

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

ESTUDO DA FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DOS MARCADORES
MICROSSATÉLITES LIGADOS AO CROMOSSOMO X, DXS7424,
DXS101, DXS10079, DXS10075 E DXS10074 NA POPULAÇÃO DE
ALAGOAS

IEDE HERCILIA EMERENCIANO FERREIRA DA SILVA

MACEIÓ - AL
JANEIRO DE 2008

IEDE HERCILIA EMERENCIANO FERREIRA DA SILVA

ESTUDO DA FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DOS MARCADORES
MICROSSATÉLITES LIGADOS AO CROMOSSOMO X, DXS7424, DXS101,
DXS10079, DXS10075 E DXS10074 NA POPULAÇÃO DE ALAGOAS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, PARA
OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍZ ANTÔNIO FERREIRA
DA SILVA / INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
DA SAÚDE/ UFAL.

MACEIÓ - AL
JANEIRO DE 2008

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S585e Silva, Iede Hercilia Emerenciano Ferreira da.
Estudo da frequência haplotípica dos marcadores microssatélites ligados ao cromossomo X, DXS7424, DXS101, DXS10079 e DXS10074 na população de Alagoas / Iede Hercilia Emerenciano Ferreira da Silva. – Maceió, 2008.
83.f. : il. tabs., graf.

Orientador: Luiz Antônio Ferreira da Silva.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências da Saúde. Maceió, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Genética humana. 2. DNA. 3. Marcador Microssatélites. 4. Cromossomos X.
5. Genética de populações – Alagoas. 6. Frequências alélicas – Análise. I. Título.

CDU: 575.17(813.5)

A MEU ESPOSO LUIZ ANTÔNIO E AOS
MEUS FILHOS ALCEU, ANTÔNIO CARLOS
E VALÉRIO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação de Amparo á pesquisa do Estado de Alagoas-FAPEAL pelo estímulo financeiro. Ao professor Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva agradeço pela oportunidade, de sob sua orientação desenvolver a minha tese de mestrado.

Aos colegas de trabalho: Adriana Braga de Góes Barbosa pelo apoio e incentivo, Dalmo Azevedo, Benísio Ferreira da Silva Filho, Gustavo Reis B. de Souza, Djavan David Fernandes, Fátima Santos, Laura Monteiro, André Santana, Ana Rachel Vasconcelos de Lima e Andersom Brandão Leite, pela Colaboração e ajuda no momento certo.

Um agradecimento especial a Lúcia Caetano ao prof.Luiz Carlos Caetano e ao prof. Francisco Javier Tovar pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 - Tipagem do DNA como método de identificação e caracterização genética inequívoca.....	11
1.2 - O genoma humano.....	12
1.3 - Importância das seqüências repetidas.....	14
1.4 - Primeiros marcadores.....	14
1.5 - Marcadores microssatélites.....	16
1.6 - Marcadores do cromossomo X.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 - Amostra estudada.....	23
3.2 - Extração do DNA.....	24
3.3 - Locos analisados.....	24
3.4 - Amplificação do DNA.....	25
3.5 - Eletroforese e identificação dos alelos.....	27
3.6 - Cálculos estatísticos.....	28
4. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8. ANEXOS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Organização e composição do genoma humano.....	13
Figura 02.	Estrutura dos minissatélites.....	16
Figura 03.	Estrutura e nomenclatura dos microsatélites.....	17
Figura 04.	Nomenclatura sistemática da maioria dos STRs.....	18
Figura 05.	Distribuição dos marcadores do cromossomo X estudados.....	21
Figura 06.	Mapa do estado de Alagoas indicando os municípios de origem dos 404 indivíduos analisados.....	23
Figura 07.	Eletroferograma do DNA amplificado com os cinco marcadores do cromossomo X.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Número de indivíduos correspondente a cada município analisado.....	24
Tabela 02.	Características dos locos estudados.....	25
Tabela 03.	<i>Primers</i> dos marcadores utilizados.....	26
Tabela 04.	Reagentes e concentrações dos <i>primers</i> nas reações.....	26
Tabela 05.	Ciclos de amplificação.....	27
Tabela 06.	Alelos da K562 e 9947A utilizados para calibração.....	27
Tabela 07.	Frequências alélicas combinadas de homens e mulheres.....	32
Tabela 08.	Haplótipos masculinos para os cinco marcadores DXS10079, DXS10074, DXS7424, DXS10075 e DXS101.....	33
Tabela 09.	Haplótipos masculinos para os marcadores ligados DXS10079-DXS10074-DXS10075 e DXS7424-DXS101.....	38
Tabela 10.	Frequências alélicas do loco DXS10079 na população masculina do Estado de Alagoas.....	42
Tabela 11.	Frequências alélicas do loco DXS10075 na população masculina do Estado de Alagoas.....	43
Tabela 12.	Frequências alélicas do loco DXS10074 na população masculina do Estado de Alagoas.....	44
Tabela 13.	Frequências alélicas do loco DXS7424 na população masculina do Estado de Alagoas.....	45
Tabela 14.	Frequências alélicas do loco DXS101 na população masculina do Estado de Alagoas.....	46
Tabela 15.	Parâmetros forenses.....	47

Tabela 16.	Freqüências alélicas do loco DXS10079 na população feminina do Estado de Alagoas.....	48
Tabela 17.	Freqüências alélicas do loco DXS10075 na população feminina do Estado de Alagoas.....	49
Tabela 18.	Freqüências alélicas do loco DXS10074 na população feminina do Estado de Alagoas.....	50
Tabela 19.	Freqüências alélicas do loco DXS7424 na população feminina do Estado de Alagoas.....	51
Tabela 20.	Freqüências alélicas do loco DXS101 na população feminina do Estado de Alagoas.....	52
Tabela 21.	Parâmetros estatísticos para o marcador DXS10079.....	53
Tabela 22.	Parâmetros estatísticos para o marcador DXS10075.....	53
Tabela 23.	Parâmetros estatísticos para o marcador DXS10074.....	54
Tabela 24.	Parâmetros estatísticos para o marcador DXS7424.....	54
Tabela 25.	Parâmetros estatísticos para o marcador DXS101.....	55
Tabela 26.	Probabilidade de coincidência combinada em homens e mulheres.....	55
Tabela 27.	Chance Média de Exclusão Combinada.....	55

RESUMO

Os marcadores STRs ligados ao cromossomo X podem ser utilizados para complementar as análises de marcadores autossômicos, especialmente em casos complexos de vínculo genético, em casos de identificação *post-mortem* e em testes de paternidade, quando a criança analisada é uma menina. O objetivo desse trabalho foi investigar cinco marcadores STRs do cromossomo X (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS7424 e DXS101) na população de Alagoas, Brasil, e analisar suas frequências para propósitos forenses. A amostra foi composta de 404 indivíduos não aparentados, sendo 203 do sexo masculino e 201 do sexo feminino. O DNA foi extraído através do método Chelex-100 e a amplificação foi realizada por PCR em um sistema pentaplex, sendo os fragmentos separados por eletroferese de capilar. Para os marcadores STRs estudados, foram calculadas as frequências alélicas e haplotípicas, Heterozigidade esperada e observada, Equilíbrio de Hardy–Weinberg (HWE), diversidade genética, Chance Média de Exclusão (MEC) em trios envolvendo filhas e em duplas de pai/filha. Também foram calculados Poder de Discriminação em homens (PD_M) e mulheres (PD_F) e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). Os parâmetros forenses investigados demonstram que o STR DXS101 é o marcador mais informativo, seguido por DXS10074, DXS10079, DXS7424 e DXS10075. O Conteúdo de Informação Polimórfica variou de 0.7470 a 0.8858. Para o sistema pentaplex investigado, os valores combinados de PD_M e PD_F foram de 0,9998947 e 0,9999998, respectivamente e o MEC combinado em trios envolvendo filhas e em duplas pai/filha foi de 0,999817 e 0,998042, respectivamente. Nenhum desvio do Equilíbrio de Hardy–Weinberg foi observado. Concluímos que os cinco marcadores analisados são altamente informativos para testes de parentesco e constituem uma poderosa ferramenta genética para a prática forense em nossa população.

ABSTRACT

The STR markers linked to the X chromosome can be used for complement the analysis of autosomal markers, especially in complex cases of kinship testing, in cases of *post-mortem* identification and in paternity testing, when the disputed child is a girl. The aim of this work was investigate five STR X-chromosome markers (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS7424 and DXS101) in the population of Alagoas, Brazil and analyze their frequencies for forensic purposes. The sample was composed of 404 unrelated individuals, 203 males and 201 females. The DNA was extracted using Chelex procedure and amplification was performed by PCR in a pentaplex system and the fragments were separated by capillary electrophoresis. For the studied STR markers, it was calculated the allele and haplotype frequencies, the observed and expected Heterozygosity values, the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), the genetic diversity, the Mean Exclusion Chance of trios involving daughters (MEC_T) as well as in father/daughter duos (MEC_D). Also, it was calculated Power of Discrimination in males (PD_M) and in females (PD_F) and the Polymorphism Information Content (PIC). The forensic efficiency values demonstrate that DXS101 is a highly informative marker, followed by DXS10074, DXS10079, DXS7424 and DXS10075. The polymorphism information content ranged from 0.7470 to 0.8858. For the pentaplex evaluated, the combined values of PD_M and PD_F were 0,9998947 and 0,9999998, respectively and the combined MEC in trios involving daughters and in father/daughter duos were 0,999817 and 0,998042, respectively. No deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium were observed. We concluded that the five ChrX STRs analyzed are highly informative markers for kinship testing and constitute a powerful tool for forensic practice in our population.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Tipagem do DNA como método de identificação e caracterização genética inequívoca.

Todos os organismos vivos apresentam algum grau de variabilidade genética, sendo esta variação a matéria prima para o processo evolutivo (Futuyma, 1998). Como o DNA (ou RNA) é o material genético dos seres vivos, é de grande importância o conhecimento da seqüência de bases e organização de seus genomas. Este conhecimento permite uma melhor compreensão do processo evolutivo, bem como o desenvolvimento de novas técnicas de estudo da variação genética e sua aplicação na ciência básica e a utilização de novas tecnologias em várias áreas de interesse, como agricultura, medicina e ciência forense (Collins *et al.* 2003).

Nas últimas três décadas avanços na biologia molecular, bem como em áreas afins, resultou no desenvolvimento da tecnologia do seqüenciamento do DNA de forma rápida e a baixo custo (Davies, 2000). Atualmente já estão seqüenciados os genomas de um grande número de espécies de bactérias, vírus e eucariontes, destacando-se dentre estes o genoma humano (A quick guide to Sequenced Genomes, 2007).

O término do seqüenciamento do genoma humano confirmou o que já se aceitava como verdade, baseado em resultados indiretos, de que não existem duas pessoas com a mesma seqüência de bases, exceto gêmeos idênticos. (Human Genome Project Information, 2007). Baseados nestas descobertas métodos sofisticados de análise do DNA foram desenvolvidos, sendo possível hoje o estudo da variação genética e sua quantificação intra e inter-populacional com grande rigor e eficácia. (Butler, 2005).

A tipagem do DNA, como método de identificação e caracterização genética, baseia-se no estudo comparativo das diferenças encontradas nas seqüências de bases de dois indivíduos quaisquer quer através da comparação de seqüências de DNA ou análise de fragmentos.

No entanto a tipagem do DNA, com a eficiência e segurança de hoje, somente se tornou possível devido às descobertas ocorridas no início do século XX e que deram origem à biologia molecular.

O início das grandes descobertas da biologia molecular, e que resultaram nos avanços científicos e tecnológicos de hoje, pode ser situado no ano de 1928, quando o pesquisador britânico Fred Griffith, estudando a virulência das bactérias *Streptococcus*

pneumoniae observou que algo tinha transformado as bactérias não virulentas (lisas) na variedade virulenta (rugosa). Ao finalizar o experimento, concluiu que “um princípio transformante”, de caráter genético, presente em seus extratos podia mudar as características das bactérias. Esses resultados chamaram a atenção de um imunologista da universidade de Rockefeller em Nova York, Oswald Avery.

Avery e seus colaboradores, Collin MacLeod e Maclyn MacCarty, iniciaram estudos que culminaram em um artigo publicado em 1944, concluindo que o princípio transformante não eram as proteínas, mas sim o ácido desoxirribonucléico (DNA). A evidência apresentada confirmou a crença de que o DNA era a unidade fundamental do princípio transformador descrito por Griffith (Griffiths *et al.* 2002). De 1945 a 1950, Erwin Chargaff, um bioquímico austríaco estudou a composição química do DNA, separando e quantificando as quatro bases constituintes: adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T).

Resultados oriundos de análises mais abrangentes demonstraram uma relação matemática entre as proporções de bases, levando Chargaff a concluir que o número de adeninas é igual ao número de timinas e que o número de guaninas é igual ao número de citosinas, isto é $A=T$ e $G=C$. (Watson, 2004).

Em 1952 utilizando-se de técnicas de análise de difração de raios X, desenvolvidas por Maurice Wilkins e Rosalind Franklin, James Watson e Francis Crick iniciaram os trabalhos para desvendar a estrutura tridimensional do DNA. Baseados no padrão de difração de raios X e utilizando modelos, Watson e Crick elucidaram em 1953 a estrutura do DNA. (Watson, 2004). Com os artigos publicados na revista Nature, Watson e Crick deram início à nova era da biologia molecular.

1.2 - O genoma humano

O DNA no genoma nuclear humano está organizado em 24 cromossomos distintos, sendo 22 autossomos e dois cromossomos sexuais. Cada cromossomo é formado por uma única molécula de DNA com alto grau de espiralização, com tamanho de 50 a 250 milhões de pares de bases..

Todas as células nucleadas possuem um genoma completo, sendo que as células sexuais possuem 23 cromossomos (N) e as somáticas possuem dois conjuntos de cromossomos (2N). O genoma humano contém 3.164.700.000 pares de bases (A,T,G,C), organizadas em seqüências codificantes, os genes, e seqüências não

codificantes. Estima-se que o genoma humano contenha 30.000 genes. (Human Genome Project Information, 2007). Menos de 2% do total de bases codifica aminoácidos para a produção de proteínas e aproximadamente 50% das bases não tem função codificante (figura 1) (Watson *et al.* 2006).

