATGCCTATTGT	4	154 - 198	[12]
DXS8377	PET	CACTTCATGGCTTACCACAG	GACCTTTGGAAAAGCTAGTGT	5	207 - 252	[53]
DXS6801	PET	CATTCCTCTAACAAAGTCTCC	CAGAGAGTCAGAATCAGTAG	1	113 - 137	[58]

* Final concentration in the primer mix

Statistical analysis

Arlequin Software (v.3.01) [59] was used to determine allelic frequencies, exact tests of population differentiation between allele frequencies of males and females, fixation indices (F_{ST}), Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test in female samples and linkage disequilibrium (LD) in male samples. Several forensic statistical parameters were calculated according to earlier papers: polymorphism information content (PIC) [60], heterozygosity (HET) [61], power of discrimination in males (PD_M) and females (PD_F) [11], mean exclusion chance in father/daughter (MEC_{duos}) and mean exclusion chance in trios involving daughters (MEC_{trios}) [11].

Differences of allele frequencies among populations were tested for significance by the two-tailed Fisher's exact test and were corrected by the Bonferroni's method. Statistical analysis was performed using SPSS version 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL), and values of the odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (95%CI) are given. Values of p less than or equal to 0.05 were regarded as significant. Population relationships were determined by the use of multidimensional scaling (MDS) analysis for each locus.

Results and Discussion

Both multiplex systems developed in this study are sensitive and may be useful in forensic cases with the appropriate DNA concentration described before. Most times, HPRTB, DXS8378 and DXS7133 were the loci that presented the highest peaks while DXS101 and DXS9898 presented the lowest peaks, probably, because DXS101 primers are very sensitive to thaw freezing, as reported by other study [32].

The frequencies of X-STRs in our group were similar to other studies reported for Brazilian populations [46, 47, 49, 51, 52], except for a study [15] that had a significant difference in allele 8.3 from locus DXS9898. Allele frequencies of the 14 markers were computed with male and female data together and separately by gender (Table 2), and no significant differences were observed between males and females at any marker. HWE was tested in females by the exact test and no significance was observed after Bonferroni's correction.

Forensic statistical parameters for the 14 markers investigated in our data are shown in Table 3. DXS8377 had the highest heterozygosity (HET=0.91) whereas

DXS6801 showed the lowest degree of variability ($HET=0.65$). Accordingly, DXS8377 showed the highest forensic efficiency, with a PD_F of 0.98 and MEC of 0.91 in trio cases, on the other hand, DXS6801 presented the lowest forensic efficiency, with 0.83 and 0.60, respectively. Overall values obtained for the PD were high in males ($PD_M=0.999999998$) and females ($PD_F=0.9999999999$), as well as for the combined MEC in duos ($MEC_{duos}=99.99980$) and trios ($MEC_{trios}=0.999999992$).

The analysis of STRs has become widely used in forensic routine because of its high power of individualization and practicality. Analysis of X chromosome markers is relatively new; the vast majority of tests address the STRs located on autosomal and Y-chromosome. The X-STRs are able to complement the analysis of autosomal markers and Y-chromosome due to the higher values of MECs and to the greater ability to exclude a situation of paternity involving females. The greatest advantage of their application is in cases of deficient paternity, in which the alleged father is not available and only half-sisters and paternal grandmother are available.

Linkage disequilibrium tests were performed for all pairs of loci. Three significant results, out of 91 pairwise comparisons, were found to show significant LD (after Bonferroni's correction): DXS101 and DXS8377 ($P<0.001$); DXS7133 and DXS6809 ($P<0.001$); DXS7423 and DXS6809 ($P<0.001$). However, the pairs of loci with significant LD, are located distant from each other on the X chromosome. Nevertheless, no real LD is expected to exist between them and the result is best attributed to sampling effects.

Table 2 Allele frequencies distribution of 14 X-STRs (N=265, 124 females, 141 males, 389 chromosomes).

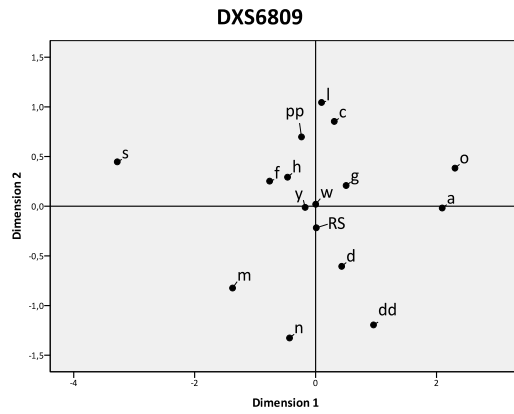
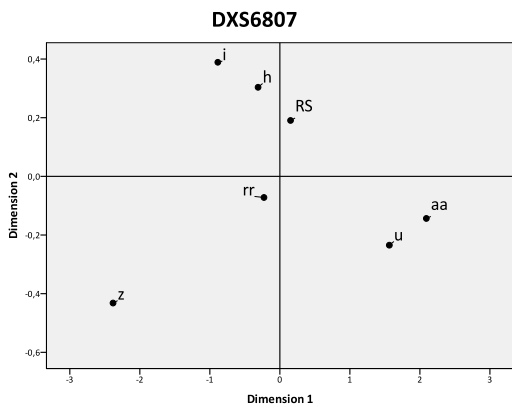
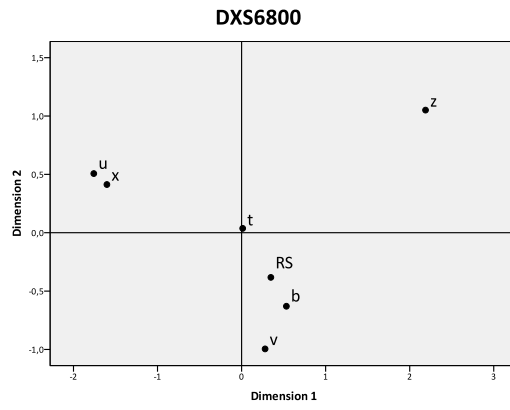
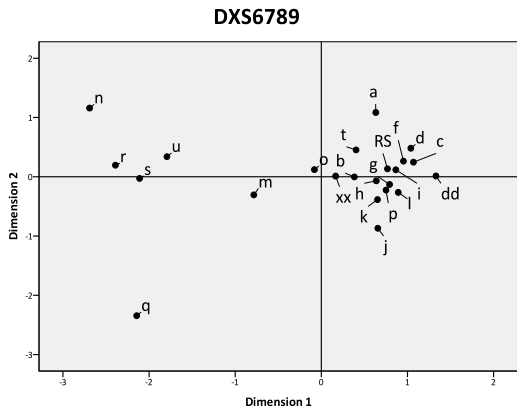
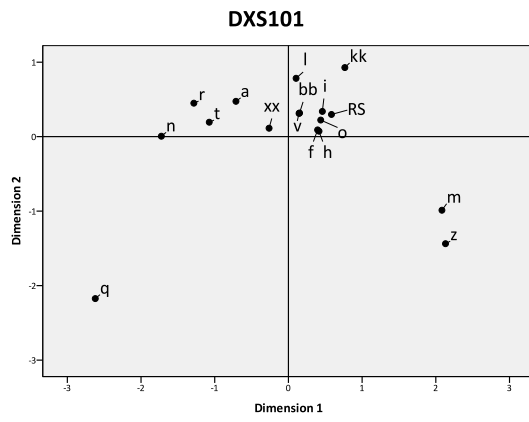
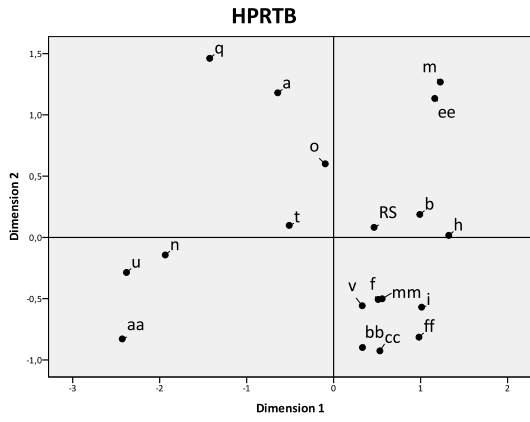
Systems and alleles	Females	Males	Pooled alleles	Systems and alleles	Females	Males	Pooled alleles
HPRTB				DXS9898			
9	0.012	0.000	0.007	8.3	0.190	0.227	0.203
10	0.004	0.014	0.007	10	0.020	0.014	0.018
11	0.097	0.113	0.103	11	0.177	0.191	0.183
12	0.274	0.426	0.329	12	0.274	0.312	0.288
13	0.318	0.270	0.301	13	0.234	0.199	0.221
14	0.214	0.149	0.190	14	0.097	0.050	0.080
15	0.077	0.028	0.059	15	0.008	0.007	0.007
17	0.004	0.000	0.003	DXS7423			
DXS101				13	0.044	0.057	0.049
15	0.028	0.014	0.023	14	0.310	0.290	0.303
16	0.008	0.014	0.010	15	0.460	0.411	0.442
18	0.069	0.113	0.085	16	0.149	0.213	0.172
19	0.056	0.128	0.082	17	0.032	0.028	0.031
20	0.032	0.014	0.026	18	0.004	0.000	0.003
21	0.056	0.007	0.039	DXS6809			
22	0.028	0.021	0.026	28	0.024	0.021	0.023
23	0.085	0.057	0.075	29	0.024	0.035	0.028
24	0.169	0.142	0.159	30	0.052	0.035	0.046
25	0.177	0.156	0.170	31	0.129	0.149	0.136
26	0.149	0.199	0.167	32	0.173	0.149	0.165
27	0.117	0.078	0.103	33	0.282	0.234	0.265
28	0.020	0.035	0.026	34	0.177	0.241	0.201
29	0.000	0.014	0.005	35	0.089	0.078	0.085
30	0.004	0.000	0.002	36	0.048	0.035	0.044
33	0.000	0.007	0.002	37	0.000	0.014	0.005
DXS7424				38	0.000	0.007	0.002
10	0.008	0.000	0.005	DXS6801			
11	0.008	0.000	0.005	8	0.004	0.007	0.005
12	0.024	0.028	0.026	9	0.008	0.007	0.008
13	0.052	0.078	0.062	10	0.093	0.064	0.082
14	0.190	0.177	0.185	11	0.504	0.518	0.509
15	0.315	0.333	0.321	12	0.258	0.284	0.267
16	0.286	0.290	0.288	13	0.089	0.099	0.093
17	0.097	0.064	0.085	14	0.032	0.021	0.028
18	0.016	0.014	0.015	15	0.012	0.000	0.008
20	0.004	0.014	0.008	DXS6789			
DXS6807				14	0.004	0.000	0.003
11	0.444	0.504	0.465	15	0.052	0.050	0.051
12	0.012	0.000	0.008	16	0.040	0.035	0.039
13	0.048	0.035	0.044	18	0.004	0.014	0.008
14	0.258	0.255	0.257	19	0.016	0.035	0.023
15	0.222	0.170	0.203	20	0.411	0.397	0.406
16	0.016	0.035	0.023	21	0.302	0.255	0.285
DXS6800				22	0.100	0.135	0.113
16	0.440	0.362	0.411	23	0.065	0.070	0.067
17	0.052	0.043	0.049	24	0.004	0.007	0.005
18	0.149	0.163	0.154	DXS8377			
19	0.258	0.298	0.272	39	0.000	0.007	0.002
20	0.016	0.014	0.015	40	0.016	0.014	0.015
21	0.077	0.113	0.090	41	0.012	0.035	0.021
22	0.008	0.007	0.008	42	0.040	0.014	0.031
GATA172D05				43	0.040	0.014	0.031
6	0.145	0.177	0.157	44	0.048	0.035	0.044
7	0.008	0.000	0.005	45	0.052	0.057	0.054
8	0.125	0.128	0.126	46	0.129	0.099	0.118
9	0.072	0.078	0.075	47	0.113	0.057	0.093
10	0.319	0.277	0.303	48	0.077	0.113	0.090
11	0.234	0.227	0.231	49	0.117	0.099	0.111
12	0.097	0.113	0.103	50	0.117	0.177	0.139
DXS8378				51	0.069	0.078	0.072
9	0.016	0.014	0.015	52	0.048	0.092	0.064
10	0.391	0.390	0.391	53	0.052	0.028	0.044
11	0.327	0.290	0.314	54	0.024	0.035	0.028
12	0.234	0.270	0.247	55	0.032	0.021	0.028
13	0.032	0.035	0.033	56	0.012	0.007	0.010
DXS7133				57	0.000	0.014	0.005
7	0.008	0.000	0.005				
8	0.004	0.007	0.005				
9	0.427	0.447	0.434				
10	0.185	0.142	0.170				
11	0.306	0.312	0.308				
12	0.048	0.078	0.059				
13	0.016	0.014	0.015				
14	0.004	0.000	0.003				