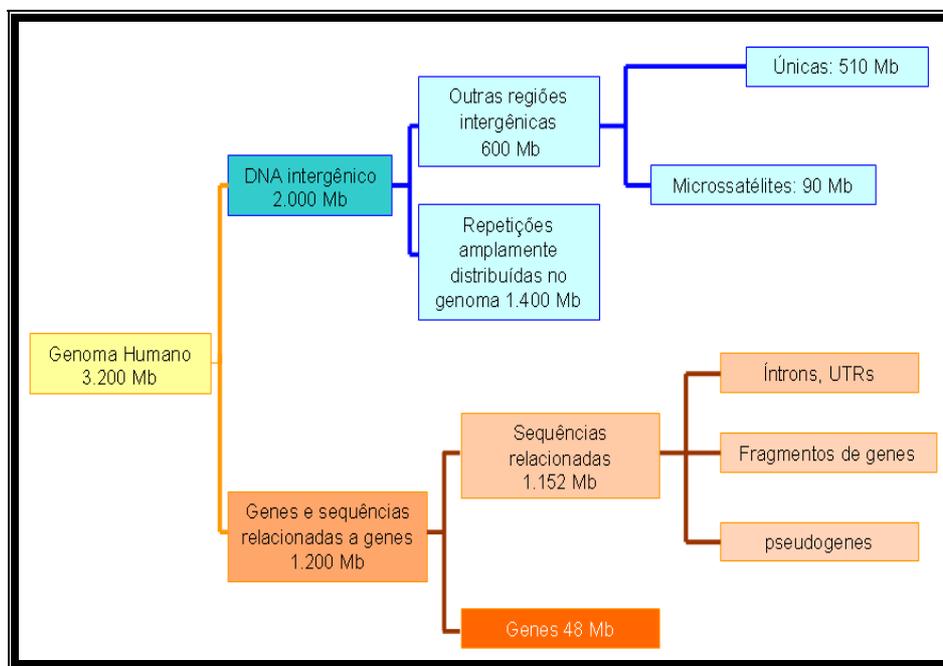


Figura 01. Organização e composição do genoma humano. Adaptada de James D. Watson 2006, *Biologia Molecular do Gene*, 5ª edição, p 137.

A ordem das bases no DNA de duas pessoas tomadas ao acaso é idêntica em 99,9%, o que equivale a dizer que a diferença genética entre duas pessoas, no que diz respeito à seqüência de bases, está restrita a aproximadamente 3 milhões de bases. Aproximadamente 90% desta variação genética entre dois indivíduos é devida aos polimorfismos de base única (SNPs – Single Nucleotídeo Polimorphisms), os quais ocorrem a cada 100-300 bases ao longo de todo o genoma (SNP Fact Sheet, 2007).

Outra característica importante sobre a organização das seqüências de bases no genoma humano é a ocorrência de seqüências repetidas.

Estas seqüências, aparentemente sem função genética, são neutras do ponto de vista evolutivo, não sendo afetadas pela seleção natural, são altamente polimórficas e com distribuição em todo o genoma (Watson, 2006).

Devido a estas características as seqüências repetidas são utilizadas como alvo nos estudos de tipagem genética para caracterização e individualização de um grande número de organismos vivos (Goldstein e Schlotterer, 1999).

1.3 - Importância das seqüências repetidas

As seqüências repetidas no genoma humano podem ser classificadas de forma abrangente em dois grupos: os *microssatélites* e as *repetições distribuídas pelo genoma* (Watson *et al.* 2006). Os microssatélites são compostos por repetições curtas, menos de 10 pares de bases (pb), dispostas em tandem e sua localização no genoma são aleatórios. Essas seqüências, conhecidas como marcadores genéticos, são de fundamental importância na área da medicina onde técnicas de biologia molecular são aplicadas para obtenção do diagnóstico de várias doenças (Coleman e Tsongalis, 2005).

Também são importantes na área de biologia forense, identificando restos mortais e servindo às investigações criminais, podendo inocentar suspeitos ou ainda ligá-los à cena do crime; em testes de paternidade, análise de ligação, ecologia molecular (animais em extinção), estudos populacionais (origem e migrações) e mapeamento genético. (Goldstein e Schlotterer, 1999).

As *repetições distribuídas pelo genoma* são seqüências muito maiores que os microssatélites e são formas de elementos de transposição, não sendo utilizadas para tipagem por DNA para fins de identificação e individualização (Watson *et al.* 2006).

1.4 - Primeiros marcadores

O primeiro marcador genético utilizado para identificação humana na área forense foi sistema ABO, descoberto em 1901 por Karl Landsteiner. Em 1915 Leone Lattes desenvolveu um método que permitia a determinação do grupo ABO em amostras de sangue seco, tendo logo ampla utilização na investigação criminal (Understanding the World of Forensics, 2007). O sistema ABO pode provar que uma amostra não pertence a um suspeito relacionado a cena do crime, ou seja, exclui um suspeito de ser o doador da amostra (Jobling & Gil 2004).

As determinações do grupo ABO podem ser repetidas, mas não são suficientemente informativas, pois existem apenas 4 grupos que são tipados; A, B, O e AB, sendo que

para algumas populações aproximadamente 40% das pessoas pertencem ao grupo O (Butler, 2005).

Até a década de cinquenta não apenas o sistema ABO estava sendo usado para tipagem, mas também um conjunto de marcadores dos grupos sanguíneos como os antígenos eritrocitários, polimorfismos alozímicos e proteínas séricas (Azevedo, 2006).

Em 1985 Alec Jeffreys publicou um estudo em que reporta a ocorrência no genoma humano de seqüências repetidas e altamente variáveis. Jeffreys havia identificado uma seqüência repetida em tandem, um minissatélite, no intron do gene da mioglobina.

Este minissatélite foi utilizado como sonda para identificar estas seqüências distribuídas por todo o genoma humano (Discovering DNA fingerprint, 2007). Dada a grande capacidade de discriminação destas repetições, a técnica foi denominada de “DNA Fingerprint”, por analogia com a técnica de impressões digital clássica (Jeffreys *et al.* 1985). Esta técnica baseia-se no uso de sondas multilocais VNTRs (Variable Numbers of Tandem Repeats = Repetições em Tandem de Número Variável). Este método permite a análise simultânea de vários loci no DNA do genoma humano, mas sem nenhum conhecimento prévio sobre a distribuição e segregação destes marcadores (Koblinsky *et al.* 2005). As sondas moleculares que detectam vários loci no genoma, sondas multilocais, logo foram substituídas por sondas que detectam somente um único marcador genético no genoma humano, as sondas unilocais, o que permitiu análises precisas de segregação e de frequência populacional dos alelos. Tanto os VNTRs multilocais como os unilocais são estudados utilizando a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphisms - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição).

Os minissatélites têm como características serem formados por unidades repetidas em tandem, cada unidade é formada por 8 a 80 pares de bases (pb), com tamanho variável de 500 a 10.000 pb (Koblinsky *et al.* 2005; Sheindlin, 1996). O tamanho do “alelo” de um determinado minissatélite é definido pelos respectivos sítios de reconhecimento de enzimas de restrição que o flanqueiam (figura 2).

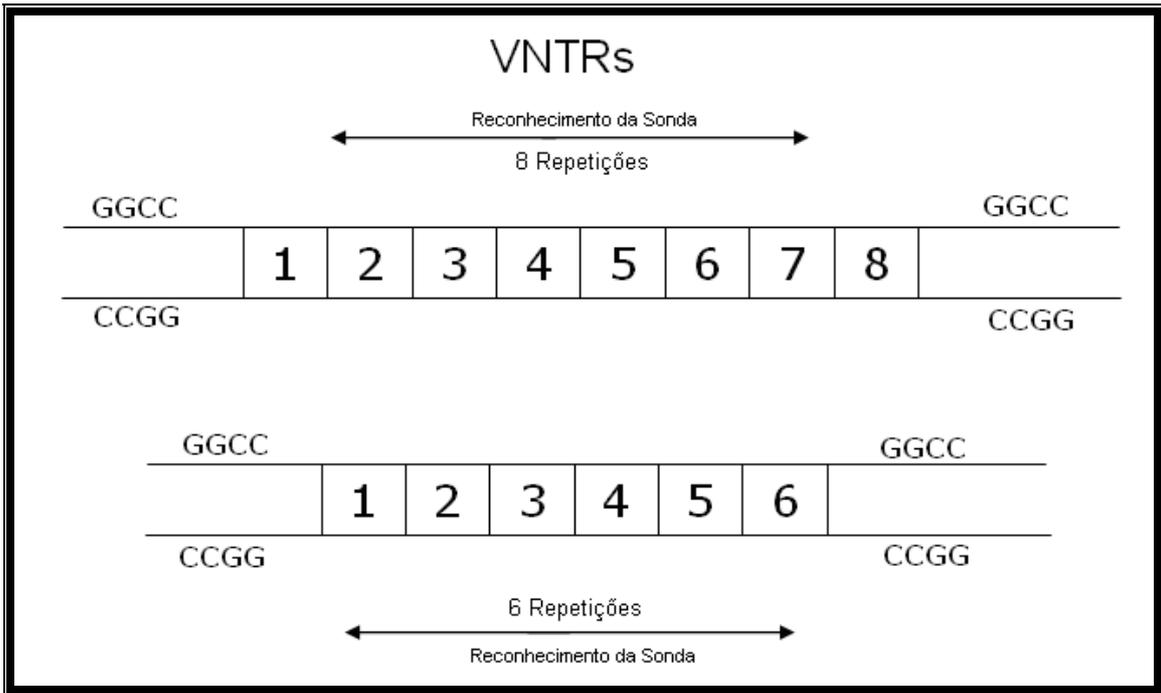


Figura 02. Estrutura dos minissatélites. Adaptada de Hummel 2003.

Os minissatélites foram utilizados amplamente na tipagem genética para fins forenses até o advento da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction-Reação em cadeia da Polimerase) e a introdução de uma nova geração de marcadores de seqüências repetidas, os microssatélites.

1.5 - Marcadores microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como STRs (*Short Tandem Repeats* – Repetições Curtas em Tandem) (figura 3) é uma classe de seqüências repetidas que estão distribuídas por todo o genoma humano, respondendo por aproximadamente 90 Mb (megabases) do total de bases (Watson *et al.* 2006). Os microssatélites possuem de dois a sete pares de bases por repetição, com tamanho variável de 100 a 400 pb. (Butler, 2001). As seqüências mais abundantes no genoma humano são as repetições formadas por dois nucleotídeos, que correspondem a aproximadamente 3% do genoma humano (Watson *et al.* 2006). Os marcadores STRs utilizados na ciência forense são basicamente os tetranucleotídeos, sendo os penta e hexanucleotídeos menos usados e também menos freqüentes no genoma humano (Butler, 2005).

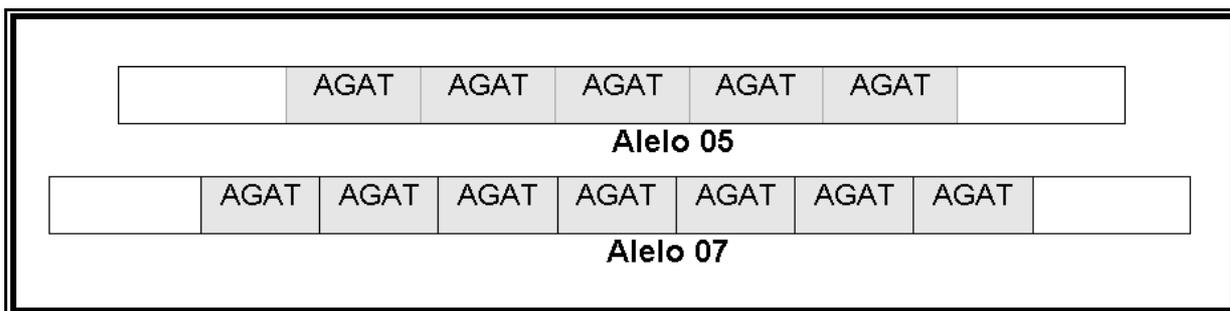


Figura 03. Estrutura e nomenclatura dos microssatélites (STRs). Adaptado de Hummel 2003.

Os STRs, diferentemente dos minissatélites, podem ser detectados utilizando a técnica de PCR e são de tamanho curto, em torno de 400 pb. Estas são características de grande importância para um marcador genético com aplicação forense, uma vez que na maioria das vezes as amostras biológicas utilizadas estão presentes em quantidades mínimas e o DNA está degradado.

O tamanho dos marcadores STRs é definido pelos locais de pareamento dos primers que flanqueiam as unidades de repetição. Portanto a utilização de STRs depende do conhecimento prévio das regiões conservadas às quais os primers pareiam. Outra vantagem dos STRs é que são marcadores de cópia única, ou seja ocorrem uma única vez no genoma, e sua posição nos diferentes cromossomos é bem conhecida o que permite estudos de segregação.

As principais vantagens dos STRs tetranucleotídeos sobre os STRs di e trinucleotídeos e os minissatélites são: tamanho pequeno, o que permite reação única com vários marcadores (multiplex) e a amplificação de DNA degradado e em pequenas quantidades e grande eficácia de amplificação por PCR, não gerando alelos falsos (Butler, 2005).

Para os STRs, o padrão de nomenclatura segue uma ordem pré-estabelecida: o “D” significa DNA, sendo seguido por um número que representa o número do cromossomo em que está localizado, o “S”, do inglês *single copy sequence* significa sequência de cópia única e por último, o número do loco que representa a ordem que foi descrito (Figura 4).

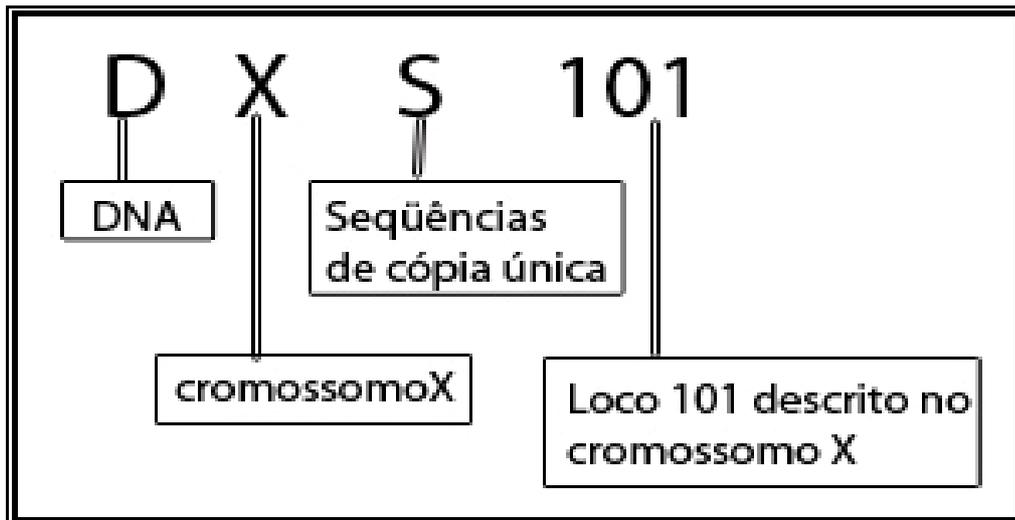


Figura 04. Nomenclatura sistemática da maioria dos STRs. Adaptado de Butler 2005.

O polimorfismo dos microssatélites se deve ao fato deles poderem ganhar ou perder unidades, assim, a identificação dos alelos é fornecida pelo número de unidades. Por terem um pequeno comprimento, com poucos pares de bases (100 a 400 pb), prestam-se perfeitamente a análise de amostras com pouco DNA ou com DNA degradado, como nos casos de ossos antigos e de restos mortais em adiantado processo de deterioração.