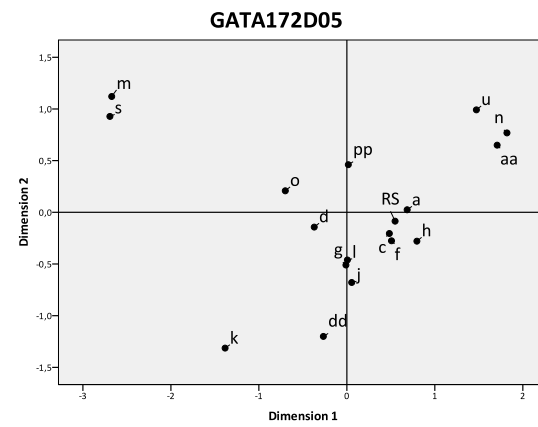
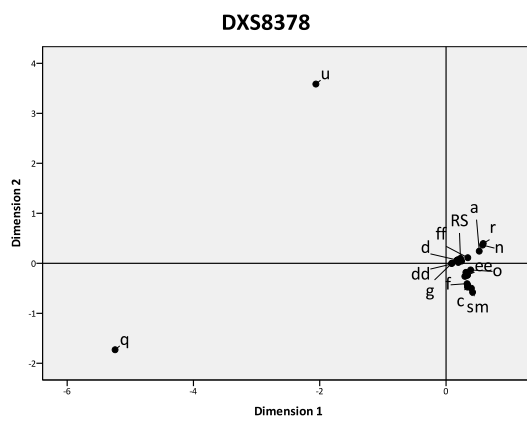
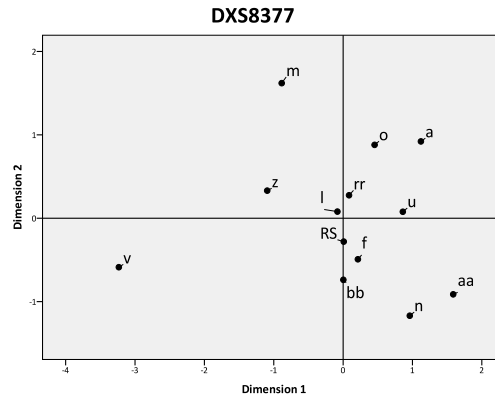
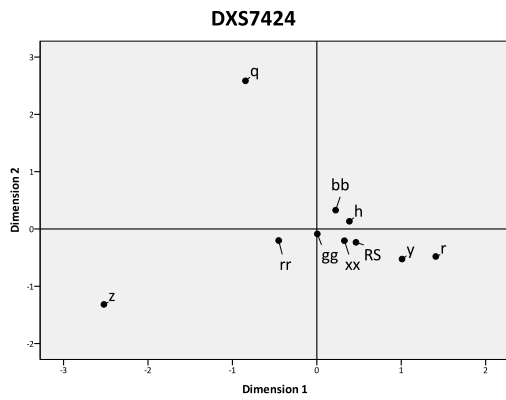
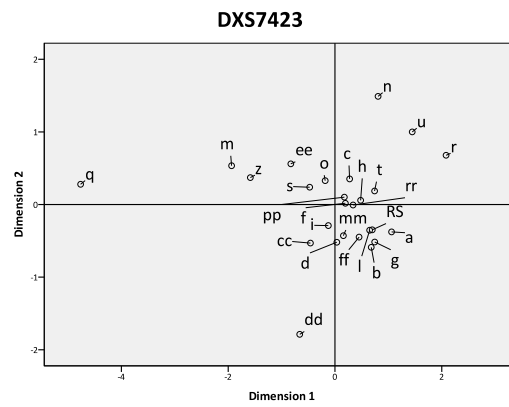
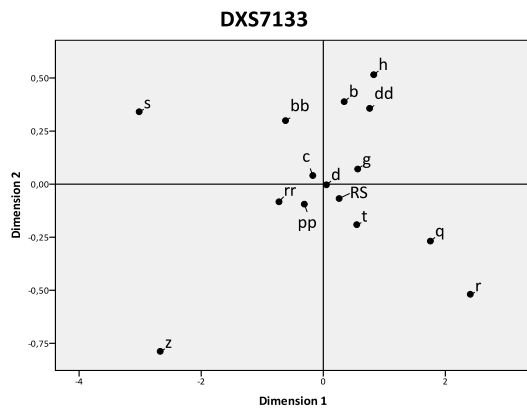
Table 3. Statistical parameters for 14 X-STRs in Southern Brazilian Population.

Markers	HET	PIC	PD _M	PD _F	MEC _{duos}	MEC _{trios}
HPRTB	0.751	0.710	0.751	0.897	0.573	0.710
DXS101	0.884	0.872	0.884	0.975	0.783	0.872
DXS7424	0.768	0.732	0.768	0.911	0.600	0.732
DXS6807	0.674	0.621	0.674	0.840	0.474	0.621
DXS6800	0.723	0.680	0.723	0.881	0.539	0.680
GATA172D05	0.798	0.770	0.798	0.931	0.644	0.770
DXS8378	0.686	0.625	0.686	0.840	0.478	0.625
DXS7133	0.684	0.630	0.684	0.846	0.484	0.630
DXS9898	0.787	0.753	0.787	0.921	0.623	0.753
DXS7423	0.680	0.625	0.680	0.843	0.479	0.625
DXS6809	0.831	0.810	0.831	0.951	0.697	0.810
DXS6801	0.653	0.605	0.653	0.832	0.459	0.605
DXS6789	0.732	0.694	0.732	0.890	0.556	0.694
DXS8377	0.917	0.911	0.917	0.987	0.843	0.911
Combined %			99.9999998	99.999999999	99.99980	99.9999992

HET (heterozygosity); PIC (polymorphism information content); PD_M (power of discrimination in males); PD_F (power of discrimination in females); MEC_{duos} (mean exclusion chance in father/daughter); MEC_{trios} (mean exclusion chance in trios involving daughters).

Several populations were compared with our study for each locus through MDS (Figure 1), with the aim of detecting meaningful underlying dimensions that allow the researcher to explain observed similarities or dissimilarities (distances) between the investigated populations. Stress results obtained from MDS in crescent order are DXS7133 (0,00695), DXS6807 (0,0112), DXS7424 (0,01327), GATA175DO5 (0,04309), DXS7423 (0,05051), DXS8378 (0,05232), HPRTB (0,06234), DXS9898 (0,06823), DXS101 (0,0753), DXS6789 (0,07629), DXS8377 (0,09517) and DXS6809 (0,09622). DXS6801 MDS plot could not be presented because there were not enough populations to compare with ours. Another analysis to be considered is F_{ST} that is a measure of population differentiation, genetic distance based on genetic polymorphism data. The F_{ST} values for individual markers varied between 0.1% and 1.6%.





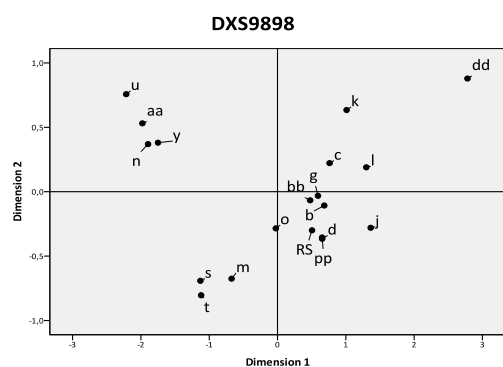


Figure 1. Multidimensional scaling of 14 X-STR loci, obtained from data of the population studied, with data of world populations available in the literature. Each point represents one population, identified as followed: RS, Brazil (our sample); a, Colombia (Santander) [48]; b, Brazil (Rio Grande do Sul) [51]; c, Portugal (Azores-East) [44]; d, Portugal (Azores-Central) [44]; dd, Portugal (Azores-West) [44]; f, Portugal (North) [5]; g, Spain/Portugal [10]; h, Italy (north) [6]; i, Italy (central and north) [3]; j, Spain (Cantabria) [38]; k, Spain (Pas valley) [38]; l, Spain (Valencia) [36]; m, United States (African American) [4]; n, United States (Asian American) [4]; o, United States (Hispanic American) [4]; p, Germany (east) [12]; q, China (Luoba Ethnic Group in Tibet) [23]; r, Japan [1]; s, Uganda (Karamoja) [45]; t, Brazil (Amazon Region) [15]; u, Korea [2]; v, Germany (Münster and Kurdish) [40]; x, China (Han ethnic group) [8]; z, Ghana (Ashanti) [9]; w, Germany [33]; y, Korea [18]; aa, Japan [21]; bb, Germany (northeast) [34]; cc, Germany [39]; ee, Somali [7]; ff, Finland [7]; gg, Germany [13]; hh, Germany [41]; kk, Spain (Cantabria) [32]; mm, Brazil (Santa Catarina) [46]; pp, Brazil (Espírito Santo) [52]; rr, Brazil (Rio de Janeiro) [49]; xx, Brazil (São Paulo) [47].

We observed that China [23], Japan [1], Korea [2], Uganda [45], Ghana [9], Asian-Americans [4] and Afro-Americans [4] are genetically more distant from our population. On the other hand, Rio Grande do Sul is mainly composed by descendants of Portuguese, German, Italian and Spanish immigrants and we observed in MDS plots that our population was usually grouped with these populations.

The same was observed when comparing those populations with ours with Fisher's exact test (Table 4). Ghana was significantly different in loci DXS101, DXS7424, DXS6800, DXS9898, DXS7133, DXS6807 and DXS7423. China and Japan were significantly different in loci DXS101, DXS7424, DXS7133, DXS7423, DXS6789 and DXS8378. On the other hand, Uganda was different in loci DXS6809, DXS6800, GATA172DO5, DXS9898, DXS7133, DXS7423, DXS6789 and DXS8378. Supplementary material attached with complete tables for each locus.

Table 4. Comparisons of allele frequencies from our group with other populations (n= total number of typed chromosomes).