Desde a sua descoberta, pelos motivos acima mencionados, longa é a lista de aplicações como em áreas de identificação humana, disputas de paternidades e em casos forenses. Em estudos de evolução é notável a contribuição dada pelos microssatélites na busca pelas origens das mais variadas formas de vida, principalmente das populações humanas, fornecendo também subsídios para a compreensão de populações mais antigas, a origem do homem e dos seus movimentos migratórios inter e entre continentes (Ruiz Linares, 1999).

O estudo do DNA teve início com marcadores para cromossomos autossomos que estão presentes nos núcleos de todas as células, mais tarde com o surgimento de novas necessidades na área forense, iniciaram-se os estudos com os marcadores localizados nos cromossomos sexuais X e Y. Estes marcadores auxiliam nos casos em que um dos envolvidos não pode ser estudado. Outra ferramenta importante na prática forense é a do DNA mitocondrial usado em amostras cujo DNA está muito degradado.

1.6 - Marcadores do cromossomo X

Os marcadores STRs ligados aos cromossomos sexuais X e Y podem ser utilizados para complementar as análises efetuadas com marcadores autossômicos. A utilização dos marcadores ligados ao cromossomo X é de grande ajuda nos casos de estudos de vínculo genético, em que a análise da transmissão do cromossomo X pode ser mais informativa do que os outros marcadores. São particularmente informativos nos casos de estudos de paternidade em que a criança é do sexo feminino, em casos de identificação post-mortem e teste de paternidade deficiente e quando o suposto pai não pode ser tipado. Nestes casos a investigação dos marcadores do cromossomo X pode fornecer a informação desejada (Szibor *et al.* 2003). A utilização dos marcadores do cromossomo X também é vantajosa na investigação de paternidade de segundo e terceiro grau envolvendo primos ou tias e sobrinhas (Szibor *et al.* 2003). Uma das vantagens da tipagem do Chr X é que em homens a tipagem do ChrX revela diretamente o haplótipo, visto os homens possuem apenas um ChrX, e este não recombinar com o cromossomo Y. Estas características peculiares de organização dos genes e modo de segregação do cromossomo X explicam o poder de identificação destes marcadores em casos de reconstituição de vínculo genético.

Segundo Szibor et al (2003), os seguintes fatos explicam o poder de identificação do X:

- A tipagem do cromossomo X em homens automaticamente revela seu haplótipo;
- Homens transmitem o cromossomo X para suas filhas. O cromossomo, X paterno pode ser identificado nas filhas;
- Todas as filhas possuem o mesmo haplótipo paterno do cromossomo X;
- Todos os alelos do cromossomo X não compartilhados pelas irmãs são de origem materna;
- A tipagem do cromossomo X de duas ou mais irmãs revela o haplótipo paterno e grande parte do genótipo do X da mãe;
- A tipagem do cromossomo X de dois ou mais irmãos revela grande parte do genótipo do cromossomo X materno;

- É bastante provável que haplótipos formados por grupos de ligação permaneçam estáveis através de gerações, sendo meios poderosos para demonstrar vínculo genético.

Dentre os vários marcadores STRs conhecidos no cromossomo X e utilizados em estudos populacionais e forenses dois haplótipos apresentam características úteis em estudos de parentesco genético (Szibor *et al.* 2007).

Um dos haplótipos é formado pelos marcadores DXS7424 e DXS101 (Edelmann *et al.* 2003) e o outro pelos marcadores DXS10079, DXS10074 e DXS10075 (Hering *et al.* 2005). O haplótipo DXS7424 e DXS101 está situado na posição Xq22 e os marcadores estão localizados a 100.424.961 pb e 101.219.161 pb respectivamente do Xp-telômero (Szibor *et al.* 2007). O haplótipo formado pelos marcadores DXS10079, DXS10074 e DXS10075 está localizado em uma região de 280 kb situado na posição Xq12. (Hering *et al.* 2005).

No entanto, para que se possam efetuar os cálculos estatísticos pertinentes, o que é de fundamental importância nos estudos de identificação humana, são necessárias informações sobre a distribuição populacional dos alelos, se as proporções genotípicas estão de acordo com o esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, se existe subestruturação populacional e se os marcadores estão em equilíbrio de ligação. (Introduction to Forensic CHR X-Research Page, 2007). Estas informações são fundamentais para a validação do uso dos marcadores escolhidos e avaliação de sua eficiência (Edelmann *et al.* 2003).

A análise simultânea de marcadores genéticos localizados no mesmo cromossomo requer conhecimentos sobre desequilíbrio de ligação, sendo esta informação de grande importância para interpretação e análise dos dados (Edelmann *et al.* 2002). Desequilíbrio de ligação entre dois marcadores genéticos indica que os mesmos estão suficientemente próximos para não segregarem independentemente. Os marcadores genéticos situados em um cromossomo, que são herdados em bloco e sem ocorrência de permuta formam um haplótipo.

Um significativo desequilíbrio de ligação foi encontrado para os marcadores do cromossomo X, DXS101 e DXS7424, e DXS10074, DXS10075 e DXS10079 (Figura 05).

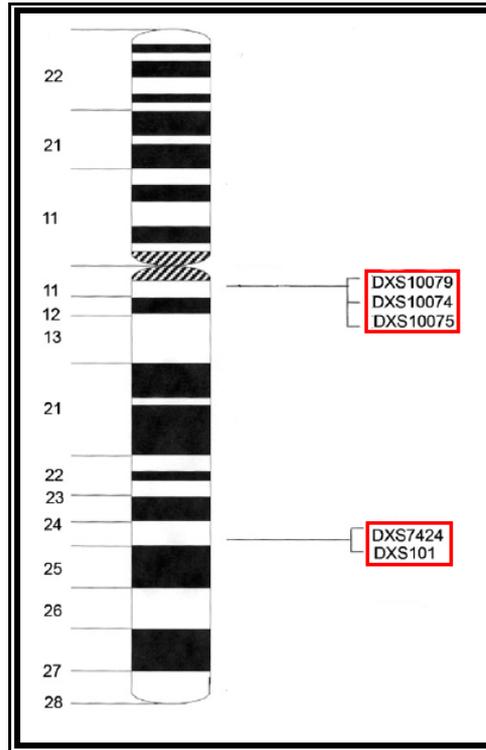


Figura 05. Distribuição dos marcadores do cromossomo X estudados

Nestes casos os parâmetros estatísticos dos marcadores devem ser estudados como uma única unidade segregacional, ou seja, um haplótipo, e não através das frequências individuais dos marcadores (Hering *et al.* 2005). As frequências haplotípicas devem ser estimadas diretamente através do estudo populacional, e estas informações serão utilizadas para efetuar os cálculos dos parâmetros estatísticos. O Laboratório de DNA Forense da UFAL vem desenvolvendo pesquisa com marcadores genéticos STR autossômicos e ligados aos cromossomos sexuais, estando o presente projeto inserido nas linhas de pesquisa do Laboratório.

2. OBJETIVOS

- Desenvolver um multiplex para os marcadores DXS101, DXS7424, DXS10074, DXS10075 e DXS10079, do cromossomo X, marcados com fluorescência;
- Estimar as frequências alélicas e haplotípicas dos marcadores genéticos ligados ao cromossomo X DXS101, DXS7424, DXS10074, DXS10075 e DXS10079 na população de alagoas;
- Estimar os parâmetros de interesse forense: Chance Média de Exclusão (MEC), Poder de Discriminação (PD), Heterozigosidade Esperada (HET) e Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Amostra estudada

A amostra estudada foi composta de 404 indivíduos não aparentados, coletadas em vários municípios do estado de Alagoas (Tabela 01), sendo 203 do sexo masculino e 201 do sexo feminino (figura 06). As amostras foram coletadas pelos técnicos do Laboratório de DNA Forense da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), em Maceió, Alagoas, com o consentimento das pessoas pesquisadas.

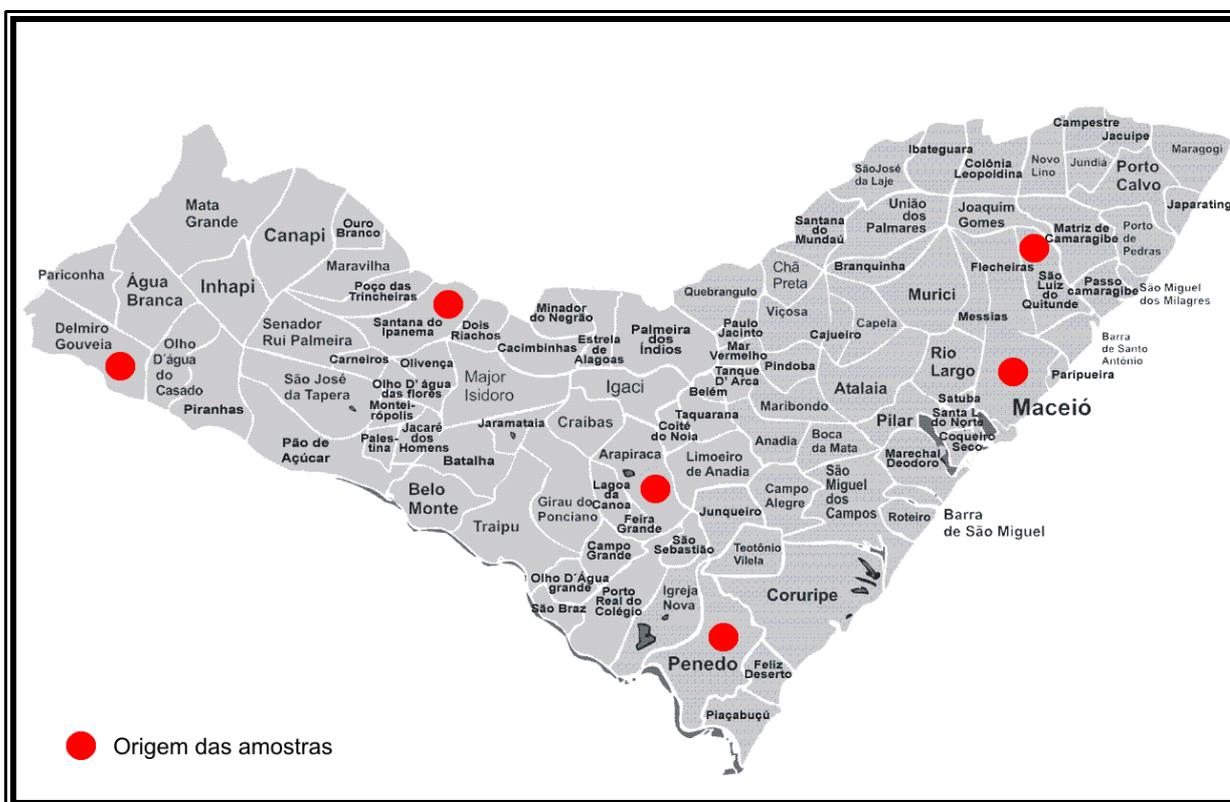


Figura 06 - Mapa do estado de Alagoas indicando os municípios de origem dos 404 indivíduos analisados. Fonte: TRT Alagoas online.

Tabela 01. Número de indivíduos correspondente a cada município analisado.

Origem	Número de indivíduos
Arapiraca	65
Delmiro Gouveia	47
Maceió	140
Penedo	60
Santana do Ipanema	53
São Luiz do Quitunde	39

3.2 - Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada de sangue venoso obtido por punção digital utilizando a resina chelex-100, seguindo o protocolo descrito por Walsh et al. (1991). Adicionou-se ao sangue um (01) ml de água deionizada, deixando-o repousar por trinta (30) minutos a temperatura ambiente. Em seguida a mistura foi centrifugada por dois (02) minutos em velocidade de 11.000 g (Rotações Por Minuto) em microcentrífuga (Mini Spin - Eppendorf). Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se ao *pellet* de leucócitos 100 µl de solução de Chelex-100 a 5% deixando-o incubar em banho-maria por 20 minutos numa temperatura de 56° C, fervendo logo em seguida por oito (08) minutos. Para finalizar, centrifugou-se mais uma vez por dois minutos a 11000 g. O DNA extraído foi estocado a 4° C.

3.3 - Locos analisados

Foram estudados dois haplótipos, compostos pelos marcadores microssatélites DXS101 e DXS7424 (Edelmann e Szibor 2001; Edelmann *et al.* 2002) e DXS10079 DXS10074 e DXS10075 (Hering *et al.* 2005). Foram estudadas as distribuições alélicas e haplotípicas dos microssatélites DXS101, DXS7424, DXS10079 DXS10074 e DXS10075 na população de Alagoas, tendo sido feita sua devida validação para esta população. Os marcadores DXS10079, DXS10075 e DXS10074 são tetraméricos,

enquanto que os marcadores DXS7424 e DXS101 são triméricos. As características dos locos estudados podem ser observadas na Tabela 02.

O marcador DXS10074 apresenta muitos alelos com bloco de repetições (AAGA)_n caracterizado por uma inserção de 12 pb como segue na formula geral: (ACAC)₂ (AGAG) AAAAAG (AAGA)_n (AAGA)₂ AAGGAA (Hering *et al.* 2005).

Tabela 02. Características dos locos estudados.

Loco	Localização cromossômica	Seqüência repetida	Tamanho dos fragmentos (pb)	Cor do fluoróforo
DXS10079	Xq12	(AGAG) ₃ TGAA AGAG (AGAA) _n AGAG (GAA) ₃	271-315	Azul - Fam
DXS10074	Xq12	(ACAC) ₂ (AGAG) AAAAAG (AAGA) _n (AAGA) ₂ AAGGAA	165-227	Verde - Vic
DXS10075	Xq12	TATC (TAGA) _n TGA (TAGA) _n	218-257	Azul - Fam
DXS7424	Xq22	(TTA) _n	147-180	Azul - Fam
DXS101	Xq22	(CCT) _n (ATT) _n	179-233	Amarelo - Ned

3.4 - Amplificação do DNA

Os *primers* (iniciadores) utilizados foram descritos por Edelman *et al.* (2001), Edelman *et al.* (2002) e Hering *et al.* (2005) e estão mostrados na tabela abaixo.

Tabela 03. *Primers* dos marcadores utilizados.

Marcador	Primer
DXS10079	F:5' AGA TTG TGC CAA TGC TCT CC-3' R:5' GTT TGC CTG TGT TGT AAC ATC CTT-3'
DXS10074	F:5' ACT TCC TAC TGC CCC ACC TT-3' R:GTT TCC CCT CAG AGA GCT GAC ACA-3'
DXS10075	F: 5' AGG AGG GCC CTA GAC AAG TG-3' R:5'CAG ATT ATG CTT GGG CCT GT-3'
DXS7424	F:5'-CTG CTT GAC TCC AGG AAT TCA A-3' R: 5'-GAA CAC GCA CAT TTG AGA ACA TA-3'
DXS101	F:5'-ACT CTA AAT CAG TCC AAA TAT CT-3' R: 5-AAA TCA CTC CAT GGC ACA TGT AT-3'

O DNA foi amplificado em reação de PCR usando um volume de 25 μ l. A concentração dos *primers* utilizadas nas reações está apresentada na Tabela 04.

Tabela 04. Reagentes e concentrações dos *primers* nas reações.