RS	Brazilian Amazon	Colombia	Portugal	Germany	Germany	Spain	Hispanic American (US)	Ghana	Uganda	African American (US)	China	China	Japan	Japan	Korea	Korea	Asian American (US)	
	[15]	[48]	[44]	[39]	[40]	[38]	[4]	[9]	[45]	[4]	[8]	[23]	[1]	[21]	[2]	[18]	[4]	
(n)	389	466	328	47	995	294	205	143	357	393	130	600	146	471	573	582	450	104
DXS101																		
Allele 21	0.04	-	0.03	-	-	-	-	-	*0.19	-	0.10	-	0.01	0.01	-	0.01	-	0.01
Allele 22	0.03	-	0.01	-	-	-	-	-	0.06	-	0.06	-	*0.13	0.04	-	0.03	-	0.06
Allele 23	0.08	-	0.07	-	-	-	-	-	0.05	-	0.05	-	*0.35	0.11	-	*0.15	-	0.12
Allele 24	0.16	-	*0.31	-	-	-	-	-	*0.08	-	0.07	-	*0.30	*0.30	-	*0.26	-	*0.37
Allele 25	0.17	-	0.15	-	-	-	-	-	*0.05	-	*0.06	-	0.14	0.21	-	0.23	-	0.11
Allele 26	0.17	-	0.17	-	-	-	-	-	0.12	-	0.10	-	*0.04	0.17	-	0.17	-	0.14
Allele 27	0.10	-	0.09	-	-	-	-	-	0.12	-	0.08	-	*0.01	0.09	-	0.09	-	0.13
DXS7424																		
Allele 13	0.06	-	-	-	-	-	-	-	*0.32	-	-	-	0.02	0.05	-	-	0.06	-
Allele 14	0.19	-	-	-	-	-	-	-	0.21	-	-	-	0.11	*0.11	-	-	0.16	-
Allele 15	0.32	-	-	-	-	-	-	-	*0.13	-	-	-	0.12	0.35	-	-	0.29	-
Allele 16	0.29	-	-	-	-	-	-	-	*0.15	-	-	-	0.23	*0.40	-	-	*0.40	-
Allele 17	0.08	-	-	-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	*0.32	0.04	-	-	0.04	-
Allele 18	0.01	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-	-	-	*0.16	0.01	-	-	0.02	-
DXS6809																		
Allele 30	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	*0.12	-	-	-	-	-	-	-	-
Allele 31	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-	*0.25	-	-	-	-	-	-	-	-
Allele 33	0.26	-	-	-	-	-	-	-	-	*0.16	-	-	-	-	-	-	-	-
DXS6800																		
Allele 16	0.41	-	-	-	-	0.37	-	-	*0.19	0.49	-	*0.82	-	-	-	*0.85	-	-
Allele 18	0.15	-	-	-	-	*0.06	-	-	*0.61	0.16	-	*0.01	-	-	-	*0.01	-	-
Allele 19	0.27	-	-	-	-	0.36	-	-	*0.13	0.20	-	*0.10	-	-	-	*0.08	-	-
Allele 21	0.09	-	-	-	-	0.11	-	-	*0.03	*0.03	-	*0.01	-	-	-	*0.01	-	-
GATA172DO5																		
Allele 6	0.16	-	-	-	-	-	0.26	-	-	*0.24	0.26	-	-	-	0.10	*0.07	-	-
Allele 8	0.13	-	-	-	-	-	*0.24	-	-	*0.23	0.18	-	-	-	0.12	0.13	-	-
Allele 9	0.07	-	-	-	-	-	0.06	-	-	*0.29	*0.32	-	-	-	0.06	0.10	-	-
Allele 10	0.30	-	-	-	-	-	*0.13	-	-	*0.10	*0.12	-	-	-	*0.44	*0.43	-	-
Allele 11	0.23	-	-	-	-	-	*0.14	-	-	*0.07	*0.05	-	-	-	0.23	0.20	-	-
Allele 12	0.10	-	-	-	-	-	0.17	-	-	*0.02	0.03	-	-	-	0.05	0.05	-	-
DXS9898																		
Allele 8.3	0.20	*0.03	-	*0.45	-	-	-	0.15	*0.07	*0.06	0.08	-	-	-	*0.04	*0.03	*0.05	*0.04
Allele 10	0.02	0.03	-	0.00	-	-	-	*0.08	*0.13	*0.06	*0.12	-	-	-	0.01	0.00	0.01	0.00
Allele 11	0.18	0.13	-	0.14	-	-	-	0.14	0.18	0.18	0.16	-	-	-	*0.09	*0.05	*0.10	0.12
Allele 12	0.29	0.32	-	0.23	-	-	-	0.32	*0.40	*0.43	0.36	-	-	-	*0.51	*0.52	*0.48	*0.51
Allele 13	0.22	0.28	-	0.10	-	-	-	0.18	0.15	*0.13	0.17	-	-	-	0.26	0.27	0.25	0.25
DXS8377																		
Allele 52	0.06	-	-	-	-	*0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Allele 53	0.04	-	-	-	-	*0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DXS7133																		
Allele 9	0.43	-	-	-	-	-	-	-	*0.02	*0.06	-	-	*0.60	*0.67	-	-	-	-
Allele 11	0.31	-	-	-	-	-	-	-	*0.56	*0.68	-	-	*0.13	*0.06	-	-	-	-
DXS6807																		
Allele 11	0.46	-	-	-	-	-	-	-	*0.63	-	-	-	-	-	0.36	0.39	-	-
Allele 14	0.26	-	-	-	-	-	-	-	*0.10	-	-	-	-	-	*0.41	*0.37	-	-
DXS7423																		
Allele 13	0.05	-	-	*0.23	*0.12	-	-	-	*0.13	0.06	0.13	-	*0.29	0.00	-	0.00	-	0.00
Allele 14	0.30	-	-	0.25	0.35	-	-	-	*0.49	*0.41	*0.53	-	*0.64	0.28	-	0.35	-	0.43
Allele 15	0.44	-	-	0.29	*0.33	-	-	-	*0.28	0.35	*0.25	-	*0.01	*0.62	-	*0.57	-	0.54
Allele 16	0.17	-	-	0.17	0.14	-	-	-	*0.08	0.10	*0.07	-	*0.00	*0.08	-	*0.06	-	*0.03
DXS6789																		
Allele 15	0.05	-	0.04	-	-	-	-	-	-	*0.23	*0.18	-	0.01	*0.13	-	*0.15	-	0.09
Allele 16	0.04	-	*0.12	-	-	-	-	-	-	*0.17	0.10	-	*0.13	*0.32	-	*0.28	-	*0.41
Allele 17	0.00	-	0.23	-	-	-	-	-	-	0.05	0.00	-	*0.28	0.04	-	0.04	-	0.04
Allele 20	0.41	-	0.06	-	-	-	-	-	-	*0.12	*0.19	-	*0.03	*0.13	-	*0.18	-	*0.20
Allele 21	0.28	-	*0.17	-	-	-	-	-	-	*0.15	0.26	-	0.25	0.23	-	0.20	-	*0.12
Allele 22	0.11	-	0.09	-	-	-	-	-	-	-	0.13	-	0.20	0.06	-	0.07	-	0.04
DXS8378																		
Allele 9	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.02	-	0.00	0.02	-	*0.57	-	-
Allele 10	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	*0.19	*0.21	-	*0.00	*0.56	-	*0.28	-	-
Allele 11	0.31	-	-	-	-	-	-	-	-	0.40	0.41	-	*0.00	0.19	-	*0.12	-	-
Allele 12	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	0.33	0.32	-	*0.00	*0.11	-	*0.02	-	-
Allele 18	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.00	-	*0.55	0.00	-	0.00	-	-
Allele 19	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.00	-	*0.24	0.00	-	0.00	-	-
Allele 20	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	0.00	-	*0.17	0.00	-	0.00	-	-

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction. *P<0.05

In relation to DXS101, the most frequent alleles, in our study, were 25 and 26, with 17% in each allele, followed by allele 24 (16%). Allele 24 was the most different between the populations, being statistically different from the following populations: Colombia [48] (31%; $P < 0.001$; OR: 0.42, 95%CI [0.288-0.610]), Asiatic group from US [4] (37%; $P < 0.001$; OR: 0.33, 95%CI [0.198-0.552]), China [23] (30%; $P < 0.05$; OR: 0.44, 95%CI [0.275-0.706]), Japan [1] (30%; $P < 0.001$; OR: 0.44, 95%CI [95%: 0.312-0.628]), Ghana [9] (8%; $P < 0.05$; OR: 2.14, 95%CI [1.318-3.549]) and Korea [2] (26%; $P < 0.001$; OR: 0.54, 95%CI [0.383-0.760]). Allele 25 was different from African group of US [4] (6%; $P < 0.001$; OR: 3.12, 95%CI [1.434-7.727]) and Ghana [9] (5%; $P < 0.001$; OR: 4.06, 95%CI [1.797-10.730]), and allele 26 only differed from China population [23] (4%; $P < 0.001$; OR: 4.77, 95%CI [2.007 to 13.748]). In addition, the allele 21, one of the least frequent in the Brazilian population (0.4%) was found with a higher frequency in the Ghana population [9] (19%), with a statistically significant difference ($P < 0.001$; OR: 0.18, 95%CI [0.087-0.367]). DXS101 is a highly polymorphic marker and so it is one of the most studied.

X chromosomes seem to have peculiarities in their allelic distribution, which makes the population study extremely important as a tool in forensic activity. Therefore, more studies with such markers are required in order to compile information, which then may complement a database of the Brazilian population enhancing its use in the forensic context.

Funding

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and the Brazilian Higher Education Training Program (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES).

References

1. Asamura H, Sakai H, Kobayashi K, Ota M, Fukushima H (2006) MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis. *Int J Legal Med* 120:174-181
2. Shin SH, Yu JS, Park SW, Min GS, Chung KW (2005) Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. *Forensic Sci Int* 147:35-41
3. Bini C, Ceccardi S, Ferri G et al (2005) Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. A collaborative study. *Forensic Sci Int* 153:231-236
4. Gomes I, Prinz M, Pereira R, Meyers C, Mikulasovich RS, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L (2007) Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex. *Int J Legal Med* 121:198-203
5. Pereira R, Gomes I, Amorim A, Gusmão L (2007) Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Legal Med* 121:192-197
6. Turrina S, Atzei R, Filippini G, Leo DD (2007) Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. *Forensic Sci Int Genet* 1:201-204

7. Hedman M, Palo JU, Sajantila A (2009) X-STR diversity patterns in the Finnish and the Somali population. *Forensic Sci Int Genet* 3:173-178
8. Li H, Tang H, Zhang Q, Jiao Z, Bai J, Chang S (2009) A multiplex PCR for 4 X chromosome STR markers and population data from Beijing Han ethnic group. *Legal Med* 11:248-250
9. Poetsch M, El-Mostaqim D, Tschentscher F, Browne ENL, Timmann C, Hortsman RD, Wurmb-Schwark N (2009) Allele frequencies of 11 X-chromosomal loci in a population sample from Ghana. *Int J legal Med* 123:81-83
10. Zarrabeitia MT, Pinheiro F, Pancorbo MM, Cainé L, Cardoso S, Gusmão L, Riancho JA (2009) Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. *Forensic Sci Int Genet* 3:63-66
11. Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L (1998) Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene(HUMARA). *J Forensic Sci* 43:1046–1049
12. Hering S, Kuhlisch E, Szibor R (2001) Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker HumDXS6789 for forensic purposes. *Forensic Sci Int* 119:42-46
13. Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R (2002) Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. *Forensic Sci Int* 125:217-222
14. Wiegand P, Berger B, Edelmann J, Parson W (2003) Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. *Int J Legal Med* 117:62-65
15. Rodrigues EMR, Leite FPN, Hutz MH, Palha TJBF, Santos AKCR, Santos SEB (2008) A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci Int Genet* 2:154-158

16. Son JY, Lee YS, Choung CM, Lee SD (2002) Polymorphism of nine X chromosomal STR loci in Koreans. *Int J Legal Med* 116:317-321
17. Chen M-Y, Pu C-E (2004) Population data on the X chromosome short tandem repeat loci DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377 and DXS9895 in Taiwan. *Forensic Sci Int* 146:65-67
18. Lee HY, Park MJ, Jeong CK, Lee SY, Yoo J-E, Chung U, Choi J-H, Kim C-Y, Shin K-J (2004) Genetic characteristics and population study of 4 X-chromosomal STRs in Koreans: evidence for a null allele at DXS9898. *Int J Legal Med* 118:355-360
19. Shin K-J, Kwon B-K, Lee S-S, Yoo J-E, Park MJ, Chung U, Lee HY, Han G-R, Choi J-H, Kim C-Y (2004) Five highly informative X-chromosomal STRs in Koreans. *Int J Legal Med* 118:37-40
20. Yu B, Zhang H, Li S (2005) X-chromosome STRs polymorphisms of Han ethnic group from Northwest China. *Forensic Sci Int* 153:269-271
21. Asamura H, Sakai H, Ota M, Fukushima H (2006) Japanese population data for eight X-STR loci using two new quadruplex systems. *Int J Legal Med* 120:303-309
22. Gu S, Li S (2006) X-chromosome STRs analysis of Ewenke ethnic population. *Forensic Sci Int* 158:72-75
23. Kang L, Li S (2006) X-chromosome STR polymorphism of Luoba Ethnic Group living in Tibet (SW China). *Forensic Sci Int* 156:88-89
24. Liu Q, Li S (2006) Patterns of genetic polymorphism at the 10 X-chromosome STR loci in Mongol population. *Forensic Sci Int* 158:76-79
25. Tang WM, To KY (2006) Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chinese population. *Forensic Sci Int* 162:64-65

26. Gao S, Qiao K, Rakha A, Lai J, Li S (2007) Allele frequencies for 10 X-STR loci in Nu population of Yunnan, China. *Legal Med* 9:284-286
27. Hou Q-F, Yu B, Li S-B (2007) Genetic Polymorphisms of Nine X-STR Loci in Four Population Groups from Inner Mongolia, China. *Geno Prot Bioinfo* 5:59-65
28. Liu Q-L, Lv D-J, Wu X-L, Sun H-Y, Wu X-Y, Lu H-L (2008) Development of a five ChX STRs loci typing system. *Int J Legal Med* 122:261-265
29. Chen D-P, Tseng C-P, Tsai S-H, Wang M-C, Lu S-C, Wu T-L, Chang P-Y, Sun C-F (2009) Use of X-linked short tandem repeats loci to confirm mutations in parentage caseworks. *Clin Chim Acta* 408:29-33
30. Lim EJ, Lee HY, Sim JE, Yang WI, Shin K-J (2009) Genetic Polymorphism and Haplotype Analysis of 4 Tightly Linked X-STR duos in Koreans. *Croat Med J* 50:305-312
31. Sim JE, Lee HY, Yang WI, Shin K-J (2009) Population genetic study of four closely-linked X-STR trios in Koreans. *Mol Biol Rep*. In press
32. Zarrabeitia MT, Amigo T, Sañudo C, Zarrabeitia A, González-Lamuño D, Riancho JA (2002) A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. *Forensic Sci Int* 129:85-89
33. Edelmann J, Deichsel D, Plate I, Käser M, Szibor R (2003) Validation of the X-chromosomal STR DXS6809. *Int J Legal Med* 117:241-244
34. Poetsch M, Petersmann H, Repenning A, Lignitz E (2005) Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population. *Forensic Sci Int* 155:71-76
35. Szibor R, Hering S, Kuhlisch E, Plate I, Demberger S, Krawczak M, Edelmann J (2005) Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int J Legal Med* 119:363-369

36. Aler M, Sánchez-Diz P, Gomes I, Gisbert M, Carracedo A, Amorim A, Gusmão L (2007) Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample. *Forensic Sci Int* 173:193-196
37. Turrina S, Atzei R, De Leo D (2007) Polymorphism of four X-chromosomal STRs: DXS7423, DXS7424, DXS8378 and DXS6809 in a North Italian population sample and their use in kinship testing. *Forensic Sci Int* 168:241-243
38. Zarrabeitia MT, Mijares V, Riancho JA (2007) Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome. *Int J Legal Med* 121:433-437
39. Becker D, Rodig H, Augustin C, Edelmann J, Götz F, Hering S, Szibor R, Brabetz W (2008) Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet* 2:69-74
40. Fracasso T, Schürenkamp M, Brinkmann B, Hohoff C (2008) An X-STR meiosis study in Kurds and Germans: allele frequencies and mutation rates. *Int J Legal Med* 122:353-356
41. Hundertmark T, Hering S, Edelmann J, Augustin C, Plate I, Szibor R (2008) The STR cluster DXS10148-DXS8378-DXS10135 provides a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp22. *Int J Legal Med* 122:489-492
42. Zalán A, Völgyi A, Brabetz W, Schleinitz D, Pamjav H (2008) Hungarian population data of eight X-linked markers in four linkage groups. *Forensic Sci Int* 175:73-78
43. Edelmann J, Hering S, Augustin C, Kalis S, Szibor R (2009) Validation of six closely linked STRs located in the chromosome X centromere region. *Int J Legal Med*. In press

44. Silva F, Pereira R, Gusmão L, Santos C, Amorim A, Prata MJ, Bettencourt C, Lourenço P, Lima M (2009) Genetic Profiling of the Azores Islands (Portugal): Data from 10 X-Chromosome STRs. *Am J Hum Biol.* In press
45. Gomes I, Pereira V, Gomes V, Prata MJ, Pinto N, Carracedo A, Amorim A, Gusmão L (2009) The Karimojong from Uganda: Genetic characterization using an X-STR decaplex system. *Forensic Sci Int Genet* 3:127-128
46. Cainé LM, Pontes L, Abrantes D, Lima G, Pinheiro F (2007) Genetic Data of Four X-Chromosomal STRs in a Population Sample of Santa Catarina, Brazil. *J Forensic Sci* 52:502-503
47. Martins JA, Silva RHA, Freschi A, Paneto GG, Oliveira RN, Cicarelli RMB (2008) Population genetic data of five X-chromosomal loci in Bauru (São Paulo, Brazil). *Forensic Sci Int Genet Suppl Series* 1:155-156
48. Pico A, Castillo A, Vargas C, Amorim A, Gusmão L (2008) Genetic profile characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander, Colombia. *Int J legal Med* 122:347-351
49. Tavares CC, Gusmão L, Domingues C, Domingues P, Silva DA, Aquino J, Peixe C, Amorim A, Carvalho EF (2008) Population data for six X-chromosome STR loci in a Rio de Janeiro (Brazil) sample: Usefulness in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet Suppl Series* 1:164-166
50. Gusmão L, Sánchez-Diz P, Alves C et al (2009) A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Legal Med* 123:227-234
51. Leite FPN, Santos SEB, Rodriguez EMR, Callegari-Jacques SM, Demarchi DA, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Salzano FM, Hutz MH (2009) Linkage Disequilibrium Patterns and Genetic Structure of Amerindian and Non-Amerindian Brazilian

Populations Revealed by Long-Range X-STR Markers. *Am J Phys Anthropol* 139:404-412

52. Martins JA, Costa JC, Paneto GG, Gusmão L, Sánchez-Diz P, Carracedo A, Cicarelli RMB (2009) Genetic data of 10 X-chromosomal loci in Vitória population (Espírito Santo State, Brazil). *Forensic Sci Int Genet*. In press

53. Edelmann J, Deichsel D, Hering S, Plate I, Szibor R (2002) Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Sci Int* 129:99-103

54. Edelmann J, Szibor R (1999) Validation of the HumDXS6807 short tandem repeat polymorphism for forensic application. *Electrophoresis* 20:2844-2846

55. Edelmann J, Szibor R (2001) DXS101: a highly polymorphic X-linked STR. *Int J Legal Med* 114:301-304

56. Hering S, Szibor R (2000) Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker DXS9898 for forensic purposes. *J Forensic Sci* 45:929-931

57. Robino C, Giolitti A, Gino S, Torre C (2006) Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample. *Int J Legal Med* 120:315-318

58. Edelmann J, Szibor R (2005) Validation of the X-linked STR DXS6801. *Forensic Sci Int* 148:219-220

59. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50

60. Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331
61. Nei M, Roychoudhury AK (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os STRs vêm desempenhando um papel importante na identificação humana, seja em casos forenses ou em testes de parentesco. Nos últimos anos, particular atenção tem sido voltada aos STRs do cromossomo X que, segundo estudos anteriores, podem complementar eficientemente e solucionar a análise de STRs dos cromossomos autossômicos quando o indivíduo estudado é do sexo feminino. Devido à sua relevância em testes complexos de parentesco, o desenvolvimento de sistemas multiplex para análise de STRs do X e o estudo de diferentes populações para o conhecimento das frequências alélicas destes STRs é essencial.

Os dois sistemas *multiplex* desenvolvidos, após otimização, apresentaram boa sensibilidade e eficiência na amplificação. Os locos HPRTB, DXS8378 e DXS7133 apresentaram o melhor desempenho quanto à qualidade dos picos observados enquanto os locos DXS9898 e DXS101 apresentaram um desempenho discretamente menor. Segundo Zarrabeitia et al. (2002) os *primers* do DXS101 parecem ser mais sensíveis ao descongelamento, sendo este, provavelmente um dos motivos de seu desempenho reduzido.

A população do Rio Grande do Sul é composta principalmente por descendentes de imigrantes portugueses, italianos e alemães e por uma menor parcela de afro-descendentes. Isso pôde ser observado através do teste exato de Fisher para comparação das frequências alélicas e visualizado nos gráficos MDS que avaliam a proximidade genética: a população avaliada nesse estudo apresentou-se, em geral, geneticamente próxima em relação às populações da

Alemanha, Itália e Portugal. Contudo, foi possível observar que em alguns locos, populações da China, Japão, Coreia, Uganda, Gana e Estados Unidos (Asiáticos-Americanos e Afro-Americanos) tiveram uma considerável distância genética da nossa e das demais populações.

Os marcadores utilizados nessa pesquisa provaram ser altamente informativos e uma ferramenta importante na identificação humana, porém, estudos adicionais são necessários para o conhecimento da variação de STRs do cromossomo X em populações ainda não estudadas.

APÊNDICE

A – Tabelas Complementares do Artigo

Table S1. Allele frequencies from locus DXS6807 in different populations.

Alelo	RS	Brazil, Rio de Janeiro	Italy	Italy	Ghana, Ashanti	Japan	Korea
<i>(n)</i> <i>Ref</i>	389	332 [49]	300 [6]	824 [3]	357 [9]	573 [21]	582 [2]
7	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.004
11	0.465	0.470	0.507	0.541	0.639	0.363	0.387
12	0.008	0.021	0.023	0.010	0.045	0.005	0.018
13	0.044	0.033	0.000	0.008	0.031	0.021	0.025
14	0.257	0.220	0.238	0.193	0.106	0.412	0.370
15	0.203	0.187	0.205	0.212	0.126	0.187	0.172
16	0.023	0.057	0.020	0.028	0.039	0.012	0.019
17	0.000	0.009	0.003	0.006	0.014	0.000	0.006
18	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S2. Allele frequencies from locus DXS7424 in different populations.

Alelo	RS	Brazil, São Paulo	Brazil, Rio de Janeiro	Germany	Germany	Italy	Ghana, Ashanti	China	Japan	Korea
(n) Ref	389	[47]	332 [49]	1134 [13]	305 [33]	300 [6]	357 [9]	146 [23]	471 [1]	450 [18]
9	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.005	0.008	0.008	0.003	0.007	0.013	0.008	0.000	0.000	0.000
11	0.005	0.000	0.028	0.004	0.003	0.003	0.053	0.000	0.004	0.000
12	0.026	0.023	0.071	0.035	0.033	0.020	0.067	0.000	0.021	0.007
13	0.062	0.094	0.134	0.069	0.039	0.060	0.319	0.025	0.053	0.067
14	0.185	0.164	0.154	0.220	0.210	0.164	0.219	0.113	0.108	0.167
15	0.321	0.281	0.224	0.290	0.256	0.278	0.132	0.125	0.353	0.296
16	0.288	0.313	0.265	0.240	0.292	0.312	0.154	0.231	0.395	0.402
17	0.085	0.102	0.098	0.104	0.148	0.134	0.031	0.319	0.047	0.042
18	0.015	0.008	0.018	0.021	0.007	0.010	0.014	0.163	0.019	0.020
19	0.000	0.000	0.000	0.011	0.003	0.000	0.003	0.019	0.000	0.000
20	0.008	0.008	0.003	0.001	0.003	0.003	0.000	0.006	0.000	0.000

P<0.05 Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S3. Allele frequencies from locus DXS9898 in different populations.

Alelo	RS (n) Ref	Brazil RS 389	Brazil, Espirito Santo 371	Brazil, Amazon Region 466	Colombia 328	Portugal, Azores- East 117	Portugal, Azores- Central 140	Portugal, Azores- West 47	Portugal 347	Spain + Portugal 798	Spain, Cantabria 369	Spain, Pas valley 205	Spain, Valencia 290	Hispanic- American 143	Germany 305	African-American 130	Ghana, Ashanti 357	Uganda, Karamoja 393	Japan 573	Korea 582	Korea 450	Asian-American 104	
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.005	0.005	0.002	0.003	0.000	0.007	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.008	0.008	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8.3	0.203	0.233	0.202	0.032	0.110	0.256	0.207	0.447	0.265	0.227	0.270	0.301	0.297	0.154	0.213	0.085	0.076	0.064	0.042	0.038	0.047	0.039	0.000
9	0.000	0.000	0.003	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.018	0.005	0.035	0.030	0.012	0.009	0.014	0.000	0.012	0.006	0.010	0.005	0.010	0.077	0.007	0.123	0.137	0.069	0.005	0.003	0.011	0.000	0.000
11	0.183	0.175	0.194	0.139	0.073	0.162	0.207	0.149	0.225	0.186	0.221	0.131	0.155	0.140	0.210	0.162	0.177	0.181	0.085	0.059	0.098	0.125	0.000
12	0.288	0.296	0.280	0.327	0.329	0.316	0.279	0.234	0.285	0.319	0.254	0.330	0.272	0.322	0.331	0.362	0.401	0.433	0.508	0.527	0.478	0.510	0.000
13	0.221	0.217	0.194	0.285	0.393	0.205	0.214	0.106	0.153	0.184	0.176	0.218	0.203	0.182	0.197	0.177	0.151	0.132	0.260	0.279	0.258	0.250	0.000
13.3	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
14	0.080	0.063	0.057	0.120	0.076	0.034	0.057	0.000	0.055	0.059	0.065	0.015	0.052	0.077	0.033	0.069	0.042	0.051	0.065	0.076	0.069	0.067	0.000
14.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	0.008	0.005	0.022	0.011	0.003	0.017	0.007	0.064	0.006	0.008	0.003	0.000	0.010	0.021	0.007	0.015	0.003	0.003	0.033	0.019	0.009	0.010	0.000
15.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
16	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction

n= total number of typed chromosomes

Table S4. Allele frequencies from locus DXS8378 in different populations

Alelo	RS	Brazil, Santa Catarina	Brazil, Rio de Janeiro	Brazil, Espírito Santo	Colombia	Portugal, Azores-East	Portugal, Azores-Central	Portugal, Azores-West	Portugal	Spain + Portugal	Spain, Valencia	Hispanic-American	Germany	Germany	Germany	Germany	Italy	Finland	Somali	Ghana, Ashanti	Uganda, Karamoja	African-American	China	Japan	Korea	Asian-American	
(n)	389	254	332	371	328	117	140	47	347	798	290	143	305	995	317	380	300	400	400	357	393	130	146	471	582	104	
Ref		[46]	[49]	[52]	[48]	[44]	[44]	[44]	[5]	[10]	[36]	[4]	[34]	[39]	[40]	[41]	[6]	[7]	[7]	[9]	[45]	[4]	[23]	[1]	[2]	[4]	
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000
9	0.015	0.007	0.003	0.005	0.000	0.009	0.007	0.021	0.014	0.043	0.028	0.000	0.026	0.019	0.022	0.020	0.020	0.010	0.000	0.006	0.000	0.023	0.000	0.015	0.573	0.019	
10	0.391	0.334	0.307	0.307	0.482	0.256	0.379	0.298	0.280	0.298	0.286	0.364	0.312	0.343	0.344	0.340	0.342	0.405	0.340	0.247	0.193	0.208	0.000	0.562	0.281	0.490	
11	0.314	0.326	0.345	0.380	0.281	0.308	0.314	0.404	0.306	0.324	0.338	0.308	0.374	0.333	0.338	0.350	0.352	0.295	0.333	0.378	0.407	0.415	0.000	0.285	0.123	0.365	
12	0.247	0.303	0.302	0.275	0.232	0.376	0.264	0.213	0.369	0.293	0.286	0.308	0.246	0.254	0.268	0.250	0.242	0.278	0.308	0.319	0.333	0.323	0.000	0.113	0.017	0.115	
13	0.033	0.023	0.040	0.030	0.003	0.051	0.029	0.064	0.029	0.041	0.048	0.014	0.033	0.041	0.016	0.040	0.040	0.010	0.020	0.036	0.064	0.031	0.000	0.025	0.000	0.010	
14	0.000	0.004	0.003	0.003	0.003	0.000	0.007	0.000	0.003	0.001	0.010	0.000	0.007	0.005	0.009	0.000	0.003	0.003	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	
18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.552	0.000	0.000	0.000	
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.247	0.000	0.000	0.000	
20	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.175	0.000	0.000	0.000	
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S5. Allele frequencies from locus GATA172DO5 in different populations.