Reagentes	Concentração / Volume
TU (1.5mM de MgCl ₂ , 0,2 mM de dNTPs)	05 μ l
Primer DXS10079	7 μ M
Primer DXS10075	7 μ M
Primer DXS10074	5 μ M
Primer DXS7424	7 μ M
Primer DXS101	25 μ M
DNA	03 μ l
Taq polimerase	01 U/ reação
H2O	Para completar a reação de 25 μ l

A amplificação foi feita em termociclador TC-412 (Techne, UK) e os ciclos estão descritos na Tabela 05. Neste protocolo foram incluídos 72 minutos de tempo adicional para que a enzima Taq DNA polimerase realizasse a adenilação completa de todos os produtos de PCR.

Tabela 05. Ciclos de amplificação.

Protocolo de amplificação		
Desnaturação inicial	2 min.	95 °C
30 ciclos		
94 °C	1 min.	Desnaturação
59,5 °C	1 min.	Anelamento
72 °C	1 min.	Extensão
Extensão final	60 min.	60 °C

3.5 - Eletroforese e identificação dos alelos

Alíquotas contendo 1,5 µl do produto de PCR foram misturados com 15µl de formamida e 0,5 de Size Standard (Gene ScanTM – 500 LizTM) e os fragmentos foram separados por eletroforese de capilar em seqüenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer, utilizando polímero POP4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A determinação dos alelos foi feita com o *Software GeneMapper*. A linhagem de células K562 e 9947A foram utilizadas para calibração da marcação dos alelos (Tabela 06). Os alelos foram nomeados de acordo com o número de repetições, conforme determinação da *International Society of Forensic Genetics*.

Tabela 06. Alelos da K562 e 9947A utilizados para calibração.

Linha de células de DNA	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS7424	DXS101
K562 (Promega, Gibco)	17, 17	17, 17	18, 18	17, 17	24, 24
9947A (Applied Biosystems)	20, 23	16, 19	17, 18	14, 16	24, 26

3.6 - Cálculos estatísticos

As frequências alélicas e haplotípicas foram calculadas com o programa Arlequin *ver.* 3.0 e os cálculos referentes aos parâmetros de interesse forense estão mostrados abaixo.

➤ **Probabilidade de Coincidência ao Acaso** – Determina o número de indivíduos que podem ser analisados antes de se achar o mesmo padrão de DNA observado em um indivíduo selecionado ao acaso.

$$P = \sum f_i^2$$

Onde f_i é a frequência haplotípica.

➤ **Poder de Discriminação (PD)** – Capacidade que o loco tem de discriminar entre os indivíduos de acordo com a quantidade de genótipos possíveis. É calculado como:

$$\text{Mulheres: } 1 - 2 \left(\sum_i f_i^2 \right)^2 + \sum_i f_i^4$$

$$\text{Homens: } 1 - \sum_i f_i^2$$

$$PD_{\text{Combinado}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PD_i)$$

Obs.: O Poder de Discriminação combinado é o PD mulheres e o PD homens.

➤ **Chance Média de Exclusão (MEC)** – É a fração de indivíduos que tem um perfil de DNA diferente do perfil de um indivíduo selecionado ao acaso em caso de paternidade típica. A chance média de exclusão para um dado loco foi calculada de acordo com as seguintes equações:

MEC-Krüger:

$$\sum_i f_i^3 (1 - f_i)^2 + \sum_i f_i (1 - f_i)^3 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)^2$$

MEC-Kishida:

$$\sum_i f_i^3 (1 - f_i) + \sum_i f_i (1 - f_i)^2 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)$$

MEC-Desmarais para trios envolvendo filhas

$$1 - \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^4 - \left(\sum_{i < j} f_i^2 \right)^2$$

MEC-Desmarais para duos pai e filha

$$1 - 2 \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^3$$

MEC combinado

$$PE_C = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PE_i)$$

Onde PE (Poder de exclusão) é igual à MEC (Chance Média de Exclusão).

➤ **Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC)** – Indica o grau de polimorfismo de um marcador de DNA. É calculado como:

$$1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2 f_i^2 f_j^2$$

Onde f_i é a frequência do alelo i e f_j é a frequência do alelo j .

➤ **Heterozigosidade Esperada**

$$\hat{H} = \left(1 - \sum_{i=1}^k f_i^2 \right)$$

O teste para determinação de desvio da lei de Hardy Weinberg foi realizado no programa Arlequin ver. 3.0, sendo utilizado um algoritmo análogo ao teste Exato de Fisher desenvolvido por Guo e Thompson (1992).

4. RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas 403 amostras, sendo 200 mulheres e 203 homens. Para a tipagem das amostras foi desenvolvido um multiplex em que os cinco marcadores foram amplificados simultaneamente num único tubo de reação (Fig. 07).

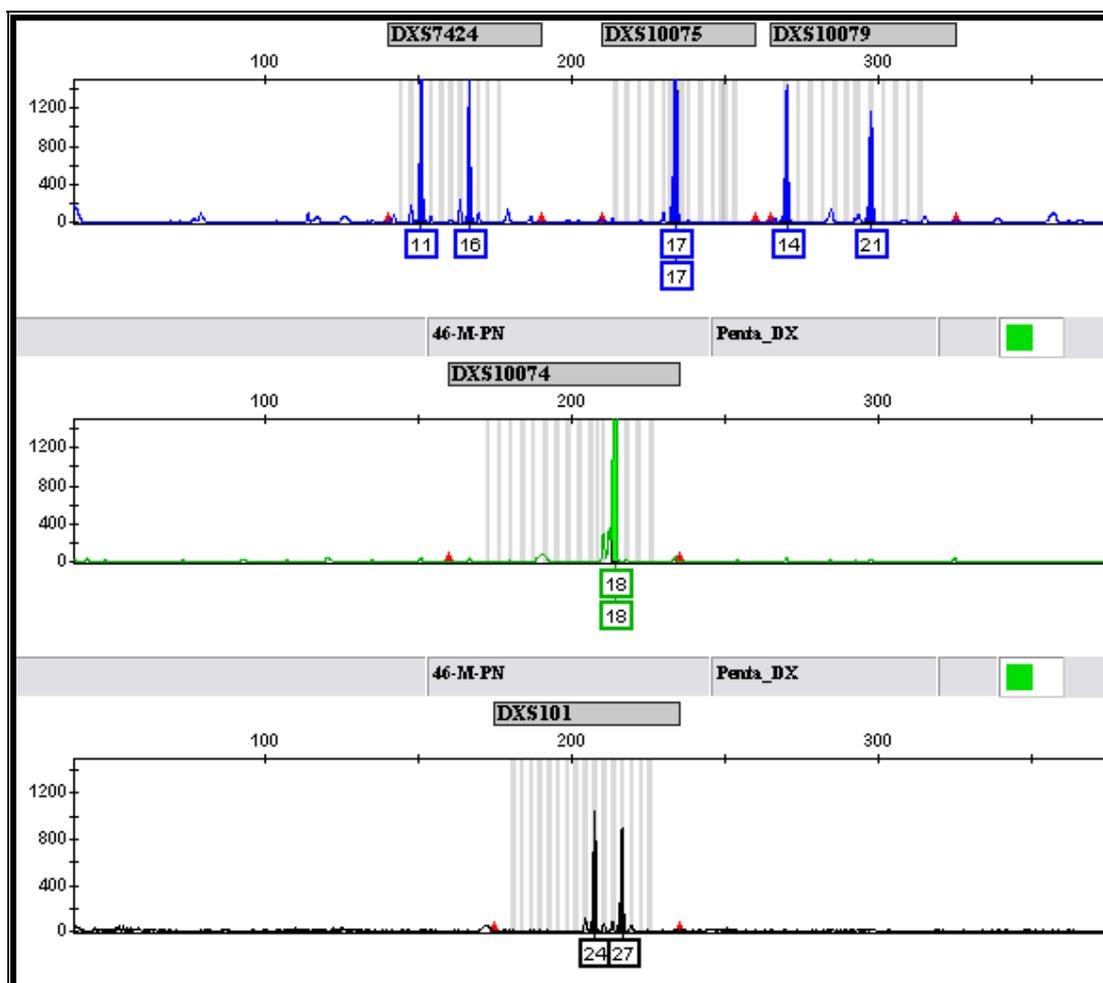


Fig.07. Eletroferograma do DNA amplificado com os cinco marcadores do cromossomo X.

Foi obtida boa resolução utilizando 1 ng de DNA genômico com as condições de amplificação descritas.

Tabela 07. Frequências alélicas combinadas de homens e mulheres

Allele	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS7424	DXS101
6					
7		0,04628			
8		0,08430	0,00165		
9		0,01157			
10	0,00165			0,02149	
11		0,01157		0,03140	
12	0,00165	0,03471	0,00331	0,03967	
13		0,03140	0,04793	0,15041	
14	0,02149	0,06446	0,02314	0,18017	0,00165
15	0,01818	0,15702	0,08099	0,28595	0,01322
16	0,02645	0,15041	0,18512	0,19504	0,00331
16,2		0,00165			
17	0,06612	0,15537	0,35868	0,07769	0,00331
17,2			0,05289		
18	0,11736	0,19339	0,21983	0,00826	0,06116
18,2			0,00331		
19	0,23636	0,05124	0,01818	0,00826	0,04463
20	0,27769	0,00496	0,00496		0,03967
21	0,16860				0,05620
22	0,04793				0,04298
23	0,01653			0,00165	0,06446
24		0,00165			0,17355
25					0,13388
26					0,17686
27					0,09917
28					0,05289
29					0,02314
30					0,00992

O resultado da tipagem das amostras masculinas é mostrado na tabela 08. O total de haplótipos obtidos foi 203. Destes, 198 foram únicos, isto é, ocorreram uma única vez e cinco haplótipos ocorreram duas vezes na população. Os haplótipos únicos têm frequência de 0,00493 e os que ocorrem duas vezes 0,00985.

Tabela 08. Haplótipos masculinos para os cinco marcadores DXS10079, DXS10074, DXS7424, DXS10075 e DXS101.

	Origem	Haplótipos	Freq, Abs,	Freq, Rel,
1	MCZH-01	20, 19, 17, 2, 15, 24	1	0,00493
2	MCZH-06	20, 18, 17, 16, 24	1	0,00493
3	MCZH-07	22, 15, 18, 15, 25	1	0,00493
4	MCZH-12	18, 16, 18,2, 17, 26	1	0,00493
5	MCZH-14	20, 15, 18, 16, 20	1	0,00493
6	MCZH-37	20, 18, 15, 15, 27	1	0,00493
7	MCZH-38	20, 18, 18, 15, 26	1	0,00493
8	MCZH-40	19, 7, 13, 14, 22	1	0,00493
9	MCZH-46	20, 7, 13, 10, 26	1	0,00493
10	MCZH-49	18, 8, 17, 16, 24	1	0,00493
11	MCZH-67	19, 13, 8, 15, 20	1	0,00493
12	MCZH-68	20, 15, 15, 15, 27	1	0,00493
13	MCZH-77	20, 16, 15, 15, 27	1	0,00493
14	MCZH-81	17, 8, 16, 15, 24	1	0,00493
15	MCZH-89	19, 17, 18, 16, 18	1	0,00493
16	MCZH-93	17, 16, 16, 13, 22	1	0,00493
17	MCZH-96	16, 18, 16, 16, 26	1	0,00493
18	MCZH-99	18, 8, 17, 14, 27	1	0,00493
19	MCZH-101	18, 14, 15, 16, 25	1	0,00493
20	MCZH-110	20, 14, 15, 16, 24	1	0,00493
21	MCZH-124	21, 15, 17, 13, 26	1	0,00493
22	MCZH-127	14, 15, 16, 14, 27	1	0,00493
23	MCZH-129	20, 17, 17, 14, 24	1	0,00493
24	MCZH-141	19, 17, 17, 16, 24	1	0,00493
25	MCZH-142	22, 18, 18, 14, 25	1	0,00493
26	MCZH-145	14, 16, 16, 15, 23	1	0,00493
27	MCZH-152	17, 17, 17, 15, 25	1	0,00493
28	MCZH-154	15, 18, 16, 15, 27	1	0,00493
29	MCZH-158	20, 16, 17, 17, 24	1	0,00493
30	MCZH-159	22, 14, 17, 15, 26	1	0,00493
31	MCZH-131	20, 17, 18, 15, 25	1	0,00493
32	MCZH-161	19, 17, 17, 15, 26	1	0,00493

33	MCZH-164	21, 18, 17, 15, 26	1	0,00493
34	MCZH-166	19, 16, 16, 14, 23	1	0,00493
35	MCZH-169	19, 18, 16, 13, 22	1	0,00493
36	MCZH-178	20, 8, 17, 15, 23	1	0,00493
37	MCZH-216	19, 15, 18, 15, 23	1	0,00493
38	MCZH-437	18, 16, 17, 14, 26	1	0,00493
39	MCZH-03	19, 18, 18, 16, 19	1	0,00493
40	MCZH-04	19, 12, 16, 15, 24	1	0,00493
41	MCZ1H-06	19, 16, 17, 16, 25	1	0,00493
42	MCZH-13	16, 13, 16, 16, 26	1	0,00493
43	MCZH-16	21, 20, 17, 13, 19	1	0,00493
44	MCZH-17	20, 7, 13, 16, 26	1	0,00493
45	MCZH-18	21, 18, 18, 13, 25	1	0,00493
46	MCZH-19	22, 17, 17, 16, 25	1	0,00493
47	MCZH-27	23, 14, 17, 14, 20	1	0,00493
48	MCZH-43	20, 13, 16, 16, 19	1	0,00493
49	MCZH-45	20, 8, 13, 15, 23	1	0,00493
50	MCZH-48	16, 18, 17, 17, 25	1	0,00493
51	MCZH-52	22, 16, 18, 16, 24	1	0,00493
52	MCZH-57	20, 17, 17.2, 17, 24	1	0,00493
53	MCZH-59	19, 16, 15, 13, 28	1	0,00493
54	MCZH-61	20, 8, 17, 16, 24	1	0,00493
55	MCZH-62	20, 18, 18.2, 15, 27	1	0,00493
56	MCZH-64	22, 19, 18, 16, 19	1	0,00493
57	MCZ1H-68	21, 17, 17.2, 15, 26	1	0,00493
58	MCZH-70	18, 16, 16, 14, 26	1	0,00493
59	MCZH-74	21, 17, 18, 11, 22	1	0,00493
60	MCZH-88	19, 9, 18, 16, 20	1	0,00493
61	MCZ1H-89	18, 16, 16, 13, 25	1	0,00493
62	MCZH-92	19, 15, 18, 10, 27	1	0,00493
63	MCZH-121	20, 18, 18, 16, 26	2	0,00985
64	ARH-121			
65	MCZH284	21, 17, 17, 14, 26	1	0,00493
66	ARH-04	20, 16, 16, 16, 26	1	0,00493
67	ARH-18	21, 18, 17.2, 15, 24	2	0,00985
68	SIH-40			
69	ARH-27	19, 15, 15, 13, 25	1	0,00493
70	ARH-31	20, 8, 13, 15, 25	1	0,00493
71	ARH-44	19, 17, 18, 14, 24	1	0,00493

72	ARH-55	18, 16, 17, 14, 18	1	0,00493
73	ARH-69	18, 8, 18, 19, 28	1	0,00493
74	ARH-75	20, 15, 16, 14, 25	1	0,00493
75	ARH-78	20, 8, 13, 15, 26	1	0,00493
76	ARH-82	20, 18, 18, 14, 26	1	0,00493
77	ARH-83	20, 16, 17, 15, 25	1	0,00493
78	ARH-85	17, 8, 17, 16, 26	1	0,00493
79	ARH-99	20, 15, 17, 15, 24	2	0,00985
80	SIH-80			
81	ARH-101	17, 15, 15, 12, 25	1	0,00493
82	ARH-102	14, 18, 16, 17, 25	1	0,00493
83	ARH-105	20, 16, 17, 14, 28	1	0,00493
84	ARH-106	21, 9, 13, 16, 27	1	0,00493
85	ARH-107	19, 17, 18, 15, 23	1	0,00493
86	ARH-108	21, 8, 16, 18, 18	1	0,00493
87	ARH-109	19, 16, 16, 16, 19	1	0,00493
88	ARH-110	19, 16, 16, 13, 21	1	0,00493
89	ARH-113	20, 19, 17, 15, 18	1	0,00493
90	ARH-123	17, 8, 16, 17, 24	1	0,00493
91	ARH-125	20, 14, 15, 15, 28	1	0,00493
92	ARH-126	19, 18, 18, 13, 24	1	0,00493
93	ARH-127	20, 7, 13, 17, 24	1	0,00493
94	ARH-135	17, 8, 17, 16, 28	1	0,00493
95	ARH-138	17, 19, 18, 15, 28	1	0,00493
96	PNH-01	19, 8, 17, 15, 26	1	0,00493
97	PNH-03	17, 8, 17, 16, 24	1	0,00493
98	PNH-04	20, 15, 15, 15, 25	1	0,00493
99	PNH-08	19, 15, 17, 15, 26	1	0,00493
100	PNH-15	20, 17, 17, 16, 20	1	0,00493
101	PNH-20	18, 8, 16, 13, 21	1	0,00493
102	PNH-21	19, 16, 18, 15, 19	1	0,00493
103	PNH-23	21, 12, 19, 17, 24	1	0,00493
104	PNH-24	16, 18, 16, 15, 24	1	0,00493
105	PNH-26	20, 16, 18, 15, 18	1	0,00493
106	PNH-31	20, 16, 2, 16, 10, 25	1	0,00493
107	PNH-32	20, 15, 15, 16, 15	1	0,00493
108	PNH-37	19, 16, 17, 13, 26	1	0,00493
109	PNH-44	18, 7, 15, 14, 30	1	0,00493
110	PN-1H-45	22, 13, 17, 15, 18	1	0,00493

111	PN-1H-47	18, 16, 15, 13, 21	1	0,00493
112	PN-1H-37	20, 16, 17, 14, 24	1	0,00493
113	PNH-45	21, 16, 17, 15, 22	1	0,00493
114	PNH-47	20, 15, 17, 14, 24	1	0,00493
115	PNH-53	19, 19, 17, 16, 29	1	0,00493
116	PNH-64	20, 17, 17,2, 18, 25	1	0,00493
117	PNH-66	16, 18, 16, 13, 26	1	0,00493
118	PNH-67	16, 18, 12, 16, 26	1	0,00493
119	PNH-74	20, 17, 16, 14, 30	1	0,00493
120	PNH-76	19, 17, 18, 16, 21	1	0,00493
121	PNH-80	19, 12, 18, 15, 24	1	0,00493
122	PNH-81	21, 15, 16, 15, 24	1	0,00493
123	PNH-82	21, 17, 18, 16, 20	1	0,00493
124	PNH-88	18, 17, 16, 16, 25	1	0,00493
125	PNH-98	20, 15, 17, 17, 25	1	0,00493
126	SLH-02	21, 8, 13, 15, 26	1	0,00493
127	SLH-06	18, 18, 18, 16, 15	1	0,00493
128	SLH-16	21, 12, 17, 13, 19	1	0,00493
129	SLH-19	14, 16, 18, 16, 26	1	0,00493
130	SLH-22	21, 11, 16, 15, 24	1	0,00493
131	SLH-25	20, 18, 17, 14, 24	2	0,00985
132	SIH-93			
133	SLH-26	20, 16, 17, 16, 27	1	0,00493
134	SLH-27	21, 15, 17, 17, 24	1	0,00493
135	SLH-31	20, 17, 16, 14, 27	1	0,00493
136	SLH-33	16, 18, 17,2, 15, 26	1	0,00493
137	SLH-36	20, 15, 17, 14, 23	2	0,00985
138	SLH-91			
139	SLH-38	21, 16, 17, 19, 24	1	0,00493
140	SLH-39	21, 14, 14, 13, 26	1	0,00493
141	SLH-43	21, 17, 18, 15, 26	1	0,00493
142	SLH-44	20, 17, 17, 15, 21	1	0,00493
143	SLH-49	20, 17, 18, 15, 22	1	0,00493
144	SLH-50	19, 14, 17, 16, 25	1	0,00493
145	SLH-53	21, 7, 14, 15, 25	1	0,00493
146	SLH-54	22, 7, 13, 14, 27	1	0,00493
147	SLH-58	16, 16, 16, 16, 27	1	0,00493
148	SLH-64	21, 7, 14, 14, 22	1	0,00493
149	SLH-67	17, 16, 17, 14, 26	1	0,00493

150	SLH-71	21, 16, 18, 17, 18	1	0,00493
151	SLH-72	21, 15, 18, 13, 19	1	0,00493
152	SLH-82	18, 18, 17, 14, 26	1	0,00493
153	SLH-87	21, 16, 17, 17, 18	1	0,00493
154	SLH-97	20, 15, 17, 16, 20	1	0,00493
155	DLH-02	18, 16, 17, 16, 22	1	0,00493
156	DLH-04	21, 15, 16, 15, 18	1	0,00493
157	DLH-05	19, 8, 18, 12, 26	1	0,00493
158	DLH-07	17, 8, 17, 15, 18	1	0,00493
159	DLH-12	20, 15, 17, 16, 25	1	0,00493
160	DLH-18	15, 15, 16, 14, 29	1	0,00493
161	DLH-20	21, 14, 15, 14, 27	1	0,00493
162	DLH-21	22, 19, 16, 15, 26	1	0,00493
163	DLH-23	14, 16, 16, 13, 20	1	0,00493
164	DLH-30	19, 12, 17, 10, 27	1	0,00493
165	DLH-31	20, 16, 15, 17, 19	1	0,00493
166	DLH-33	19, 8, 17, 16, 25	1	0,00493
167	DLH-35	20, 15, 17, 17, 30	1	0,00493
168	DLH-37	20, 18, 17.2, 15, 26	1	0,00493
169	DLH-38	19, 15, 18, 14, 22	1	0,00493
170	DLH-40	18, 18, 16, 13, 26	1	0,00493
171	DLH-41	22, 18, 17.2, 13, 28	1	0,00493
172	DLH-44	20, 16, 17, 15, 26	1	0,00493
173	DLH-45	23, 18, 17, 16, 24	1	0,00493
174	DLH-48	20, 18, 17, 13, 28	1	0,00493
175	DLH-49	21, 18, 17, 15, 28	1	0,00493
176	DLH-70	20, 14, 17, 11, 27	1	0,00493
177	DLH-50	21, 16, 18, 15, 26	1	0,00493
178	DLH-56	20, 17, 15, 16, 26	1	0,00493
179	DLH-69	20, 16, 18, 13, 25	1	0,00493
180	SIH-87	20, 7, 14, 12, 19	1	0,00493
181	SIH-09	19, 19, 17, 14, 27	1	0,00493
182	SIH-10	20, 17, 17, 15, 24	1	0,00493
183	SIH-12	19, 17, 17, 16, 28	1	0,00493
184	SIH-15	19, 15, 16, 15, 18	1	0,00493
185	SIH-19	20, 18, 17, 15, 27	1	0,00493
186	SIH-24	20, 15, 15, 14, 27	1	0,00493
187	SIH-30	21, 16, 17, 15, 21	1	0,00493
188	SIH-31	18, 15, 17, 15, 23	1	0,00493

189	SIH-37	19, 17, 20, 13, 25	1	0,00493
190	SIH-48	15, 18, 16, 17, 18	1	0,00493
191	SIH-49	20, 13, 19, 15, 20	1	0,00493
192	SIH-50	19, 18, 18, 15, 25	1	0,00493
193	SIH-51	18, 14, 16, 14, 18	1	0,00493
194	SIH-57	21, 19, 17, 15, 25	1	0,00493
195	SIH-63	21, 17, 17, 14, 27	1	0,00493
196	SIH-71	21, 12, 17, 13, 25	1	0,00493
197	SIH-76	19, 9, 16, 13, 26	1	0,00493
198	SIH-78	22, 16, 18, 14, 26	1	0,00493
199	SIH-96	20, 15, 17, 14, 28	1	0,00493
200	SIH-101	21, 19, 14, 16, 25	1	0,00493
201	SIH-102	19, 15, 17, 16, 22	1	0,00493
202	SIH-103	14, 16, 16, 16, 24	1	0,00493
203	SIH-106	20, 16, 17, 16, 20	1	0,00493

*Ordem dos marcadores: DXS10079, DXS10074, DXS7424, DXS10075 e DXS101.

A frequência dos haplótipos masculinos foi estudada considerando-se os dois grupos de ligação formados pelos marcadores DXS7424-DXS101 e DXS10079-DXS10074-DXS10075, uma vez que os dois grupos estão separados por uma distância genética de 34 centimorgans (cM).

Tabela 09. Haplótipos masculinos para os marcadores ligados DXS10079-DXS10074-DXS10075 e DXS7424-DXS101.

DXS10079-DXS10074-DXS10075	N	Freq,	DXS7424-DXS101	N	Freq,
20, 15, 17	10	0,0493	15, 26	15	0,0739
20, 16, 17	7	0,0345	15, 24	12	0,0591
20, 18, 17	5	0,0246	16, 26	10	0,0493
20, 18, 18	4	0,0197	16, 24	9	0,0443
20, 15, 15	4	0,0197	15, 25	9	0,0443
19, 17, 18	4	0,0197	14, 27	8	0,0394
20, 17, 17	4	0,0197	16, 25	8	0,0394
17, 8, 17	4	0,0197	14, 26	7	0,0345
21, 16, 17	4	0,0197	16, 20	6	0,0296
20, 7, 13	3	0,0148	15, 27	6	0,0296

16, 18, 16	3	0,0148	13, 26	6	0,0296
19, 17, 17	3	0,0148	14, 24	6	0,0296
14, 16, 16	3	0,0148	15, 23	6	0,0296
19, 16, 16	3	0,0148	17, 24	6	0,0296
19, 15, 18	3	0,0148	13, 25	6	0,0296
18, 16, 17	3	0,0148	15, 18	6	0,0296
19, 18, 18	3	0,0148	16, 19	4	0,0197
20, 8, 13	3	0,0148	14, 22	3	0,0148
21, 17, 18	3	0,0148	14, 23	3	0,0148
18, 8, 17	2	0,00985	13, 19	3	0,0148
20, 16, 15	2	0,00985	17, 25	3	0,0148
17, 8, 16	2	0,00985	13, 28	3	0,0148
20, 14, 15	2	0,00985	16, 27	3	0,0148
21, 15, 17	2	0,00985	13, 21	3	0,0148
15, 18, 16	2	0,00985	15, 28	3	0,0148
20, 17, 18	2	0,00985	17, 18	3	0,0148
21, 18, 17	2	0,00985	15, 20	2	0,00985
20, 8, 17	2	0,00985	13, 22	2	0,00985
19, 16, 17	2	0,00985	14, 25	2	0,00985
22, 16, 18	2	0,00985	10, 27	2	0,00985
20, 17, 17.2	2	0,00985	14, 18	2	0,00985
18, 16, 16	2	0,00985	14, 28	2	0,00985
21, 17, 17	2	0,00985	16, 28	2	0,00985
21, 18, 17.2	2	0,00985	16, 15	2	0,00985
19, 8, 17	2	0,00985	14, 30	2	0,00985
19, 15, 17	2	0,00985	15, 22	2	0,00985
20, 16, 18	2	0,00985	15, 21	2	0,00985
19, 19, 17	2	0,00985	16, 22	2	0,00985
20, 17, 16	2	0,00985	17, 26	1	0,00493
21, 15, 16	2	0,00985	10, 26	1	0,00493
21, 12, 17	2	0,00985	16, 18	1	0,00493
21, 7, 14	2	0,00985	14, 20	1	0,00493
21, 16, 18	2	0,00985	11, 22	1	0,00493
20, 19, 17.2	1	0,00493	19, 28	1	0,00493
22, 15, 18	1	0,00493	12, 25	1	0,00493
18, 16, 18.2	1	0,00493	18, 18	1	0,00493
20, 15, 18	1	0,00493	13, 24	1	0,00493
20, 18, 15	1	0,00493	15, 19	1	0,00493
19, 7, 13	1	0,00493	10, 25	1	0,00493

19, 13, 8	1	0,00493	16, 29	1	0,00493
17, 16, 16	1	0,00493	18, 25	1	0,00493
18, 14, 15	1	0,00493	16, 21	1	0,00493
14, 15, 16	1	0,00493	19, 24	1	0,00493
22, 18, 18	1	0,00493	12, 26	1	0,00493
17, 17, 17	1	0,00493	14, 29	1	0,00493
22, 14, 17	1	0,00493	13, 20	1	0,00493
19, 18, 16	1	0,00493	17, 19	1	0,00493
19, 12, 16	1	0,00493	17, 30	1	0,00493
16, 13, 16	1	0,00493	11, 27	1	0,00493
21, 20, 17	1	0,00493	12, 19	1	0,00493
21, 18, 18	1	0,00493			
22, 17, 17	1	0,00493			
23, 14, 17	1	0,00493			
20, 13, 16	1	0,00493			
16, 18, 17	1	0,00493			
19, 16, 15	1	0,00493			
20, 18, 18,2	1	0,00493			
22, 19, 18	1	0,00493			
21, 17, 17,2	1	0,00493			
19, 9, 18	1	0,00493			
20, 16, 16	1	0,00493			
19, 15, 15	1	0,00493			
18, 8, 18	1	0,00493			
20, 15, 16	1	0,00493			
17, 15, 15	1	0,00493			
14, 18, 16	1	0,00493			
21, 9, 13	1	0,00493			
21, 8, 16	1	0,00493			
20, 19, 17	1	0,00493			
17, 19, 18	1	0,00493			
18, 8, 16	1	0,00493			
19, 16, 18	1	0,00493			
21, 12, 19	1	0,00493			
20, 16.2, 16	1	0,00493			
18, 7, 15	1	0,00493			
22, 13, 17	1	0,00493			
18, 16, 15	1	0,00493			
16, 18, 12	1	0,00493			

19, 12, 18	1	0,00493			
18, 17, 16	1	0,00493			
21, 8, 13	1	0,00493			
18, 18, 18	1	0,00493			
14, 16, 18	1	0,00493			
21, 11, 16	1	0,00493			
16, 18, 17,2	1	0,00493			
21, 14, 14	1	0,00493			
19, 14, 17	1	0,00493			
22, 7, 13	1	0,00493			
16, 16, 16	1	0,00493			
17, 16, 17	1	0,00493			
21, 15, 18	1	0,00493			
18, 18, 17	1	0,00493			
19, 8, 18	1	0,00493			
15, 15, 16	1	0,00493			
21, 14, 15	1	0,00493			
22, 19, 16	1	0,00493			
19, 12, 17	1	0,00493			
20, 18, 17.2	1	0,00493			
18, 18, 16	1	0,00493			
22, 18, 17,2	1	0,00493			
23, 18, 17	1	0,00493			
20, 14, 17	1	0,00493			
20, 17, 15	1	0,00493			
20, 7, 14	1	0,00493			
19, 15, 16	1	0,00493			
18, 15, 17	1	0,00493			
19, 17, 20	1	0,00493			
20, 13, 19	1	0,00493			
18, 14, 16	1	0,00493			
21, 19, 17	1	0,00493			
19, 9, 16	1	0,00493			

Do total de 203 haplótipos 122 ocorreu uma única vez para os loci DXS10079, DXS10074 e DXS10075. Destes 203 haplótipos, 81 ocorreram mais de uma vez. Para os loci DXS7424 e DXS101, 60 haplótipos ocorreram uma única vez e 143 haplótipos se repetiram.