Alelo	RS	Brazil, Espirito Santo	Colombia	Portugal, Azores-East	Portugal, Azores-Central	Portugal, Azores-West	Portugal	Spain + Portugal	Spain, Valencia	Spain, Cantabria	Spain, Pas valley	Hispanic-American	Italy	Uganda, Karamoja	African-American	Japan	Korea	Asian-American
(n)	389	371	328	117	140	47	347	798	290	369	205	143	300	393	130	573	582	104
Ref		[52]	[48]	[44]	[44]	[44]	[5]	[10]	[36]	[38]	[38]	[4]	[6]	[45]	[4]	[21]	[2]	[4]
6	0.157	0.143	0.110	0.188	0.214	0.213	0.202	0.187	0.193	0.204	0.261	0.182	0.164	0.239	0.262	0.096	0.065	0.058
7	0.005	0.030	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.003	0.003	0.000	0.014	0.000	0.048	0.031	0.000	0.004	0.000
8	0.126	0.156	0.177	0.145	0.136	0.213	0.167	0.192	0.159	0.181	0.237	0.126	0.164	0.234	0.185	0.120	0.138	0.154
9	0.075	0.135	0.064	0.051	0.114	0.021	0.038	0.060	0.066	0.039	0.063	0.168	0.027	0.290	0.315	0.059	0.100	0.067
10	0.303	0.294	0.329	0.316	0.243	0.191	0.320	0.246	0.252	0.249	0.126	0.210	0.332	0.099	0.123	0.442	0.430	0.423
11	0.231	0.164	0.180	0.197	0.193	0.234	0.199	0.216	0.214	0.217	0.135	0.189	0.215	0.069	0.054	0.229	0.208	0.279
12	0.103	0.076	0.128	0.103	0.100	0.128	0.072	0.098	0.114	0.107	0.174	0.112	0.097	0.020	0.031	0.054	0.054	0.019
13	0.000	0.003	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
14	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S6. Allele frequencies from locus DXS6789 in different populations.

Alelo	RS	Brazil, RS	Brazil, Amazon Region	Brazil, Espirito Santo	Colombia	Portugal, Azores-East	Portugal, Azores-Central	Portugal, Azores-West	Portugal	Spain + Portugal	Spain, Valencia	Spain, Cantabria	Spain, Pas valley	Hispanic-American	Germany	Italy	Italy	Uganda, Karamoja	African-American	China	Japan	Korea	Asian-American
(n)	389	200	466	371	328	117	140	47	347	798	290	369	205	143	880	300	674	393	130	146	471	582	104
Ref		[51]	[15]	[52]	[48]	[44]	[44]	[44]	[5]	[10]	[36]	[38]	[38]	[4]	[12]	[6]	[3]	[45]	[4]	[23]	[1]	[2]	[4]
13	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000
14	0.003	0.021	0.011	0.008	0.000	0.009	0.007	0.000	0.000	0.001	0.007	0.000	0.007	0.007	0.002	0.003	0.006	0.010	0.023	0.000	0.006	0.001	0.010
15	0.051	0.052	0.064	0.097	0.037	0.077	0.029	0.021	0.052	0.038	0.017	0.058	0.031	0.070	0.036	0.091	0.067	0.239	0.185	0.006	0.134	0.151	0.096
16	0.039	0.047	0.073	0.054	0.125	0.009	0.043	0.000	0.023	0.014	0.017	0.024	0.010	0.091	0.014	0.010	0.019	0.176	0.100	0.138	0.327	0.282	0.414
17	0.000	0.000	0.011	0.003	0.006	0.000	0.007	0.000	0.000	0.005	0.003	0.000	0.007	0.000	0.001	0.000	0.005	0.051	0.000	0.288	0.047	0.041	0.048
18	0.008	0.005	0.002	0.005	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.014	0.002	0.003	0.002	0.005	0.008	0.000	0.000	0.000	0.010
19	0.023	0.031	0.053	0.062	0.052	0.017	0.000	0.000	0.020	0.021	0.035	0.005	0.031	0.049	0.030	0.037	0.023	0.076	0.077	0.006	0.021	0.038	0.010
20	0.406	0.370	0.411	0.340	0.476	0.436	0.457	0.447	0.435	0.380	0.383	0.309	0.345	0.322	0.374	0.369	0.421	0.122	0.192	0.038	0.130	0.185	0.202
21	0.285	0.250	0.254	0.251	0.177	0.205	0.221	0.277	0.231	0.308	0.224	0.411	0.307	0.252	0.286	0.242	0.227	0.150	0.269	0.250	0.234	0.200	0.125
22	0.113	0.151	0.077	0.143	0.095	0.188	0.129	0.170	0.135	0.128	0.228	0.101	0.160	0.126	0.174	0.158	0.165	0.107	0.131	0.206	0.068	0.075	0.048
23	0.067	0.042	0.034	0.035	0.024	0.051	0.107	0.064	0.084	0.075	0.072	0.053	0.035	0.049	0.064	0.060	0.059	0.053	0.015	0.069	0.025	0.016	0.039
24	0.005	0.026	0.006	0.003	0.003	0.009	0.000	0.021	0.014	0.023	0.014	0.039	0.003	0.021	0.016	0.027	0.005	0.010	0.000	0.000	0.008	0.005	0.000
25	0.000	0.005	0.002	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
26	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S7. Allele frequencies from locus DXS7423 in different populations.

Alelo	RS (n)	Brazil RS 200	Brazil, Amazon Region 466	Brazil, Santa Catarina 254	Brazil, Rio de Janeiro 332	Brazil, Espírito Santo 371	Colombia 328	Portugal 347	Portugal, Azores- East 117	Portugal, Azores- Central 140	Portugal, Azores- West 47	Spain + Portugal 798	Spain, Valencia 290	Hispanic-American 143	Germany 995	Italy 300	Italy 824	Finland 400	Somali 400	Ghana, Ashanti 357	Uganda, Karamoja 393	African-American 130	China 146	Japan 471	Korea 582	Asian-American 104	
Ref		[51]	[15]	[46]	[49]	[52]	[48]	[5]	[44]	[44]	[44]	[10]	[36]	[4]	[39]	[6]	[3]	[7]	[7]	[9]	[45]	[4]	[23]	[1]	[2]	[4]	
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	0.000	0.000	0.002	0.000	0.006	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.001	0.007	0.002	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.004	0.001	0.000	0.000
13	0.049	0.102	0.047	0.082	0.051	0.051	0.043	0.061	0.034	0.100	0.234	0.077	0.066	0.049	0.130	0.054	0.069	0.108	0.068	0.132	0.069	0.131	0.293	0.000	0.000	0.000	0.000
13.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
14	0.303	0.273	0.326	0.326	0.343	0.364	0.290	0.357	0.385	0.329	0.255	0.281	0.297	0.406	0.352	0.338	0.358	0.303	0.468	0.499	0.415	0.531	0.649	0.285	0.356	0.433	0.433
15	0.442	0.444	0.474	0.393	0.422	0.412	0.454	0.415	0.436	0.386	0.298	0.448	0.441	0.385	0.337	0.443	0.370	0.435	0.343	0.280	0.354	0.254	0.013	0.622	0.577	0.539	0.539
16	0.172	0.144	0.099	0.161	0.139	0.132	0.079	0.141	0.128	0.171	0.170	0.166	0.159	0.112	0.149	0.131	0.177	0.143	0.088	0.087	0.102	0.077	0.000	0.089	0.064	0.029	0.029
17	0.031	0.037	0.052	0.035	0.036	0.035	0.134	0.023	0.017	0.014	0.043	0.023	0.031	0.049	0.030	0.023	0.023	0.013	0.028	0.003	0.036	0.008	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
18	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's Correction
n= total number of typed chromosomes

Table S8. Allele frequencies from locus DXS6809 in different populations.

Alelo	RS	Brazil, Espirito Santo	Colombia	Portugal	Portugal, Azores-East	Portugal, Azores-Central	Portugal, Azores-West	Spain + Portugal	Spain, Valencia	Hispanic-American	Germany	Italy	Uganda, Karamoja	African-American	Korea	Asian-American
(n) Ref	389	371 [52]	328 [48]	347 [5]	117 [44]	140 [44]	47 [44]	798 [10]	290 [36]	143 [4]	1031 [33]	300 [6]	393 [45]	130 [4]	450 [18]	104 [4]
27	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.007	0.000	0.004	0.000	0.000	0.019	0.003	0.005	0.000	0.000	0.000
28	0.023	0.019	0.012	0.020	0.009	0.007	0.043	0.009	0.003	0.007	0.040	0.033	0.025	0.031	0.000	0.010
29	0.028	0.035	0.006	0.020	0.009	0.007	0.000	0.008	0.017	0.014	0.017	0.030	0.053	0.031	0.007	0.010
30	0.046	0.076	0.037	0.049	0.034	0.014	0.000	0.041	0.038	0.049	0.040	0.027	0.122	0.054	0.020	0.000
31	0.136	0.151	0.092	0.202	0.188	0.143	0.106	0.147	0.200	0.070	0.145	0.191	0.247	0.162	0.180	0.183
31.1	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000
32	0.165	0.129	0.174	0.176	0.128	0.179	0.213	0.174	0.131	0.182	0.146	0.134	0.173	0.192	0.156	0.164
33	0.265	0.297	0.329	0.271	0.333	0.271	0.277	0.308	0.331	0.385	0.277	0.268	0.160	0.208	0.293	0.250
33.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000
34	0.201	0.151	0.271	0.159	0.179	0.221	0.213	0.214	0.183	0.203	0.188	0.178	0.143	0.131	0.176	0.173
35	0.085	0.102	0.046	0.072	0.085	0.121	0.085	0.069	0.069	0.077	0.077	0.087	0.033	0.092	0.104	0.164
36	0.044	0.030	0.021	0.020	0.026	0.021	0.064	0.020	0.024	0.007	0.038	0.017	0.025	0.046	0.053	0.048
37	0.005	0.003	0.012	0.003	0.000	0.007	0.000	0.006	0.003	0.007	0.008	0.007	0.013	0.015	0.004	0.000
38	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000
40	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000

P<0.05 Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S9. Allele frequencies from locus DXS101 in different populations.

Alelo (n) Ref	RS 389	Brazil, São Paulo [47]	Colombia [48]	Portugal [5]	Germany [34]	Germany [40]	Italy [6]	Italy [3]	Spain [32]	Spain [36]	Hispanic- American [4]	Ghana, Ashanti [9]	African- American [4]	China [23]	Japan [1]	Korea [2]	Asian- American [4]
14	0.000	0.000	0.000	0.003	0.003	0.000	0.007	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	0.023	0.016	0.003	0.020	0.016	0.036	0.003	0.025	0.055	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
16	0.010	0.008	0.006	0.003	0.000	0.003	0.010	0.005	0.000	0.000	0.007	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000
17	0.000	0.008	0.000	0.006	0.010	0.000	0.007	0.008	0.005	0.007	0.014	0.011	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000
18	0.085	0.055	0.018	0.084	0.062	0.065	0.104	0.098	0.085	0.052	0.063	0.014	0.039	0.000	0.000	0.000	0.000
19	0.082	0.055	0.024	0.046	0.046	0.046	0.067	0.066	0.075	0.045	0.049	0.090	0.131	0.000	0.000	0.002	0.000
20	0.026	0.031	0.006	0.017	0.036	0.020	0.030	0.019	0.025	0.017	0.049	0.073	0.092	0.013	0.000	0.000	0.010
21	0.039	0.055	0.031	0.029	0.010	0.029	0.020	0.042	0.015	0.038	0.049	0.188	0.108	0.019	0.002	0.005	0.019
22	0.026	0.023	0.018	0.029	0.013	0.020	0.010	0.012	0.025	0.024	0.042	0.067	0.069	0.127	0.040	0.036	0.067
23	0.075	0.070	0.076	0.092	0.085	0.082	0.087	0.051	0.045	0.066	0.063	0.056	0.054	0.348	0.119	0.146	0.125
24	0.159	0.289	0.308	0.173	0.200	0.206	0.188	0.223	0.156	0.193	0.182	0.076	0.077	0.298	0.304	0.256	0.365
25	0.170	0.133	0.159	0.153	0.177	0.176	0.158	0.136	0.221	0.259	0.168	0.048	0.062	0.146	0.217	0.231	0.115
26	0.167	0.156	0.174	0.153	0.167	0.137	0.131	0.140	0.171	0.148	0.147	0.12	0.108	0.038	0.176	0.171	0.144
27	0.103	0.047	0.098	0.127	0.069	0.065	0.064	0.076	0.030	0.066	0.126	0.123	0.085	0.013	0.091	0.097	0.135
28	0.026	0.039	0.049	0.035	0.069	0.075	0.067	0.074	0.040	0.028	0.035	0.076	0.054	0.000	0.036	0.039	0.019
29	0.005	0.016	0.024	0.026	0.016	0.023	0.020	0.019	0.025	0.028	0.000	0.028	0.069	0.000	0.013	0.016	0.000
30	0.003	0.000	0.006	0.006	0.020	0.016	0.027	0.002	0.025	0.007	0.000	0.017	0.031	0.000	0.002	0.004	0.000
31	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
33	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S10. Allele frequencies from locus DXS8377 in different populations.