Frequências alélicas dos loci DXS10079, DXS10075, DXS10074, DXS7424 e DXS101.

A distribuição das frequências alélicas combinadas de homens e mulheres observadas para os STRs do cromossomo X na população de Alagoas é mostrada na tabela 07. No loco DXS10079 foram observados 12 alelos. Os alelos menos frequentes foram os alelos 10 e 12 apresentando frequência de 0,165% e o mais frequente foi o alelo 17 com frequência de 6,612%. O loco DXS10074 apresentou 15 alelos, sendo que os alelos 16,2 e 24 apresentaram a frequência mais baixa, de 0,165%, enquanto o alelo 18 mostrou frequência mais alta, de 19,339%. O loco DXS10075 apresentou 12 alelos, sendo que o alelo de menor frequência foi o alelo 8 com 0,165% e o mais frequente foi o alelo 17 com 35,868% . O loco DXS7424 apresentou 11 alelos sendo que o alelo que apresentou menor frequência foi o alelo 23 com 0,165% e o alelo com maior frequência foi o alelo 15 com frequência de 28,595%. O loco DXS101 apresentou 17 alelos, sendo o alelo 26 com a maior frequência de 17,686% e o de menor frequência o alelo 14 com 0,165%.

Tabela 10. Frequências alélicas do loco DXS10079 na população masculina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS10079	Frequência
10	00
11	0,0
12	0,0
13	0,0
14	0,0296
15	0,0148
16	0,0394
17	0,0542
18	0,0936
19	0,1921
20	0,3350
21	0,1773
22	0,0542
23	0,0099

Tabela 11. Frequências alélicas do loco DXS10075 na população masculina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS10075	Frequência
8	0,0049
9	0,0
10	0,0
11	0,0
12	0,0049
13	0,0493
14	0,0246
15	0,0837
16	0,1970
17	0,3744
172	0,0443
18	0,1921
182	0,0099
19	0,0099
20	0,0049

Tabela 12. Freqüências alélicas do loco DXS10074 na população masculina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS10074	Freqüência
7	0,0443
8	0,0985
9	0,0148
10	0,0
11	0,0049
12	0,0296
13	0,0246
14	0,0493
15	0,1626
16	0,2020
16.2	0,0049
17	0,1379
18	0,1773
19	0,0443
20	0,0049
21	0,0
22	0,0
23	0,0
24	0,0

Tabela13. Frequências alélicas do loco DXS7424 na população masculina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS7424	Frequência
10	0,0197
11	0,0099
12	0,0148
13	0,1232
14	0,1823
15	0,3153
16	0,2414
17	0,0739
18	0,0099
19	0,0099
20	0,0
21	0,0
22	0,0
23	0,0

Tabela 14. Freqüências alélicas do loco DXS101 na população masculina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS101	Freqüências
14	0,0
15	0,0099
16	0,0
17	0,0
18	0,0640
19	0,0493
20	0,0493
21	0,0296
22	0,0493
23	0,0443
24	0,1724
25	0,1527
26	0,2020
27	0,0985
28	0,0542
29	0,0099
30	0,0148

Parâmetros estatísticos para estudos forenses

Os parâmetros estatísticos de interesse para aplicações em testes forenses para os loci DXS10079, DXS10075, DXS10074, DXS7424 e DXS101 analisados em Alagoas são mostrados na tabela 15.

Tabela 15. Parâmetros forenses

Parâmetros	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS7424	DXS101
Ho	0,77612	0,88060	0,73632	0,81592	0,90050
He	0,82083	0,87603	0,77928	0,82858	0,89706
HWE	0,21072	0,08853	0,07283	0,59035	0,11940
PIC	0,7953	0,8612	0,7470	0,8045	0,8858

Nesta tabela são apresentados os valores esperados para a heterozigosidade, bem como os valores de P para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores de P maiores ou iguais a 0,05 indicam equilíbrio.

Tabela16. Freqüências alélicas do loco DXS10079 na população feminina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS10079	Freqüência
10	0,002488
11	0,0
12	0,002488
13	0,0
14	0,017413
15	0,019900
16	0,019900
17	0,072139
18	0,129353
19	0,258706
20	0,248756
21	0,164179
22	0,044776
23	0,019900

Tabela17. Frequências alélicas do loco DXS10075 na população feminina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS10075	Frequência
8	0,0
9	0,0
10	0,0
11	0,0
12	0,002488
13	0,047264
14	0,022388
15	0,079602
16	0,179104
17	0,350746
172	0,057214
18	0,233831
182	0,0
19	0,022388
20	0,004975

Tabela18. Frequências alélicas do loco DXS10074 na população feminina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS10074	Frequência
7	0,047264
8	0,077114
9	0,009950
10	0,0
11	0,014925
12	0,037313
13	0,034826
14	0,072139
15	0,154229
16	0,124378
16,2	0,0
17	0,164179
18	0,201493
19	0,054726
20	0,004975
21	0,0
22	0,0
23	0,0
24	0,002488

Tabela 19. Frequências alélicas do loco DXS7424 na população feminina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS7424	Frequência
10	0,022388
11	0,042289
12	0,052239
13	0,164179
14	0,179104
15	0,271144
16	0,171642
17	0,079602
18	0,007463
19	0,007463
20	0,0
21	0,0
22	0,0
23	0,002488

Tabela 20. Frequências alélicas do loco DXS101 na população feminina do Estado de Alagoas.

Alelos DXS101	Frequências
14	0,002488
15	0,014925
16	0,004975
17	0,004975
18	0,059701
19	0,042289
20	0,034826
21	0,069652
22	0,039801
23	0,074627
24	0,174129
25	0,124378
26	0,164179
27	0,099502
28	0,052239
29	0,029851
30	0,007463

Tabela 21. Parâmetros estatísticos para o marcador DXS10079

DXS10079	
MEC-Desmarais Chance Média de Exclusão segundo Desmarais Para casos de trios no cromossomo	0,7928
MEC - Desmarais duo Chance Média de Exclusão segundo Desmarais Para casos de duplas no cromossomo (Pais e filhas)	0,6742
PIC-Botstein Conteúdo de Informação Polimórfica segundo Botstein	0,7953
HET Heterozidade Esperada	0,8208
PD-Mulheres Poder de Discriminação para Mulheres	0,9427
PD - Homens Poder de Discriminação para Homens	0,8164

Tabela 22. Parâmetros estatísticos para o marcador DXS10075.

DXS10075	
Mec-Desmarais Chance Média de Exclusão segundo Demarais Para casos de trio no cromossomo	0,7462
MEC-Desmarais Duo Chance Média de Exclusão segundo Demarais (Pais e filhas) Para casos de duplas no cromossomo	0,6163
PIC-Botstein Conteúdo de informação Polimórfica segundo Botstein	0,7470
HET- Heterozigosidade Esperada	0,7793
PD Mulheres Poder de Discriminação para Mulheres	0,9199
PD-Homens Poder de Discriminação para Homens	0,7762

Tabela 23. Parâmetros estatísticos para o marcador DXS10074.

DXS10074	
MEC - Desmarais Chance Média de Exclusão segundo Desmarais Para casos de trios em cromossomo	0,8596
MEC – Demarais- Duo Chance Média de Exclusão segundo Desmarais Para casos de duplas no cromossomo (Pais e filhas)	0,7648
PIC-Botstein Conteúdo de Informação Polimórfica Segundo Botstein	0,8612
HET Heterozigosidade Esperada	0,8760
PD - Mulheres Poder de Discriminação para Mulheres	0,9708
PD-Homens Poder de Discriminação para Homens	0,8727

Tabela 24. Parâmetros estatísticos para o marcador DXS7424.

DXS 7424	
MEC - Desmarais Chance Média de Exclusão segundo Desmarais Para casos de trios em cromossomo	0,7918
MEC – Desmarais duo. Chance Média de Exclusão segundo Desmarais Para casos de duplas em cromossomo (Pais e filhas)	0,6724
PIC-Botstein Conteúdo de Informação Polimórfica segundo Botstein	0,8045
Het Heterozigosidade Esperada	0,8286
PD-Mulheres Poder de Discriminação para Mulheres	0,9420
PD-Homens Poder de Discriminação para Homens	0,8159

Tabela 25. Parâmetros estatísticos para o marcador DXS101.

DXS101	
MEC - Desmarais Chance Média de Exclusão segundo Desmarais Para casos de trios em cromossomo	0,8812
MEC - Desmarais –Duo Chance Média se Exclusão segundo Desmarais Para casos de dupla em cromossomo (Pais e filhas)	0,7967
PIC - Botstein Contudo de Informação Polimórfica segundo Botstein	0,8858
HET Heterozigosidade Esperada \pm Desvio Padrão	0,8971
PD – Mulheres Poder de Discriminação para Mulheres	0,9785
PD – Homens Poder de Discriminação para Homens	0,8907

Tabela 26. Probabilidade de coincidência combinada em homens e mulheres

PDc Mulheres	PDc Homens
0,9999998	0,9998947

Tabela 27. Chance Média de Exclusão Combinada

MECc Desmarais trio	MECc Desmarais dupla
0,999817	0,998042

5. DISCUSSÃO

Diferentemente dos marcadores STRs autossômicos e ligados ao cromossomo Y, que foram utilizados logo no início dos estudos de tipagem genética com marcadores microssatélites, os marcadores do cromossomo X receberam atenção só mais recentemente. Comparados com os marcadores autossômicos e do cromossomo Y, poucos marcadores X foram estudados e devidamente avaliados para estudos forenses (Szibor *et al.* 2007).

No estudo de amostras forenses utilizando STRs é desejável a amplificação do maior número possível de marcadores em uma única reação (multiplex), já que muitas vezes a quantidade de DNA obtida da amostra é reduzida (Butler, 2005).

Os resultados obtidos com o pentaplex, amplificação de cinco marcadores STRs em uma única reação, desenvolvido por nós para tipagem de indivíduos de uma amostra da população de Alagoas mostram que o mesmo é seguro e robusto. A reação foi otimizada para amplificação de DNA entre 1 ng – 2ng. O marcador DXS101 é o mais problemático, uma vez que é formado por repetições de três nucleotídeos, o que produz a amplificação de fragmentos não específicos. Foi demonstrado que a adição de aditivos à reação de PCR, principalmente BSA (bovine serum albumin) melhora o desempenho da reação, evitando principalmente a inibição (Loreille *et al.* 2007). A adição de BSA na reação de amplificação do pentaplex na concentração final de 400 µg/ml melhorou o desempenho da reação (fig.7). Utilizando o pentaplex desenvolvido por nós foi possível fazer a tipagem de todos os indivíduos da amostra estudada de forma segura e inequívoca.

Os marcadores estudados constituem dois haplótipos separados por uma distância genética de 34 cM, podendo assim ocorrer recombinação entre os mesmos. Para o cálculo da frequência do haplótipo formado pelos cinco marcadores não se pode utilizar a regra do produto, na qual o resultado é obtido pela multiplicação das frequências individuais dos marcadores na população em estudo, uma vez que a premissa do uso da regra do produto é a segregação independente dos marcadores.

Para a utilização de marcadores genéticos ligados em estudos de vínculo genético é necessário o conhecimento da frequência dos haplótipos específicos que formam blocos únicos e nos quais não ocorram recombinação, ou esta seja improvável (Krawczak *et al.* 2007).

Na amostra de homens da população de Alagoas os haplótipos formados pelos marcadores DXS101, DXS7424, DXS10074, DXS10075 e DXS10079 mostraram grande variação. Como 198 haplótipos ocorreram uma única vez, com frequência de 0,0049, estes marcadores são ferramentas importantes nos estudos de vínculo genético nos casos em que o cromossomo X pode ser informativo.

Nos casos em que não é possível excluir a possibilidade de recombinação entre os dois haplótipos é indispensável o conhecimento das frequências haplotípicas individuais. Em relação aos marcadores utilizados em nosso estudo, é indispensável o conhecimento das frequências dos haplótipos formados pelos marcadores DXS101, DXS7424 e DXS10074, DXS10075 e DXS10079, uma vez que os marcadores nos dois grupos apresentam forte desequilíbrio de ligação (Edelmann *et al.* 2003, Hering *et al.* 2005).

Edelmann *et al.* (2002) estudando o haplótipo DXS101- DXS7424 em uma amostra da população Alemã composta de 394 homens encontrou forte desequilíbrio de ligação entre os dois marcadores e uma grande variabilidade do haplótipo na população. Na população de Alagoas o haplótipo DXS101- DXS7424 é altamente variável. A ocorrência de 60 haplótipos torna este marcador muito útil nos estudos de vínculo genético, nos quais os cromossomos são informativos. Em um estudo da frequência dos haplótipos DXS101- DXS7424 realizado com amostra composta de 390 homens da Alemanha o haplótipo mais frequente foi 15-26, com frequência de 0,095 e 67 diferentes haplótipos, sendo que 20 ocorreram uma única vez (Edelmann *et al.* 2003). Na amostra de Alagoas foram encontrados 60 haplótipos diferentes, sendo que 22 ocorreram uma única vez. Da mesma forma que na população Alemã, o haplótipo mais frequente na população de Alagoas foi o 15-26, com frequência de 0,074. A comparação dos dados obtidos por nós com os dados publicados para a população Alemã confirma a grande variabilidade deste haplótipo. Deve ser destacado que apesar das duas populações, da Alemanha e de Alagoas, possuírem frequências muito próximas para o haplótipo mais frequente, o mesmo não ocorre com haplótipos raros. Vários haplótipos que ocorrem somente uma vez em Alagoas não são encontrados na população Alemã e vice-versa (dados não mostrados). Este fato realça a importância de estudos da frequência destes haplótipos nas diferentes populações para que os mesmos possam ser utilizados com segurança em cálculos estatísticos para determinação de vínculo genético.

Qualidade desejável nos marcadores microssatélites é que tenham grande poder discriminatório, o que depende do número de alelos e a frequência dos mesmos na população. Para o marcador DXS7424 foram encontrados 10 alelos, sendo que o mais freqüente, alelo 15, ocorre com freqüência de 0,2859.

Os dados obtidos por nós são muito semelhantes àqueles obtidos por Edelman (2003) para o mesmo marcador, em que encontrou freqüência do alelo 15 de 0,311 em uma amostra da população Alemã.

Alguns parâmetros estatísticos confirmam que os dois marcadores são muito informativos em estudos de tipagem genética. Os valores encontrados para a heterozigosidade esperada e o poder de discriminação para homens de Alagoas foi semelhante àquela encontrada por Edelman (2003) e Edelman e Szibor (2001) para os marcadores DXS101- DXS7424. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos para grande número de marcadores autossômicos e ligados ao sexo, estudados em diferentes populações, e mostraram que existe variação na distribuição dos alelos com a variação total do marcador sendo semelhante.

O haplótipo composto pelos marcadores DXS10074, DXS10075 e DXS10079 também apresentou grande diversidade na população estudada. Do total de 203 haplótipos estudados, 120 ocorreu uma única vez. O haplótipo mais freqüente ocorreu com freqüência de 0,05, enquanto que a freqüência encontrada por Hering *et al.* (2005) foram de 0,02 para os marcadores deste grupo de ligação. Na população de Alagoas 88,66% dos haplótipos tem freqüência abaixo de 2%. Na amostra da população da Alemanha 74% dos haplótipos tem freqüência abaixo de 2%. Esta discrepância entre as duas populações pode ser explicada pelo tamanho da amostra. Enquanto a amostra de Alagoas está composta de 203 homens a da Alemanha é de 693 homens. A medida que aumenta o tamanho da amostra mais provável é encontrar um haplótipo já tipado.

As freqüências alélicas encontradas para os marcadores mais comuns do haplótipo na população de Alagoas também são muito semelhantes àquelas encontradas na população Alemã. O alelo 20 do marcador DXS10079 ocorre com freqüência de 0,28 na população de Alagoas e 0,29 na população Alemã. No entanto no marcador DXS10074 o alelo mais freqüente na população de Alagoas é o 18, sendo o mais freqüente na população Alemã o alelo 17.

As diferenças e semelhanças nas freqüências alélicas que ocorrem em diferentes populações é decorrente do efeito da oscilação genética nas populações. Os marcadores genéticos microssatélites são neutros do ponto de vista evolutivo, não sendo atribuído

aos mesmos nenhum valor adaptativo, portanto não sofrem o efeito da seleção natural. A frequência dos alelos em uma dada população vai depender de fatores históricos e da oscilação genética.

Os dados obtidos por nós no presente trabalho corroboram a utilidade dos haplótipos DXS101, DXS7424 e DXS10074, DXS10075 e DXS10079 nos estudos de vínculo genético em que o cromossomo X é informativo.

A grande variabilidade dos dois haplótipos na população de Alagoas permite sua utilização nos casos complexos de reconstituição de vínculo genético, complementando a informação obtida com marcadores autossômicos e ligada ao Y.

Como os dois haplótipos DXS101-DXS7424 e DXS10079- DXS10075 - DXS10074 estão situados no mesmo cromossomo a uma distância de 34 cM, pode ocorrer recombinação entre os mesmos. Este fato impede que se usem as frequências combinadas dos haplótipos para cálculos estatísticos.

Estudos futuros para determinar a frequência de recombinação entre os dois haplótipos permitirão a utilização dos mesmos nos casos de reconstituição de vínculo genético, aumentando consideravelmente a força destes marcadores.

6. CONCLUSÃO

- O pentaplex, desenvolvido por nós para tipagem genética, mostrou-se seguro, robusto e de fácil amplificação.
- Os cinco marcadores estudados (DXS101, DXS7424 e DXS10079, DXS10075 e DXS10074) são altamente polimórficos, sendo uma poderosa ferramenta para resolver casos forenses e de paternidade deficientes, onde o suposto pai não pode ser identificado, em análises de suposto pai e filha e em trios completos de mãe, criança e suposto pai.
- Os parâmetros forenses demonstraram que o STR DXS101 é o marcador mais informativo seguido pelos marcadores DXS10074, DXS10079, DXS7424 e DXS10075.
- O haplótipo composto pelos marcadores DXS10079, DXS10074 e DXS10075 apresentou diversidade genética maior que o haplótipo DXS101 e DXS7424.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A quick guide to Sequenced Genomes. Disponível em

<http://www.genomenewsnetwork.org/r.shtml>. Acesso em: 29 Novembro 2007.

Aler M, Diz SP, Gomes I, Gisbert M, Carracedo A, Aler A, Gusmão L. Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample; 173:193-196

Azevedo DA. Determinação do Polimorfismo de 15 Microssatélites na população de Alagoas. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado em Genética) Universidade de Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

Bini C, Cecardi S, Ferri G, Pelitti S, Alú ER, Beduschi G, Caenazzo L, Pozano E, Tasianato P, Turchi C, Buscemi L, Mazzanti M, Tagliabracci A, Toni C Spinetti I, Domenici R, Presciuttini S. Development of a heptaplex PCR system to analyses X – chromosome STR loci from five Italian population samples A collaborative study. Forensic Sci Int 2005; 153:231-236.

Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 1980; 32:314–331.

Butler JM. Forensic DNA Typing: biology, Technology and Genetics of STR Markers: Elsevier Academic Press, second ed., 2005.

Butler JM. Forensic DNA Typing and Technology and behind STR Markers. New York: Academic Press, 2001.

Chiara T, Presciuttini, Spinetti I, Domenici R. Population data of four X-chromosome markers in Tuscany, and their use in a deficiency paternity case. Forensic Sci Int 2003; 137:215-216.

Coleman, WB and Tsongalis J. 2005. Molecular Diagnostics: for the clinical laboratorian. Humana Press, New Jersey, USA.

Collins FS, Green ED, Guttmacher AE and Guyer MS. 2003. A vision for the future of genomics research. *Nature*, 422:1-13.

Davies K. 2000. *Decifrando o genoma*. Companhia das Letras. São Paulo.

Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L. Development of a Highly Polymorphic STR marker for Identity Testing Purpouses at the Human Androgen Receptor Gene(Humara). *J Forensic Sci* 1988; 43:1046-1049

Discovering DNA fingerprint. Disponível em http://genome.welcome.ac.uk/doc_wtd020877.html. Acessado em 26/10/2007.

Donnelly A, Kozman H, Gedeon AK, Webb S, Lynch GR, Sutherland GR ,Richards RI, Mulley JC. A Linkage Map of Microsatellite Markers on the Human X Chromosome. *Genomic* 1994; 20:363-370.

Edelmann J, Deichsel J, Hering S, Plate I, Szibor R. Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS6800, DXS7133, Gata172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Sci Int* 2002; 129:99-103.

Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R. Validation of the chromosomal STR DXS7424 which is closely linked to DXS 101. *Internacional congress Series* 2003; 1239:93-98.

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

Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R. Validation of the chromosomal STR DXS7424 which is closely linked to DXS 101. *International congress Series* 2003; 1239:93-98.

Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Szibor R. Validation of STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. *Forensic Sci Int* 2002; 125:217-232.

Edelmann J, Hering S, Michel M, Lessig R, Deichsel D, Sundhausen GM, Roewer L, Plate I, Szibor R. 16X-chromosome STR loci frequency data from a German population.. *Forensic Sci Int* 2001; 124:215-218.

Futuyma, DJ. 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA.

Goldstein DB and Schlotterer C. 1999. *Microsatélites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York.

Griffiths AJF *et al.* 2002. *Introdução à Genética*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Guo SW, Thompson EA. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles, *Biometrics* 1992; 48:359.

Hering S, Augustin C, Edelmann J, Heidel M, Dressier J, Rodig H, Kuhlisch E, Szibor R. DXS1009, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of xq 12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. *Int J Legal Med* 2005; 120:337-345.

Hering S, Rodig H, Augustin C, Edelmann J, Heidel M, Dressier J, Szibor R. DXS10079, DXS10074 and DXS10075: new allele and SNP occurrence. *EXCLI Journal* 2007; 6:177-182.

Human Genome Project information.

Disponível em <http://www.oml.gov/hgmis/>. Acesso em: 18 Setembro 2007.

Hummel S. *Ancient DNA Typing: Methods, Strategies and Applications*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2003.

Inman K, Rudin N. *An Introduction to Forensic DNA Analysis*. Florida: CRC Press, 1997.

Introduction to Forensic. CHRX-Research Page

Disponível em <http://www.CHRX-STR.org>. Acesso em Outubro de 2007.

Jobling MA and Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews/Genetics* 2004; 5:739-751.

Jeffreys AJ, Wilson V and Thein SL. Hypervariable “minissatélites” regions in human DNA. *Nature* 1985; 314:67-73.

Kobilinsk *et al.* DNA: Forensic and Legal Applications. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

Krawczak M. Kinship testing with X-chromosomal markers: Mathematical and statistical issues. *Forensic Sci Int* 2007; 111-114.

Krüger J, Fuhrmann W, Lichte KH, Steffens C. Zur Verwendung der sauren Erythrocytenphosphatase bei der Vaterschaftsbegutachtung. *Dtsch Z Gerichtl Med* 1968; 64:127–146.

Lorreile OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD and Parson TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int* 2007; 1:191-195.

Poetsch M, Petersmann H, Repenning A, Lignitz E. Development of two pentaplex system with X- chromosomal STR loci and their allele frequencies in northeast German population. *Forensic Sci Int* 2005; 155:71-76.

Ruiz Linares, A. 1999. Microsatélites and the reconstruction of the history of human populations. In “Goldstein”, pg. 183-197.

Sheindlin, JG. 1996. Genetic Fingerprinting: The Law and Science of DNA Genetic. Rutledge Books, Inc.

SNP Fact Sheet

Disponível em http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/fap/snps.shtml
Acesso em: 20 Novembro 2007.

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.

Szibor R. X-chromosomal markers: Past, present and future. *Forensic Sci Int* 2007; 1:93-99.

Szibor R, Plate I, Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E, Michel M, Krause D. Chromosome X haplotyng in deficiency paternity testing principles and case report. *International Congress Series* 2003; 1239:815-820.

Szibor R, Hering S, Edelmann J. A new web site compiling forensic chromosome X research is now online. *Int J Legal Med* 2005; DOI10.1007/s00414-005-0029.

Toni C, Presciuttini S, Spinetti I, Domenici R. Population data of four X-chromosome markers in Tuscany, and their use in a deficiency paternity case. *Forensic Sci Int* 2003; 137:215-216.

TRT / AL – Tribunal Regional Eleitoral da 19ª região - Alagoas.

Disponível em: http://www.trt19.gov.br/mapa_jurisdiacao/mapa_de_jurisdiacao_al.html

Acesso em: 20 Novembro 2007.

Zarrabeitia MT, Amigo T, Sañudo C, Zarrabeitia A, Lamño GD, 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.

Understanding the World of Forensics. Disponível em

http://media.wiley.com/product_data/excerpt/04/07645558/0764555804.pdf

Acesso em: 20 Novembro 2007.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing of forensic material. *Biotechniques* 1991; 10:506-518.

Watson JD. 2004. DNA: The secret of life. Alfred Knopf, New York.

Watson JD, Baker TA, Bell ST, Gann A, Levine M, Losick R. 2006. *Biologia Molecular do Gene*. Artmed, Porto Alegre, RS.

8. ANEXOS

Artigo a ser publicado na revista FSI – *Forensic Science International*.

DEVELOPMENT OF A X-CHROMOSOME PENTAPLEX SYSTEM WITH TWO LINKED GROUPS AND THEIR POLYMORPHISM IN THE POPULATION OF ALAGOAS, BRAZIL

I.H.E. Ferreira da Silva^a, A.B.G. Barbosa^a, D.A. Azevedo^a, L.A. Ferreira da Silva^{a,*}

^a*Laboratório de DNA Forense, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Rua Aristeu de Andrade, 452 -
Farol - 57021-090 - Maceió-AL, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +55 82 3336 6558.

E-mail address: laferreirasilva@uol.com.br (L.A. Ferreira da Silva).

Abstract

Genetic population data for five ChrX STRs (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS7424 and DXS101) were obtained from population of Alagoas. No deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium were observed. The combined powers of discrimination in males and females were 0,9998947 and 0,9999998, respectively. These high values show the potential of this system in human identification and paternity testing.

Keywords: Short tandem repeat; X chromosome; Brazil; Forensic genetics; Population genetics

1. Introduction

X-chromosomal short tandem repeats (ChrX STRs) have been established for forensic use, representing an efficient complement for the analysis of other genetic markers, especially in complex cases of kinship testing and in paternity testing, when the disputed child is a girl. One of the advantages of ChrX typing is that in men, it reveals the haplotype directly. In this paper, we have investigated five ChrX STRs loci (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS7424 and DXS101) in the population of Alagoas, Brazil and analyzed their allele frequencies for forensic purposes.

2. Materials and methods

Blood samples from 203 unrelated men and 201 women were collected from digital puncture (30 μ l) and genomic DNA was extracted using Chelex procedure [1]. PCR amplification was performed in a multiplex system for DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS7424 and DXS101. Amplification was carried out in 25 μ l of PCR reaction volume containing 1-2 ng of DNA, 1 X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 1.0 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen).

The primers DXS10079, DXS10074 and DXS10075 [2] and DXS7424 [3] and DXS101 [4] were labeled with 6-FAM, VIC, 6-FAM, 6-FAM and NED, respectively. It was used 0.28 μ M of primers DXS10079, DXS10075 and DXS7424 and 0.2 μ M of DXS10074 and 1 μ M of DXS101 for the amplification reaction.

The multiplex amplification conditions were optimized in a TC-512 Gradient Thermal Cycler (Techne, UK) and consisted of initial desnaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 59,5 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extention step at 60 °C for 60 min. PCR products were separated in an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) and GeneMapper v. 3.5 software (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) was used to determine fragment sizes which were typed by comparison with allelic ladders. The cell line samples K562 (Promega, Madison, WI, USA) and 9947A (Applied Biosystems, CA, USA) were used as control DNA for calibrating allelic ladders.

The allele frequencies, the observed and expected heterozygosity values, exact test to verify the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and the genetic diversity were calculated using Arlequin software version 3.1 [5]. The mean exclusion chance of trios

involving daughters (MEC_T) as well as in father/daughter duos (MEC_D) and power of discrimination in females (PD_F) and in males (PD_M) were computed as proposed by Desmarais et al. [6], using pool data. The polymorphism information content (PIC) was calculated according Botstein et al. [7].

3. Results and discussion

All five STRs could be amplified with consistent results in repeated analyses of randomly chosen DNA samples. The efficiency of amplification was high for all markers. An example for the pentaplex assays is given in Fig. 1.