Alelo	RS	Brazil, Rio de Janeiro	Colombia	Portugal	Germany	Germany	Spain, Valencia	Hispanic- American	Ghana, Ashanti	African- American	Japan	Korea	Asian- American
(n) Ref	389	332 [49]	328 [48]	347 [5]	305 [34]	294 [40]	290 [36]	143 [4]	357 [9]	130 [4]	573 [21]	582 [2]	104 [4]
37	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000
38	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
39	0.003	0.003	0.006	0.012	0.007	0.000	0.003	0.014	0.011	0.000	0.000	0.002	0.010
40	0.015	0.015	0.009	0.012	0.000	0.000	0.021	0.007	0.006	0.023	0.000	0.002	0.000
41	0.021	0.030	0.034	0.020	0.016	0.007	0.017	0.028	0.025	0.008	0.000	0.005	0.000
42	0.031	0.048	0.049	0.040	0.020	0.017	0.041	0.049	0.050	0.046	0.012	0.034	0.019
43	0.031	0.060	0.046	0.029	0.043	0.031	0.045	0.042	0.048	0.062	0.028	0.040	0.029
44	0.044	0.060	0.092	0.058	0.075	0.014	0.055	0.070	0.081	0.069	0.024	0.069	0.019
45	0.054	0.063	0.085	0.043	0.049	0.048	0.083	0.105	0.045	0.085	0.070	0.082	0.077
46	0.118	0.090	0.134	0.075	0.089	0.051	0.107	0.063	0.048	0.085	0.100	0.105	0.087
47	0.093	0.102	0.119	0.098	0.095	0.068	0.072	0.105	0.092	0.054	0.129	0.128	0.135
48	0.090	0.127	0.088	0.101	0.098	0.075	0.086	0.091	0.090	0.085	0.147	0.126	0.115
49	0.111	0.084	0.107	0.124	0.105	0.088	0.100	0.119	0.092	0.131	0.171	0.108	0.115
50	0.139	0.093	0.092	0.121	0.108	0.102	0.121	0.077	0.106	0.046	0.105	0.095	0.154
51	0.072	0.060	0.052	0.115	0.138	0.075	0.086	0.084	0.053	0.046	0.063	0.079	0.087
52	0.064	0.078	0.021	0.032	0.062	0.116	0.045	0.042	0.073	0.054	0.047	0.059	0.029
53	0.044	0.024	0.031	0.052	0.043	0.116	0.052	0.063	0.048	0.085	0.030	0.022	0.039
54	0.028	0.027	0.027	0.023	0.016	0.092	0.031	0.000	0.062	0.039	0.033	0.028	0.029
55	0.028	0.018	0.003	0.014	0.020	0.044	0.017	0.000	0.042	0.031	0.026	0.012	0.010
56	0.010	0.012	0.003	0.017	0.016	0.027	0.014	0.014	0.017	0.031	0.005	0.001	0.039
57	0.005	0.003	0.000	0.012	0.000	0.010	0.003	0.021	0.006	0.008	0.007	0.001	0.010
58	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.010	0.000	0.007	0.003	0.000	0.003	0.000	0.000
59	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.003	0.008	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S11. Allele frequencies from locus DXS7133 in different populations.

Alelo	RS	Brazil RS	Brazil, Amazon Region	Brazil, Rio de Janeiro	Brazil, Espírito Santo	Portugal, Azores- East	Portugal, Azores- Central	Portugal, Azores- West	Spain + Portugal	Germany	Italy	Ghana, Ashanti	Uganda, Karamoja	China	Japan
(n) Ref	389	200 [51]	466 [15]	332 [49]	371 [52]	117 [44]	140 [44]	47 [44]	798 [10]	305 [34]	300 [6]	357 [9]	393 [45]	146 [23]	471 [1]
6	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.002
7	0.005	0.005	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.006	0.007	0.000	0.006	0.000	0.035	0.002
8	0.005	0.000	0.000	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003	0.023	0.000	0.011	0.000	0.014	0.000
9	0.434	0.473	0.461	0.322	0.367	0.402	0.421	0.532	0.485	0.348	0.550	0.028	0.059	0.601	0.675
10	0.170	0.108	0.187	0.179	0.175	0.171	0.171	0.128	0.159	0.112	0.107	0.247	0.094	0.203	0.253
11	0.309	0.328	0.268	0.428	0.375	0.385	0.350	0.298	0.294	0.423	0.302	0.569	0.682	0.14	0.064
12	0.059	0.065	0.056	0.050	0.049	0.026	0.029	0.043	0.039	0.072	0.033	0.101	0.089	0.000	0.004
13	0.015	0.016	0.021	0.003	0.016	0.017	0.021	0.000	0.006	0.016	0.007	0.025	0.041	0.007	0.000
14	0.003	0.000	0.004	0.013	0.008	0.000	0.007	0.000	0.008	0.000	0.000	0.014	0.031	0.000	0.000
15	0.000	0.005	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Table S12. Allele frequencies from locus DXS6800 in different populations.

Alelo	RS	Brazil RS	Brazil, Amazon Region	Germany	Ghana, Ashanti	China	Korea
<i>(n)</i> <i>Ref</i>	389	200 [51]	466 [15]	232 [40]	357 [9]	600 [8]	582 [2]
15	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.002
16	0.411	0.367	0.494	0.375	0.193	0.817	0.852
17	0.000	0.011	0.047	0.056	0.008	0.000	0.000
18	0.154	0.149	0.163	0.056	0.605	0.012	0.005
19	0.273	0.324	0.200	0.362	0.135	0.101	0.082
20	0.000	0.027	0.015	0.017	0.028	0.002	0.000
21	0.090	0.122	0.034	0.112	0.031	0.013	0.006
22	0.000	0.000	0.021	0.022	0.000	0.051	0.050
23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.001

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction
n= total number of typed chromosomes

Tabela S13. Allele frequencies from locus HPRTB in different populations.

Alelo	RS	Brazil RS	Brazil, Santa Catarina	Brazil, Amazon Region	Colombia	Hispanic- American	Portugal	Germany	Germany	Germany	Italy	Italy	Finland	Somali	Ghana, Ashanti	African- American	China	Japan	Korea	Asian- American	
(n) Ref	389	200 [51]	254 [46]	466 [15]	328 [48]	143 [4]	347 [5]	305 [34]	995 [39]	292 [40]	300 [6]	824 [3]	400 [7]	400 [7]	357 [9]	130 [4]	146 [23]	573 [21]	582 [2]	104 [4]	
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.011	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.001	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.008	0.005	0.000	0.009	0.000	0.007	0.003	0.003	0.007	0.010	0.030	0.004	0.005	0.085	0.050	0.039	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.008	0.005	0.011	0.004	0.006	0.007	0.012	0.007	0.006	0.010	0.013	0.008	0.003	0.003	0.014	0.008	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000
11	0.103	0.125	0.094	0.105	0.092	0.112	0.144	0.118	0.132	0.117	0.141	0.140	0.083	0.110	0.070	0.054	0.059	0.033	0.051	0.096	0.096
11.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.001	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
12	0.329	0.326	0.358	0.264	0.232	0.259	0.329	0.341	0.354	0.344	0.346	0.348	0.383	0.268	0.403	0.315	0.235	0.269	0.249	0.250	0.250
12.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	0.301	0.266	0.311	0.357	0.342	0.322	0.311	0.328	0.324	0.326	0.262	0.285	0.295	0.245	0.202	0.239	0.387	0.490	0.478	0.452	0.452
14	0.190	0.196	0.173	0.167	0.235	0.203	0.144	0.111	0.119	0.141	0.191	0.137	0.143	0.180	0.154	0.223	0.277	0.140	0.149	0.173	0.173
15	0.059	0.044	0.023	0.086	0.076	0.077	0.040	0.089	0.044	0.045	0.030	0.064	0.060	0.080	0.087	0.108	0.042	0.056	0.063	0.019	0.019
16	0.000	0.027	0.015	0.006	0.009	0.007	0.009	0.003	0.011	0.003	0.010	0.011	0.023	0.018	0.017	0.015	0.000	0.012	0.006	0.010	0.010
17	0.003	0.006	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction

n= total number of typed chromosomes

Table S14. Allele frequencies from locus DXS6801 in different populations.

Alelo	RS	Germany	Italy
<i>(n)</i>	389	1486	240
<i>Ref</i>		[58]	[57]
7	0.000	0.002	0.000
8	0.005	0.015	0.008
9	0.008	0.000	0.004
10	0.082	0.056	0.058
11	0.509	0.524	0.554
12	0.267	0.248	0.279
13	0.093	0.118	0.071
14	0.028	0.034	0.021
15	0.008	0.003	0.008

P<0.05

Fisher's Exact Test, with Bonferroni's correction

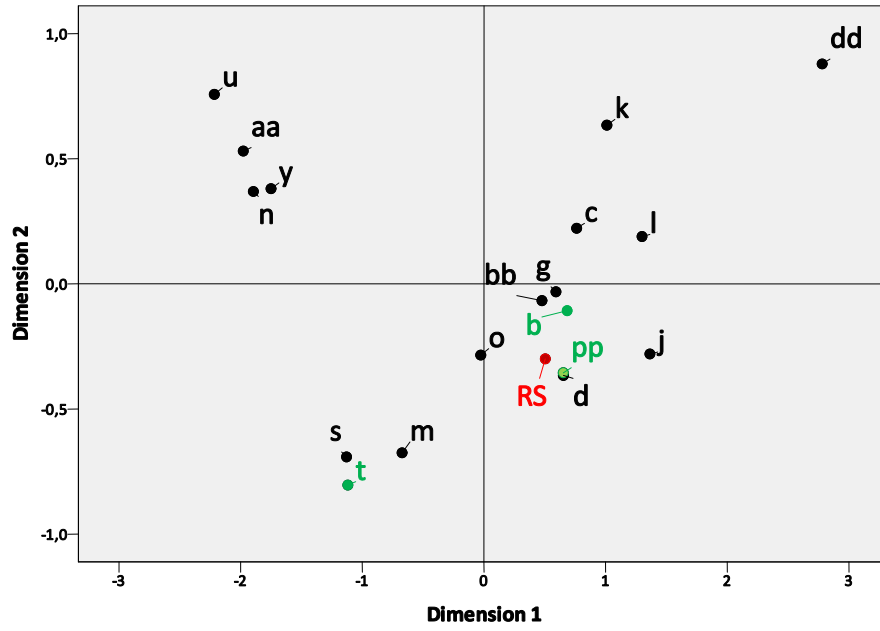
n= total number of typed chromosomes

B – Gráficos Complementares

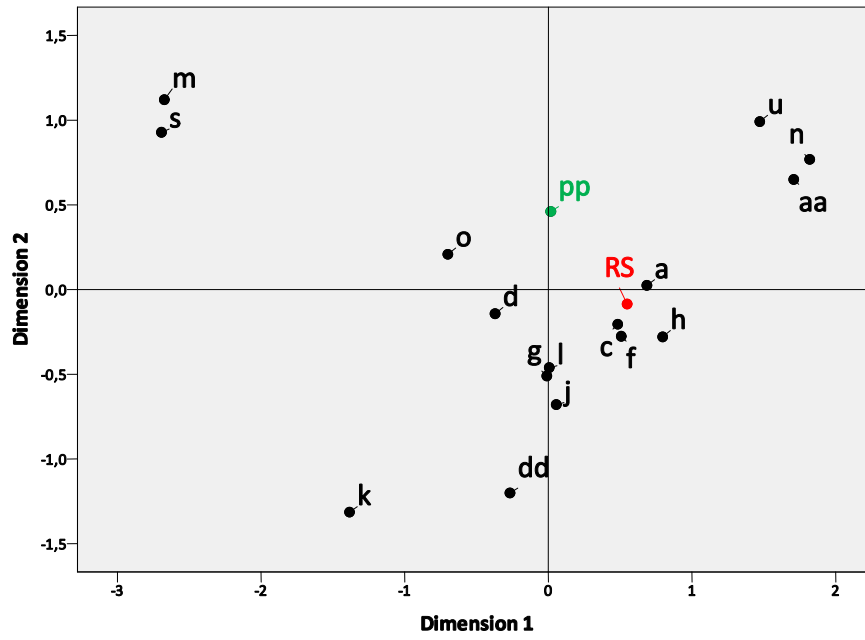
Escalonamento multidimensional (MDS) de 13 locos de STRs do cromossomo X dos dados estudados e dos dados de populações disponíveis na literatura. Cada ponto representa uma população, identificada como:

- a, Colômbia (Santander) [48];
- b, Brasil (Rio Grande do Sul) [51];
- c, Portugal (Açores-Leste) [44];
- d, Portugal (Açores-Central) [44];
- dd, Portugal (Açores-Oeste) [44];
- f, Portugal (Norte) [5];
- g, Espanha/Portugal [10];
- h, Itália (norte) [6];
- i, Itália (central e norte) [3];
- j, Espanha (Cantabria) [38];
- k, Espanha (Pas valley) [38];
- l, Espanha (Valencia) [36];
- m, Estados Unidos (Afro-Americanos) [4];
- n, Estados Unidos (Asiáticos-Americanos) [4];
- o, Estados Unidos (Hispânicos Americanos) [4];
- p, Alemanha (Leste) [12];
- q, China (Luoba Grupo Étnico no Tibet) [23];
- r, Japão [1];
- s, Uganda (Karamoja) [45];
- t, Brasil (região Amazônica) [15];
- u, Coreia [2];
- v, Alemanha (Münster and curdos) [40];
- x, China (grupo étnico Han) [8];
- z, Gana (Ashanti) [9];
- w, Alemanha [33];
- y, Coreia [18];
- aa, Japão [21];
- bb, Alemanha (nordeste) [34];
- cc, Alemanha [39];
- ee, Somália [7];
- ff, Finlândia [7];
- gg, Alemanha [13];
- hh, Alemanha [41];
- kk, Espanha (Cantabria) [32];
- mm, Brasil (Santa Catarina) [46];
- pp, Brasil (Espírito Santo) [52];
- rr, Brasil (Rio de Janeiro) [49];
- xx, Brasil (São Paulo) [47].