The exact test of population differentiation revealed no significant differences between women and men, therefore the combined frequencies are shown in Table 1. The forensic efficiency values (Table 2) demonstrate that DXS101 is a highly informative marker, followed by DXS10074, DXS10079, DXS7424 and DXS10075. The polymorphism information content ranged from 0.7470 to 0.8858. For the pentaplex evaluated, the combined values of PD_M and PD_F were 0,9998947 and 0,9999998, respectively and the combined mean exclusion chance in trios involving daughters and in father/daughter duos lacking maternal genotype information were 0,999817 and 0,998042, respectively. No deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium were observed.

For markers with strong LD, haplotype frequencies cannot be inferred from allele frequencies alone, but have to be estimated directly from population data instead. A significant LD was observed for two very tightly linked marker clusters, namely DXS10079, DXS10074 and DXS10075 and DXS101 and DXS7424 [8].

The Chr-X markers DXS10079, DXS10074 and DXS10075 belong to a STR cluster spanning a genetic distance <1 cM. They are located within a 280-kb region at Xq12 and provide stable haplotypes useful for solving complex kinship cases [2]. DXS7424 is located at Xq22 and closely linked to DXS101, corresponding to a genetic localization of 104.9–121 cM from Xp-tel. [3].

The table 3 shows the haplotype frequencies of the two marker clusters. The cluster DXS10079, DXS10074 and DXS10075 showed a genetic diversity of 0.9919 ± 0.0017 and DXS7424 and DXS101 of 0.9742 ± 0.0030 . However, to build a likelihood ratio of the genotype data obtained, the patterns of linkage and linkage disequilibrium between the respective loci have to be taken into account [9].

We concluded that the five ChrX STRs analyzed are highly informative markers for kinship testing and constitute a powerful tool for forensic practice in our population.

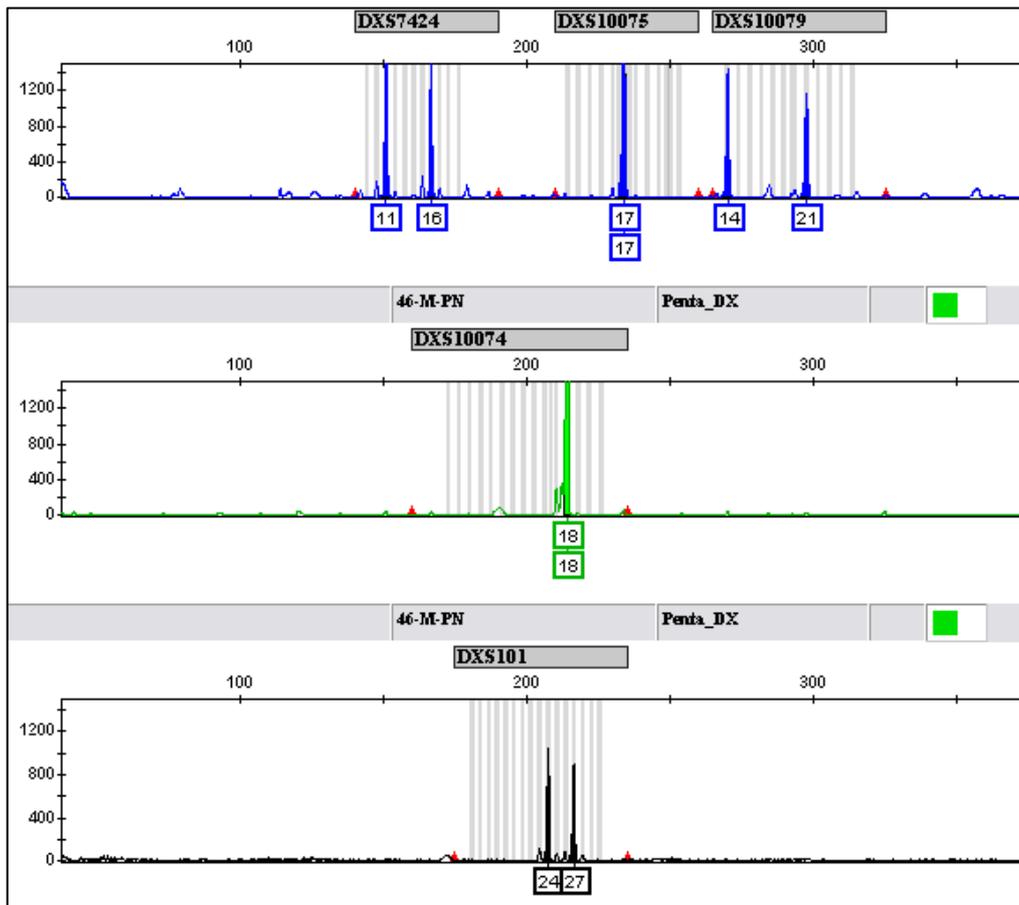


Fig. 1. Electropherograms of the Chr-X pentaplex in a female with the STRs DXS7424 (6-FAM), DX10075 (6-FAM), DXS10079 (6-FAM), DXS10074 (VIC), and DXS101 (NED).

Table 1

Allele frequencies of five ChrX STRs (203 males; 201 females)

Allele	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS7424	DXS101
6					
7		0.04628			
8		0.08430	0.00165		
9		0.01157			
10	0.00165			0.02149	
11		0.01157		0.03140	
12	0.00165	0.03471	0.00331	0.03967	
13		0.03140	0.04793	0.15041	
14	0.02149	0.06446	0.02314	0.18017	0.00165
15	0.01818	0.15702	0.08099	0.28595	0.01322
16	0.02645	0.15041	0.18512	0.19504	0.00331
16.2		0.00165			
17	0.06612	0.15537	0.35868	0.07769	0.00331
17.2			0.05289		
18	0.11736	0.19339	0.21983	0.00826	0.06116
18.2			0.00331		
19	0.23636	0.05124	0.01818	0.00826	0.04463
20	0.27769	0.00496	0.00496		0.03967
21	0.16860				0.05620
22	0.04793				0.04298
23	0.01653			0.00165	0.06446
24		0.00165			0.17355
25					0.13388
26					0.17686
27					0.09917
28					0.05289
29					0.02314
30					0.00992

Table 2

Forensic efficiency

Parameters	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS7424	DXS101
Ho	0.77612	0.88060	0.73632	0.81592	0.90050
He	0.82083	0.87603	0.77928	0.82858	0.89706
HWE	0.21072	0.08853	0.07283	0.59035	0.11940
MEC _T	0,7928	0,8596	0,7462	0,7918	0,8812
MEC _D	0,6742	0,7648	0,6163	0,6724	0,7967
PD _F	0,9427	0,9708	0,9199	0,9420	0,9785
PD _M	0,8164	0,8727	0,7762	0,8159	0,8907
PIC	0,7953	0,8612	0,7470	0,8045	0,8858

Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity; HWE: Hardy–Weinberg equilibrium p-values; MEC_T: mean exclusion chance for ChrX markers in trios involving daughter; MEC_D: mean exclusion chance for ChrX markers in father/daughter duos; PD_F: power of discrimination in female; PD_M: power of discrimination in male; PIC: polymorphism information content.

Table 3

Haplotype frequencies of the linked ChrX STRs

DXS10079-DXS10074- DXS10075	N	Freq.	DXS7424-DXS101	N	Freq.
20, 15, 17	10	0.0493	15, 26	15	0.0739
20, 16, 17	7	0.0345	15, 24	12	0.0591
20, 18, 17	5	0.0246	16, 26	10	0.0493
20, 18, 18	4	0.0197	16, 24	9	0.0443
20, 15, 15	4	0.0197	15, 25	9	0.0443
19, 17, 18	4	0.0197	14, 27	8	0.0394
20, 17, 17	4	0.0197	16, 25	8	0.0394
17, 8, 17	4	0.0197	14, 26	7	0.0345
21, 16, 17	4	0.0197	16, 20	6	0.0296
20, 7, 13	3	0.0148	15, 27	6	0.0296
16, 18, 16	3	0.0148	13, 26	6	0.0296
19, 17, 17	3	0.0148	14, 24	6	0.0296
14, 16, 16	3	0.0148	15, 23	6	0.0296
19, 16, 16	3	0.0148	17, 24	6	0.0296
19, 15, 18	3	0.0148	13, 25	6	0.0296
18, 16, 17	3	0.0148	15, 18	6	0.0296
19, 18, 18	3	0.0148	16, 19	4	0.0197
20, 8, 13	3	0.0148	14, 22	3	0.0148
21, 17, 18	3	0.0148	14, 23	3	0.0148
18, 8, 17	2	0.00985	13, 19	3	0.0148
20, 16, 15	2	0.00985	17, 25	3	0.0148
17, 8, 16	2	0.00985	13, 28	3	0.0148
20, 14, 15	2	0.00985	16, 27	3	0.0148
21, 15, 17	2	0.00985	13, 21	3	0.0148
15, 18, 16	2	0.00985	15, 28	3	0.0148
20, 17, 18	2	0.00985	17, 18	3	0.0148
21, 18, 17	2	0.00985	15, 20	2	0.00985
20, 8, 17	2	0.00985	13, 22	2	0.00985
19, 16, 17	2	0.00985	14, 25	2	0.00985
22, 16, 18	2	0.00985	10, 27	2	0.00985
20, 17, 17.2	2	0.00985	14, 18	2	0.00985
18, 16, 16	2	0.00985	14, 28	2	0.00985
21, 17, 17	2	0.00985	16, 28	2	0.00985
21, 18, 17.2	2	0.00985	16, 15	2	0.00985

19, 8, 17	2	0.00985	14, 30	2	0.00985
19, 15, 17	2	0.00985	15, 22	2	0.00985
20, 16, 18	2	0.00985	15, 21	2	0.00985
19, 19, 17	2	0.00985	16, 22	2	0.00985
20, 17, 16	2	0.00985	17, 26	1	0.00493
21, 15, 16	2	0.00985	10, 26	1	0.00493
21, 12, 17	2	0.00985	16, 18	1	0.00493
21, 7, 14	2	0.00985	14, 20	1	0.00493
21, 16, 18	2	0.00985	11, 22	1	0.00493
20, 19, 17.2	1	0.00493	19, 28	1	0.00493
22, 15, 18	1	0.00493	12, 25	1	0.00493
18, 16, 18.2	1	0.00493	18, 18	1	0.00493
20, 15, 18	1	0.00493	13, 24	1	0.00493
20, 18, 15	1	0.00493	15, 19	1	0.00493
19, 7, 13	1	0.00493	10, 25	1	0.00493
19, 13, 8	1	0.00493	16, 29	1	0.00493
17, 16, 16	1	0.00493	18, 25	1	0.00493
18, 14, 15	1	0.00493	16, 21	1	0.00493
14, 15, 16	1	0.00493	19, 24	1	0.00493
22, 18, 18	1	0.00493	12, 26	1	0.00493
17, 17, 17	1	0.00493	14, 29	1	0.00493
22, 14, 17	1	0.00493	13, 20	1	0.00493
19, 18, 16	1	0.00493	17, 19	1	0.00493
19, 12, 16	1	0.00493	17, 30	1	0.00493
16, 13, 16	1	0.00493	11, 27	1	0.00493
21, 20, 17	1	0.00493	12, 19	1	0.00493
21, 18, 18	1	0.00493			
22, 17, 17	1	0.00493			
23, 14, 17	1	0.00493			
20, 13, 16	1	0.00493			
16, 18, 17	1	0.00493			
19, 16, 15	1	0.00493			
20, 18, 18.2	1	0.00493			
22, 19, 18	1	0.00493			
21, 17, 17.2	1	0.00493			
19, 9, 18	1	0.00493			
20, 16, 16	1	0.00493			
19, 15, 15	1	0.00493			
18, 8, 18	1	0.00493			

20, 15, 16	1	0.00493			
17, 15, 15	1	0.00493			
14, 18, 16	1	0.00493			
21, 9, 13	1	0.00493			
21, 8, 16	1	0.00493			
20, 19, 17	1	0.00493			
17, 19, 18	1	0.00493			
18, 8, 16	1	0.00493			
19, 16, 18	1	0.00493			
21, 12, 19	1	0.00493			
20, 16.2, 16	1	0.00493			
18, 7, 15	1	0.00493			
22, 13, 17	1	0.00493			
18, 16, 15	1	0.00493			
16, 18, 12	1	0.00493			
19, 12, 18	1	0.00493			
18, 17, 16	1	0.00493			
21, 8, 13	1	0.00493			
18, 18, 18	1	0.00493			
14, 16, 18	1	0.00493			
21, 11, 16	1	0.00493			
16, 18, 17.2	1	0.00493			
21, 14, 14	1	0.00493			
19, 14, 17	1	0.00493			
22, 7, 13	1	0.00493			
16, 16, 16	1	0.00493			
17, 16, 17	1	0.00493			
21, 15, 18	1	0.00493			
18, 18, 17	1	0.00493			
19, 8, 18	1	0.00493			
15, 15, 16	1	0.00493			
21, 14, 15	1	0.00493			
22, 19, 16	1	0.00493			
19, 12, 17	1	0.00493			
20, 18, 17.2	1	0.00493			
18, 18, 16	1	0.00493			
22, 18, 17.2	1	0.00493			
23, 18, 17	1	0.00493			
20, 14, 17	1	0.00493			

20, 17, 15	1	0.00493			
20, 7, 14	1	0.00493			
19, 15, 16	1	0.00493			
18, 15, 17	1	0.00493			
19, 17, 20	1	0.00493			
20, 13, 19	1	0.00493			
18, 14, 16	1	0.00493			
21, 19, 17	1	0.00493			
19, 9, 16	1	0.00493			

Acknowledgements

The authors would like to thank FAPEAL for the financial support and the colleagues from Laboratório de DNA Forense - UFAL.

References

- [1] P.S. Walsh , D.A. Metzger , R. Higuchi , Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 (1991) 506-513.
- [2] S. Hering, C. Augustin, J. Edelmann, M. Heidel, J. Dressler, H. Rodig, E. Kuhlisch, R. Szibor, DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases, *Int. J. Legal Med.* 120 (2006) 337–345.
- [3] J. Edelmann, S. Hering, E. Kuhlisch, R. Szibor, Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome, *J. Forensic Sci.* 25 (2002) 217–222.
- [4] J. Edelmann, R. Szibor, DXS101: a highly polymorphic X-linked STR, *Int. J. Legal Med.* 114 (2001) 301–304.
- [5] L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider, Arlequin (version. 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinform. Online* 1 (2005) 47–50.
- [6] D. Desmarais, Y. Zhong, R. Chakraborty, C. Perreault, L. Busque, Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA), *J. Forensic Sci.* 43 (1998) 1046–1049.

[7] D. Botstein, R.I. White, M. Skolnick, R.W. Davis, Construction of a genetic linkage map in man using restriction, *Am J Hum Genet.* 32 (1980) 314–331.

[8] R. Szibor, X-chromosomal markers: Past, present and future, *For Sci Int: Genetics* 1 (2007) 93–99.

[9] M. Krawczak, Kinship testing with X-chromosomal markers: Mathematical and statistical issues, *For Sci Int: Gen* 1 (2007) 111-114.