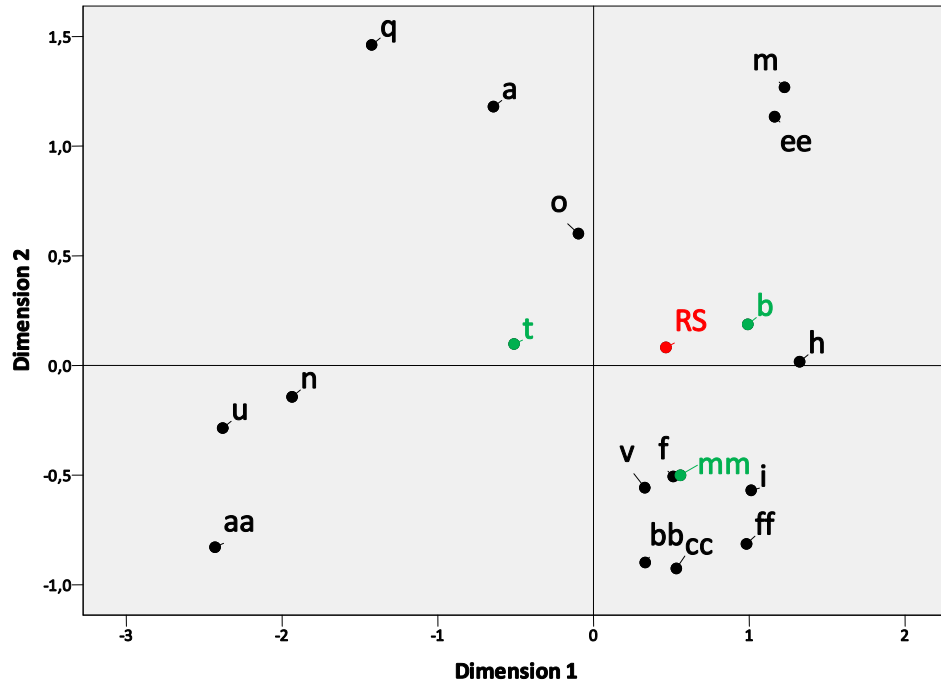
DXS9898



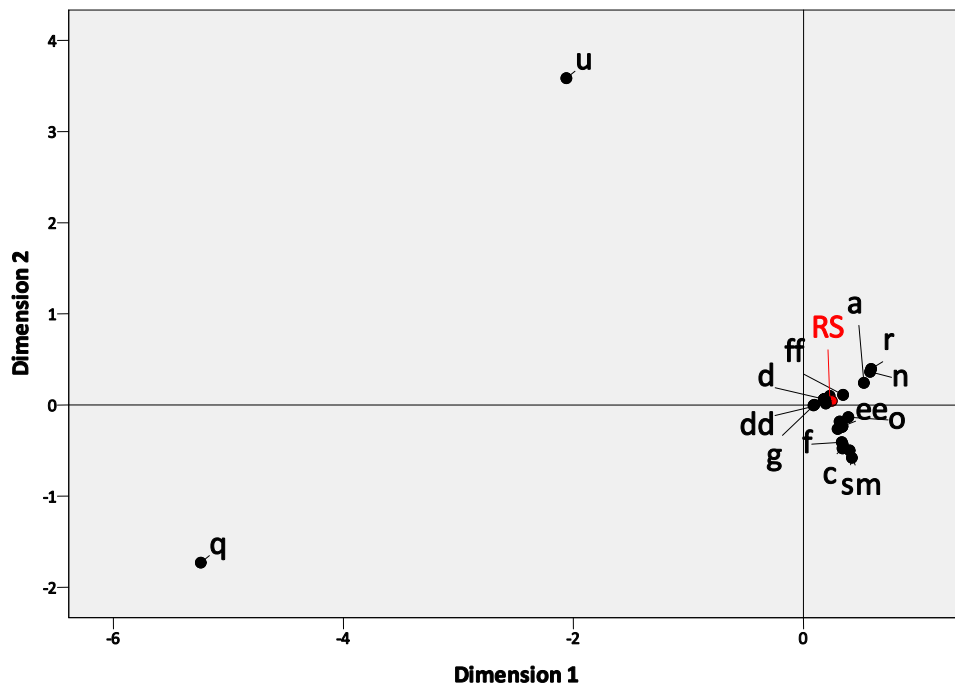
GATA172D05



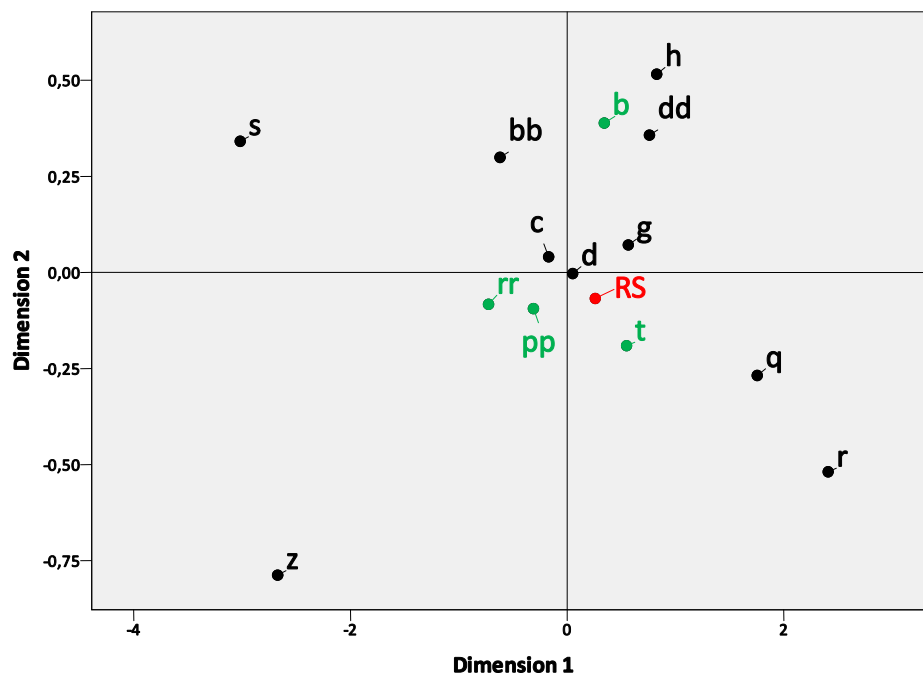
HPRTB



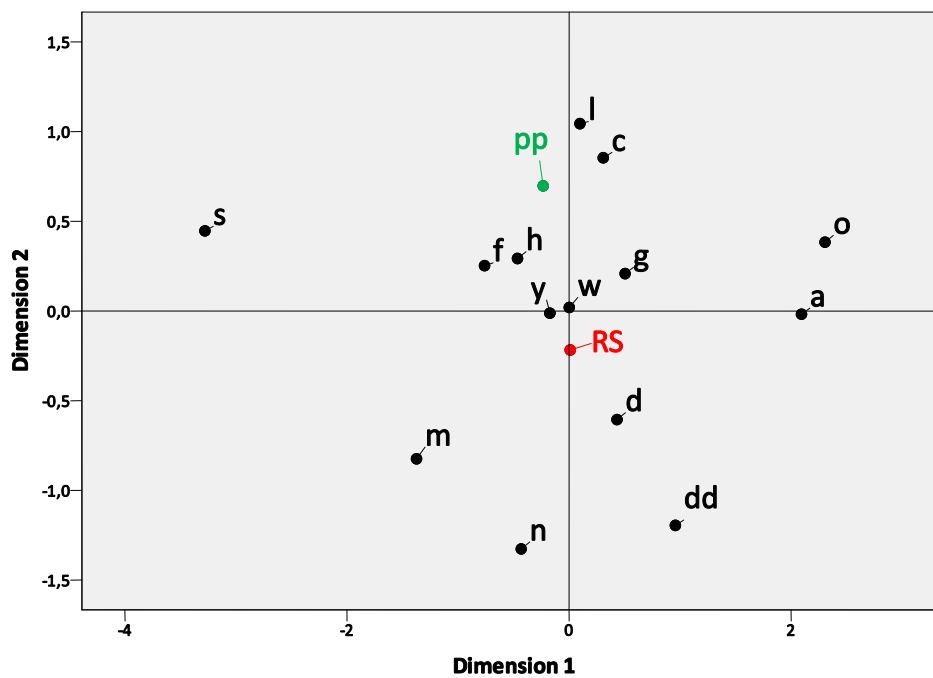
DXS8378



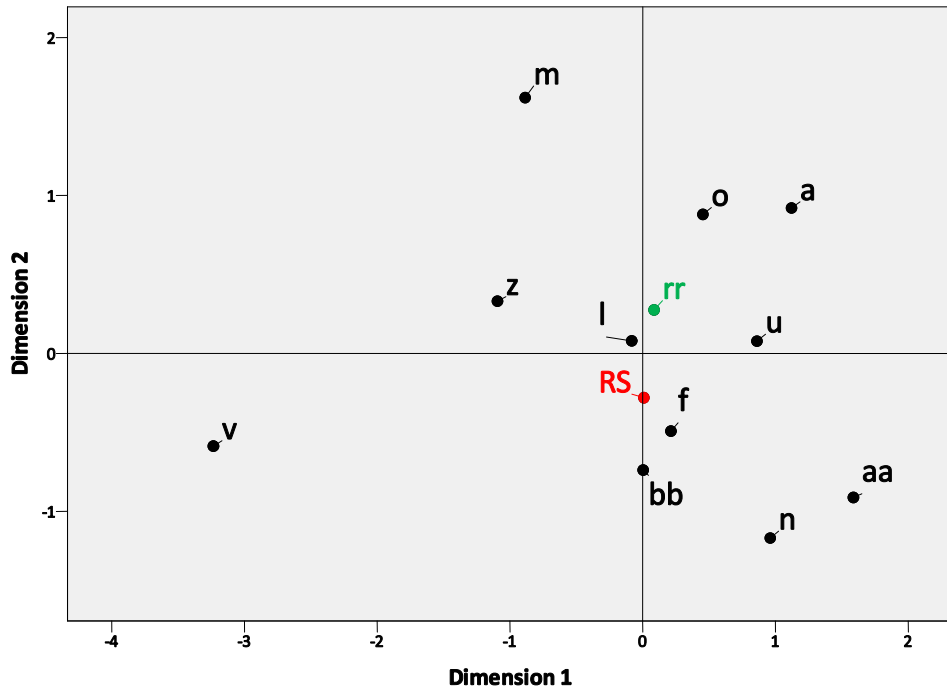
DXS7133



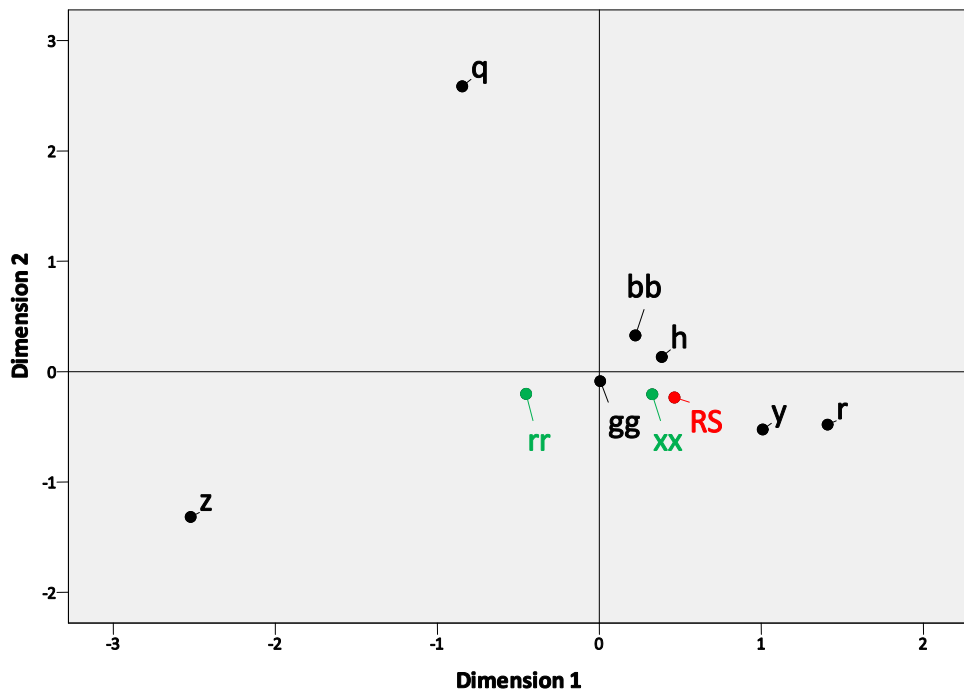
DXS6809



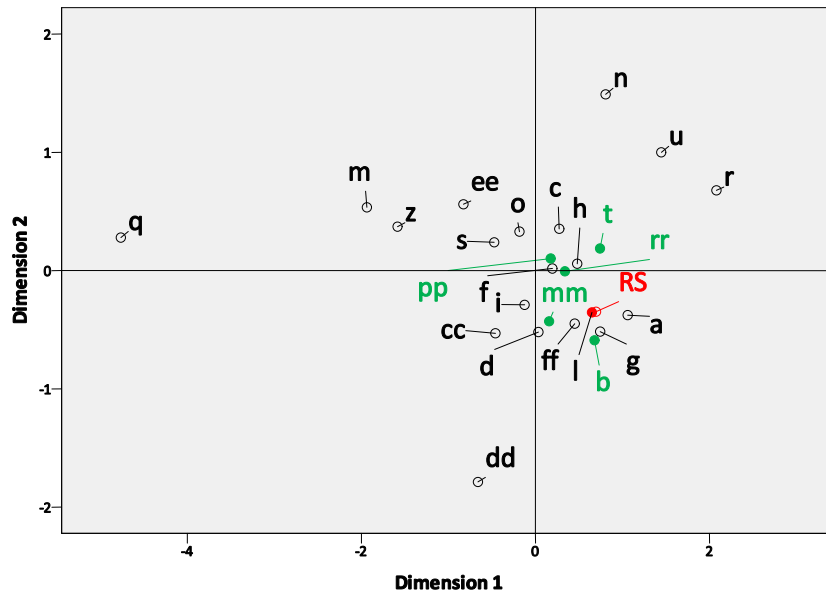
DXS8377



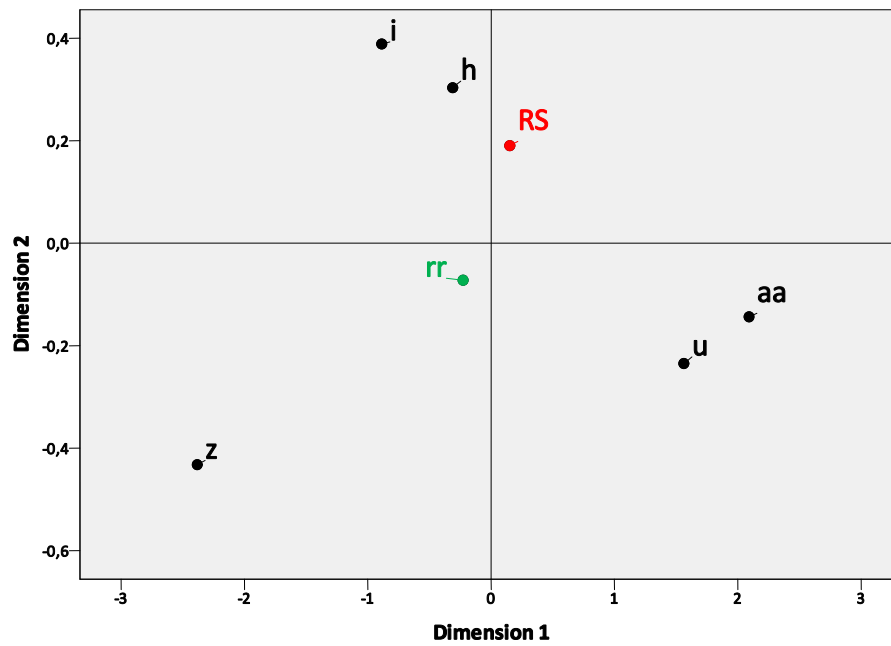
DXS7424



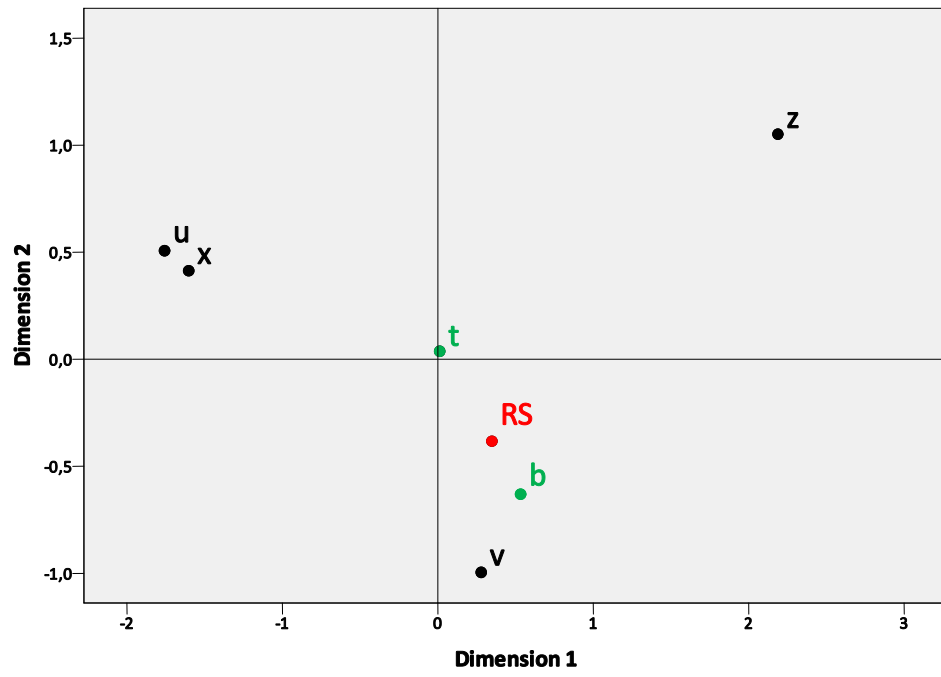
DXS7423



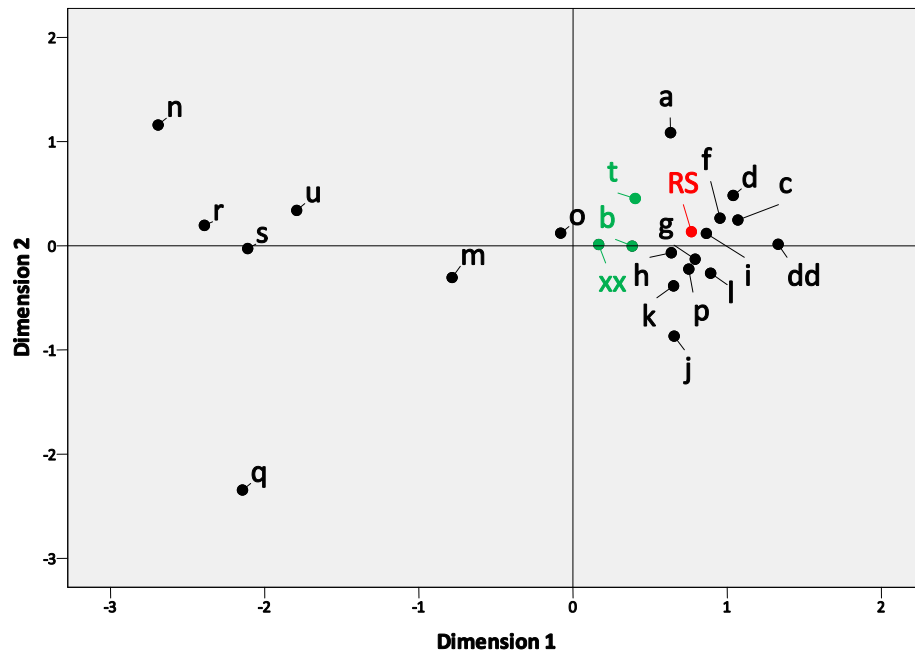
DXS6807



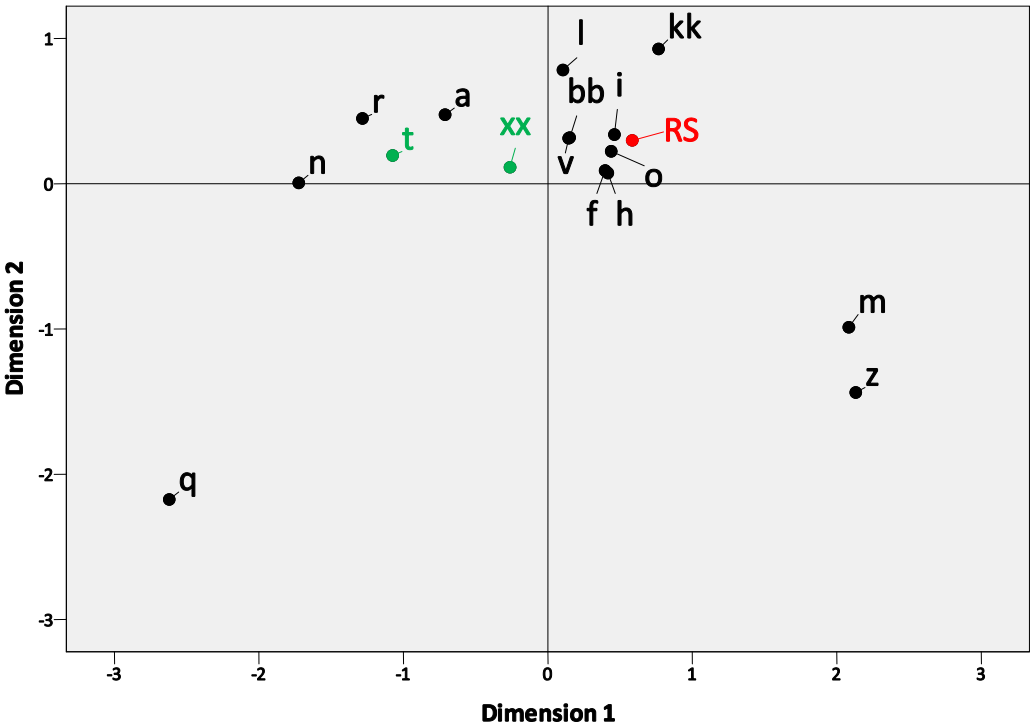
DXS6800



DXS6789



DXS101



ANEXOS

Anexo I – Carta de aprovação do Comitê de Ética do HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 09-169

Pesquisadores:

LUIZ FERNANDO JOB JOBIM
LARISSA SIQUEIRA PENNA
FERNANDA GAMIO SILVA
JOSE ANTONIO DE AZEVEDO MAGALHAES
GISELE MENEZES EWALD

Título: FREQUÊNCIA ALÉLICA DE 14 LOCOS DO CROMOSSOMO X DE INDIVÍDUOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 04 de junho de 2009.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA