

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

NICOLE NASCIMENTO DA FRÉ

**DADOS GENÉTICOS POPULACIONAIS E DE MUTAÇÕES *DE NOVO* DE 23 LÓCUS Y-STRS EM
INDIVÍDUOS DO RIO GRANDE DO SUL**

Orientadora: CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre

2014

NICOLE NASCIMENTO DA FRÉ

**DADOS GENÉTICOS POPULACIONAIS E DE MUTAÇÕES *DE NOVO* DE 23 LÓCUS Y-STRS EM
INDIVÍDUOS DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre

2014

RESUMO

Foram avaliadas as frequências alélicas e haplotípicas, bem como os parâmetros estatísticos forenses, para 23 loci *Short Tandem Repeat (STRs)* de cromossomo Y presentes no kit comercial *PowerPlex®Y23 system* (DYS19, *DYS385a/b*, *DYS389I/II*, *DYS390*, *DYS391*, *DYS392*, *DYS393*, *DYS437*, *DYS438*, *DYS439*, *DYS448*, *DYS456*, *DYS458*, *DYS635*, *Y-GATA-H4*, *DYS481*, *DYS533*, *DYS549*, *DYS570*, *DYS576*, *DYS643*) em uma amostra de 150 homens saudáveis, residentes no sul do Brasil. Um total de 150 haplótipos diferentes foram identificados. A maior diversidade genética foi observada para o marcador de locus único *DYS570* ($GD = 0,7888$) e para o locus duplo *DYS385* ($GD = 0,9009$). Também foram analisados 150 de pares de pai-filho pelo mesmo sistema, e um total de 13 mutações foram observadas em 3.450 transferências alélicas entre pais-filhos, com uma taxa geral de mutação nos 23 loci de 3.768×10^{-3} (95% CI = $3.542 \times 10^{-3} - 3.944 \times 10^{-3}$). Em todos os casos foi encontrado apenas um locus mutado com ganho ou perda de repetições no filho (5 ganhos de repetição única, 7 perdas de repetição única e 1 perda de dupla-repetição). Não foi observado nenhum caso de mutação envolvendo um número não integral de mutações.

PALAVRAS-CHAVE: Y-STR, Rio Grande do Sul, Brasil, taxas de mutação, paternidade.

ABSTRACT

We evaluated haplotype and allele frequencies, as well as statistical forensic parameters, for 23 Y-chromosome short tandem repeats (STRs) loci of the PowerPlex®Y23 system (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y-GATA-H4, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, DYS643) in a sample of 150 apparently healthy males, resident in south Brazil. A total of 150 different haplotypes were identified. The highest gene diversity was observed for the single locus marker DYS570 (GD = 0.7888) and for a two-locus system DYS385 (GD = 0.9009). We also examined 150 father-son pairs by the same system, and observed a total of 13 mutations were identified in the 3,450 father-son allelic transfers, with an overall mutation rate across the 23 loci of 3.768×10^{-3} (95% CI = 3.542×10^{-3} to 3.944×10^{-3}). In all cases there was only one locus mutated with gain/loss of repeats in the son (5 one-repeat gains, and 7 one-repeat and 1 two-repeat losses); we observed no instances of mutations involving a non-integral number of repeats.

KEYWORDS Y-STR, Rio Grande do Sul, Brazil, mutation rate, paternity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO DO TEMA.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
Perfil de DNA na Perícia Forense.....	2
Mutações no Genoma Humano.....	3
Marcadores STRs no Cromossomo Y.....	5
Poder de discriminação individual de STRs no Cromossomo Y.....	8
Objetivo.....	12
CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO.....	13
CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS CITADAS NO TEXTO.....	27
ADENDO.....	32

CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO DO TEMA

INTRODUÇÃO

Uma importante aplicação forense dos *Short Tandem Repeat* de cromossomo Y (Y-STRs) é identificar linhagens paternas e auxiliar na busca de vínculos familiares, dado que os haplótipos Y-STR se mantêm ao longo das gerações sem mutações decorrentes de recombinação. A taxa de mutação por *slippage* (isto é, 'escorregamento' da polimerase), ou por outro mecanismo gerador de microvariantes, para a maioria dos Y-STRs de uso forense é baixa: da ordem de 2×10^{-3} ou menos (Gusmão *et al.*, 2005). Assim, o poder da análise de haplótipos Y-STR em identificar uma linhagem masculina é preciso mesmo após passadas muitas gerações, o que permite estudos das raízes mais remotas de uma família, como descrito por Kayser *et al.* (2000). Mesmo depois de sete gerações, foi possível reconhecer que cinco homens descendentes de dois primos paternos do presidente dos Estados Unidos da América, Thomas Jefferson, compartilhavam o mesmo haplótipo Y-STR encontrado em um descendente masculino de Eston Jefferson, que foi filho de Sally Hemings. Sally foi uma escrava e suposta namorada do presidente (Foster *et al.*, 1998). Para análises como esta, os atuais sistemas multiplex comerciais de Y-STRs têm sido eficientes, mesmo incluindo cerca de 12 loci Y-STRs.

Análises de Y-STRs têm valor também na identificação forense de DNA masculino em casos de agressão sexual. Contudo, os sistemas comerciais de Y-STRs não permitem a individualização pessoal a não ser que se detectem mutações *de novo* (isto é, mutações que surgem na meiose previa ao gameta que deu origem ao indivíduo). Durante o 'IV Seminário Brasileiro de DNA Forense - Cuiabá, Brasil, 2012', foi relatado um caso de agressão sexual múltipla de uma menina de 10 anos; a investigação policial tinha indicado como possível estuprador o pai da menina e/ou dois de seus tios paternos (Svidzinsk *et al.*, 2012). Mas, a materialidade do crime precisava de uma confirmação biológica. Casos especiais como este poderiam ser elucidados pela análise do DNA do sêmen coletado de amostras vaginais após o coito. No entanto, análises de STRs de cromossomos X, autossômico ou mitocondrial seriam ineficientes devido às relações biológicas entre a vítima e os suspeitos. Além disso, para a análise destes cromossomos, mesmo com a extração diferencial de DNA (a qual separa células de espermatozoides das células vaginais) o DNA feminino poderia estar em maior concentração, evitando qualquer resultado conclusivo acerca do perfil dos agressores. Mayntz-Press *et al.* foram capazes de obter perfil íntegro de Y-STRs de sêmen coletado após intervalos pós-coito prolongados, mas para este caso brasileiro, os sistemas multiplex comerciais com poucos loci Y-STRs poderiam não dar resultados conclusivos, dado que os suspeitos agressores eram irmãos paternos. Para a discriminação de cada indivíduo usando Y-STRs, portanto, seria necessária a utilização de um

conjunto mais amplo de Y-STRs com boa capacidade de detecção de taxa de mutação por *slippage* ou outro mecanismo gerador de microvariantes.

A taxa de mutação dos Y-STRs humanos é similar aos STRs autossômicos, indicando que o mecanismo geral mutacional dos microssatélites de Y, decorrente de *slippage* ou de outro mecanismo gerador de microvariantes, é independente da recombinação (Kayser *et al.*, 2000). Neste trabalho, nós nos propusemos a estudar pares masculinos de homens proximamente relacionados (pai-filho) para identificar as taxas de mutação a fim de avaliar suas características e a capacidade discriminatória dos locos Y-STRs presentes no painel *PowerPlex Y-23*, Promega.

REFERENCIAL TEÓRICO

Perfil de DNA na Perícia Forense

A utilização do DNA como ferramenta de identificação humana veio com a publicação de Jeffreys e colaboradores, relatando que certas regiões do DNA produzem uma espécie de “impressão digital” do DNA. Desde este importante fato a Ciência Forense tem sido beneficiada cada vez mais com a tecnologia de análise do DNA, solucionando questões cruciais. Há mais de 15 anos, o método de análise de tipagem do DNA é utilizado no mundo inteiro para solucionar casos de identificação em crimes violentos, crimes menores, atos de terrorismo, desaparecimento de pessoas e desastres em massa (Magalhães e de Melo e Silva, 2006). A possibilidade de análise do DNA de cada indivíduo aumentou a confiabilidade dos resultados de identificação pessoal e de testes de paternidade, pois, ao contrário dos testes sorológicos tradicionais (ABO, MN, Rh, HLA, entre outros) que necessitam de uma fonte de fluido ou sangue, os testes que utilizam DNA não dependem da natureza do material analisado, pois a informação genética está contida integralmente em todas as células somáticas de um indivíduo (Kirby, 1992; Schneider, 1997, Martin *et al.*, 2001). Outra importante vantagem da análise do DNA é que este é fisicamente mais resistente que as proteínas, pois a informação genética é encontrada na sequência nucleotídica tornando sua análise independente da formação da molécula (Schneider, 1997).

O principal objetivo da identificação humana na prática forense criminal é prover dados que justifiquem se determinada pessoa é fonte doadora de uma evidência biológica. Dentre os possíveis resultados da investigação constam: 1 - exclusão, quando as amostras biológicas possuem origens diferentes; 2 - resultados inconclusivos, quando não é possível determinar se as amostras provêm ou não do mesmo doador; 3 - e inclusão quando as amostras são similares e originaram-se da mesma fonte (Inman *et al.*, 2002). Na análise forense cível dos testes de paternidade, a evidência do DNA é

baseada na interpretação de similaridades ou de diferenças nos lócus de marcadores genéticos. Para os testes de paternidade; diferenças encontradas nos lócus entre o suposto pai e os descendentes são atribuídas à paternidade não-verdadeira e, assim, levando à exclusão de uma paternidade biológica-verdadeira (Kayser *et al.*, 2001). Em um teste de paternidade utilizando de 13 a 16 marcadores autossômicos, se não houver alelos compartilhados entre o filho e o suposto pai em três ou mais marcadores, este suposto pai pode ser excluído da possibilidade de ser o pai biológico deste filho. Por outro lado, o compartilhamento de alelos entre o filho e o suposto pai, permite indicar como aceitável a hipótese de paternidade com uma probabilidade igual ou superior a 99,99%.

Mutações no Genoma Humano

A taxa de mutação pode ser diferente dependendo da população e, especialmente devido aos efeitos da deriva genética, se fixam como polimórficas (Futuyma, 1998). O cromossomo Y possui diferentes tipos de polimorfismos que apresentam taxas de mutações diferentes, permitindo assim, por exemplo, selecionar o intervalo de tempo da história entre as populações e o tipo de marcador mais adequado para determinada população (Jobling e Tyler-Smith, 1995). A maioria das mudanças ocorre nas regiões de íntrons e nas regiões extragênicas, conhecidas como regiões neutras, ou seja, que não expressam características fenotípicas e nem conferem caráter adaptativo aos indivíduos. Logo, a análise das mudanças dentro de regiões Y-específicas pode revelar a genealogia paterna e as relações evolutivas entre diferentes grupos de indivíduos (Hammer, 1995).

O mecanismo principal envolvido nas altas taxas de mutação em segmentos com repetições (mono, di, tri, tetranucleotídeos, etc.) parece estar relacionado ao 'escorregamento' ou 'deslizamento' da polimerase (*Slipped-Mispairing Model*) durante a replicação (Levinson e Gutman, 1987; Schlötterer e Tautz, 1992). Desta forma, em uma região repetitiva a fita molde se dissocia temporariamente da fita recém-sintetizada e logo em seguida se associa novamente. Essa associação pode ocorrer em uma unidade de repetição incorreta da fita-molde (escorregamento) formando então uma alça. Se este pareamento não for corrigido, ocorrerá uma mutação por inserção ou deleção (Antonarakis *et al.*, 2010).

Nas mutações do tipo micro-inserção ocorre a adição de um ou mais nucleotídeos na sequência de DNA. Geralmente, esse tipo de mutação é causado por transposons ou erros durante a replicação de elementos repetitivos (por exemplo, sequências A-T). Na microdeleção se dá a remoção de um ou mais nucleotídeos da sequência de DNA. Geralmente elas são irreversíveis; apesar de teoricamente a mesma sequência poder ser restaurada por inserção. Elementos de transposição capazes de reverter uma deleção muito curta (com uma ou duas bases) em um dado local são muito improváveis, ou mesmo inexistentes (Antonarakis *et al.*, 2010). Outro dado já verificado no genoma

humano é que microinserções (de até 20 nucleotídeos) são mais raras que as microdeleções: um levantamento disponível no *Human Gene Mutation Database* (www.hgmd.org) mostra que, no genoma humano existem, aproximadamente, três vezes mais microdeleções do que microinserções, e que muitas dessas microinserções/microdeleções envolvem apenas um nucleotídeo (Antonarakis *et al.*, 2010). Eventos mutacionais ocasionaram a origem de novos alelos, proporcionando uma correlação natural entre o grau de polimorfismo e a taxa de mutação de um dado locus: quanto maior o grau de mutação, mais variável é o locus. Para fins forenses os locos mais polimórficos são um atrativo devido ao alto poder de discriminação (Kayser *et al.*, 1997).

Como demonstrado, os produtos de amplificação de uma molécula-única provenientes de um clone sem inserções STRs apresentam um pico único (na leitura automatizada do produto da amplificação). Em clones com STRs inseridos, os perfis de repetição tornam-se mais dispersos conforme o número de unidades de repetições no molde aumenta. Esta informação é consistente com um aumento na taxa de mutação na fita molde e, assim, o aumento do número de unidades de repetições. Notou-se que quanto mais repetições são adicionadas ao molde, um maior efeito pode ser observado na dispersão do perfil, indicando que a média de mutação (taxa/repetição/ciclo) é maior em segmentos mais repetitivos (Shinde *et al.*, 2003).

As mutações são a única forma de mudança na região Y não-recombinante (NRY) e fonte de toda variabilidade genética situada no cromossomo. Na ausência de mutação, a cópia genética do cromossomo Y encontrada em um pai é idêntica em seu filho e pode ser transmitida através das gerações pela linhagem patrilínea da mesma forma: sem alteração (Jobling e Tyler-Smith, 1995). Como demonstrado por Carvalho-Silva e colaboradores, a taxa de mutação varia entre os microssatélites do cromossomo Y devido ao tamanho do bloco de repetições e a diversidade do locus, sendo que um locus maior apresenta maior diversidade. Mutações espontâneas ocorridas em algum marcador genético da linhagem germinativa do suposto pai usado no teste de paternidade, pode levar a uma exclusão errônea de paternidade, pois serão observadas diferenças entre o perfil genético do suposto pai e dos descendentes (Kayser *et al.*, 2001).

A análise dos dados dos locos Y-STR dos pares pai/filho de paternidade biológica confirmada permite estimar a taxa de mutação locus/alelo-específico para os marcadores evitando-se o risco de exclusão e/ou de inclusão entre paternidade-filiação por causa de mudança de haplótipo devido à mutação de uma geração para outra. Logo, a análise das mudanças dentro dessas regiões Y-específicas podem revelar a genealogia paterna e as relações evolutivas entre diferentes grupos de indivíduos (Zhivotovsky *et al.*, 2004). Estudos sobre a relação da idade paterna e o aumento de taxas de mutação têm sido desenvolvidos em todo o mundo (Gusmão *et al.*, 2005; Decker *et al.*, 2008; Ballantyne *et al.*, 2010). Ainda que a taxa de recombinação seja maior em mulheres do que em

homens (Kong *et al.*, 2004), se considerado o conjunto completo de cromossomos, os homens transmitem um número muito maior de mutações para seus descendentes do que as mulheres (Kong *et al.*, 2012).

Kong e colaboradores (2012) observaram na população da Islândia que, com a média de idade paterna de 29,7, a taxa média de mutações *de novo* era de $1,20 \times 10^{-8}$ por nucleotídeo por geração. Eles sugeriram que a diversidade na taxa de mutação de polimorfismos de único nucleotídeo estaria relacionada a idade do pai no momento da concepção da criança. O efeito seria de cerca de duas mutações por ano o que, em um modelo exponencial, estima-se que as mutações paternas duplicam a cada 16,5 anos. Essas observações mostram a importância de conhecer a relação das taxas mutacionais com a idade paterna.

A figura 1 exemplifica um caso de comprovação de paternidade de um trio familiar apesar da existência de uma mutação. Foi observada uma duplicação em DYS19 além de uma inconsistência de transmissão alélica do pai (15,17) para o filho (15,16). Para este caso, obteve-se um Índice de Paternidade de 1190284082 considerando os loci autossômicos, ou seja, a probabilidade de paternidade foi de mais de 99,99%, reforçando a ideia da hipótese de a inconsistência mencionada tratar-se de uma mutação (Pontes *et al.*, 2007).

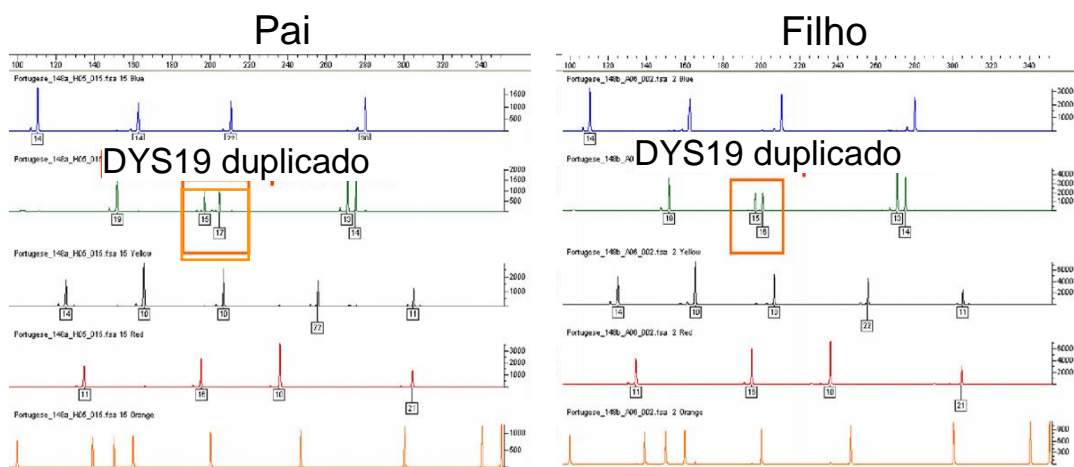


Figura 1 – Duplicação e inconsistência de transmissão de alelo em DYS19 de pai para filho. Fonte: adaptada de Pontes *et al.*, 2007.

Um famoso caso resolvido com o auxílio dos loci Y-STRs foi a identificação de Sadaam Hussein, estadista iraquiano que possuía diversos sócias para dificultar sua captura. Ao ser preso, em 2003, tornou-se necessário confirmar sua identidade, através da comparação de seu perfil Y-STR com o perfil extraído dos corpos de seus filhos mortos em combate no mesmo ano (Tamaki *et al.*, 2005).

Contudo, ainda que o cromossomo Y seja informativo, o conjunto de 9 a 12 marcadores mais convencionais podem não serem capazes de identificar um único indivíduo.

Devido aos fatos aqui apresentados, a análise de alelos adicionais na ciência forense deve ser levada em consideração em duas importantes situações: 1 – pela possibilidade que existe de interpretar erroneamente uma relação biológica entre dois homens em consequência de mutações resultantes de Y-STRs; 2 – pela possibilidade de se distinguir dois homens proximalmente relacionados. Assim, a indução para que se crie de um banco de dados de mutações Y-STR surge com o intuito de enriquecer o conhecimento científico sobre o assunto e foi pedido à comunidade forense que contribuísse com: 1 – dados Y-STRs provenientes dos pares pai/filho com confirmação biológica, independente da presença ou não de mutações; 2 – amostras de DNA do trio (mãe, filho e suposto pai) para os casos em que fossem observados desvios da herança Mendeliana entre pai e filho (Kayser *et al.*, 2001).

Marcadores STRs no Cromossomo Y

Os loci STRs não estão exclusivamente restritos aos cromossomos autossômicos, eles estão presentes também nos cromossomos sexuais X e Y. Mais de 200 loci Y-STRs estão descritos na literatura, mas apenas de 9 a 17 marcadores são de uso comum, principalmente devido à disponibilidade de kits comerciais até o momento (Jobling *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2004; Krenke *et al.*, 2005; Mulero *et al.*, 2006). A utilização dos Y-STRs como ferramenta de identificação humana está baseada na particularidade do cromossomo Y em relação aos cromossomos X e autossômicos (Quintana-Murci *et al.*, 2001) pois, adicionalmente ao painel padrão de loci autossômicos utilizados em análises forenses, os Y-STRs fornecem uma tipagem mais sensível de DNA específico masculino (Prinz *et al.*, 2001).

O cromossomo Y apresenta poucos genes funcionais e um excesso de sequências repetitivas, fundamentais na determinação do sexo (Lahn *et al.*, 2001; Skaletsky *et al.*, 2003). Seu DNA apresenta herança exclusivamente paterna, somente para os filhos homens, na forma haploide, ou seja, não apresenta uma cópia homóloga, como acontece com o resto dos cromossomos humanos. As regiões pseudoautossômicas PAR1 e PAR2 apresentam homologia com o cromossomo X, permitindo que ocorra o pareamento e recombinação entre esses dois cromossomos durante a meiose apenas nestas extremidades (Quintana-Murci *et al.*, 2001; Charlesworth, 2003). Assim, a maior parte deste cromossomo é chamada de Y não-recombinante (NRY), sem áreas de pareamento com o cromossomo X, não há troca de genes com outros segmentos genômicos sendo, portanto, transferidos na forma de blocos de genes (denominados haplótipos) através das gerações pela

linhagem patrilínea de forma intacta, quando na ausência de mutações (Knijff *et al.*, 1997; Carvalho-Silva *et al.*, 1999).

Os haplótipos do cromossomo Y continuam inalterados até que ocorra aleatoriamente alguma mutação, sendo que estas quando ocorrem geram variações haplotípicas, que posteriormente servem como marcadores de linhagem (Knijff *et al.*, 1997). Considerando que as linhagens haplotípicas apresentam diferentes variações nos Y-STRs, em razão de suas histórias evolutivas distintas, é possível relacionar um indivíduo a um dado haplogrupo e, por conseguinte, estimar a origem étnica da linhagem paterna (Gusmão *et al.*, 2005; Farfán e Prieto, 2009).

Em contraste com os STRs autossômicos, os dados sobre taxas de mutação nos Y-STRs são escassos (Heyer *et al.*, 1997). Em um estudo genético realizado com 72 doadores não relacionados da Bahia, apenas uma amostra apresentou um perfil Y-STR raro. O haplótipo com 16 Y-STRs apresentou três loci com picos duplos (DYS389II, DYS437 e DYS439). Esses loci estão localizados em um segmento do cromossomo Y que é acometido por duplicações (região AZFa), que inclui também outros loci Y-STRs, por exemplo DYS389I e DYS438. Casos como esse, chamam a atenção para a interpretação forense de perfis Y-STRs e a importância de conhecer a incidência de mutação-duplicação envolvendo Y-STRs em investigações forenses (Diederich *et al.*, 2005).

Comparando as repetições di-, tri- e tetranucleotídeos, os Y-STRs com unidades de repetições mais longas ocorrem de forma mais rara e também são menos utilizados (Zhivotovsky *et al.*, 2004). As repetições de penta e hexanucleotídeos apresentam, aproximadamente, duas vezes menos repetições e diversidade que as repetições tri- e tetranucleotídeos. Assim, os Y-STRs com unidades de repetição mais longas são mais robustos em distinguir os haplogrupos do cromossomo Y, incluindo em alguns casos, a identificação de divisões filogenéticas dentro de haplogrupos estabelecidos, quando se objetiva estudar (Järve *et al.*, 2009).

O *Y-STR Haplotype Reference Database* (YHRD; <http://www.yhrd.org/>) estabeleceu a utilização de um haplótipo mínimo para determinação da frequência de microssatélites do cromossomo Y para ser utilizado nos casos de identificação humana. Este haplótipo mínimo compreende um conjunto de nove Y-STRs: DYS19, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 e DYS385 a/b (Kayser *et al.*, 1997; Pascali *et al.*, 1999). Este conjunto de haplótipos pode ser estendido para outros loci Y-STRs (DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, YGATAH4) para aumentar o poder de discriminação (Ayub *et al.*, 2000; Redd *et al.*, 2002; Mulero *et al.*, 2006) (Figura 2).

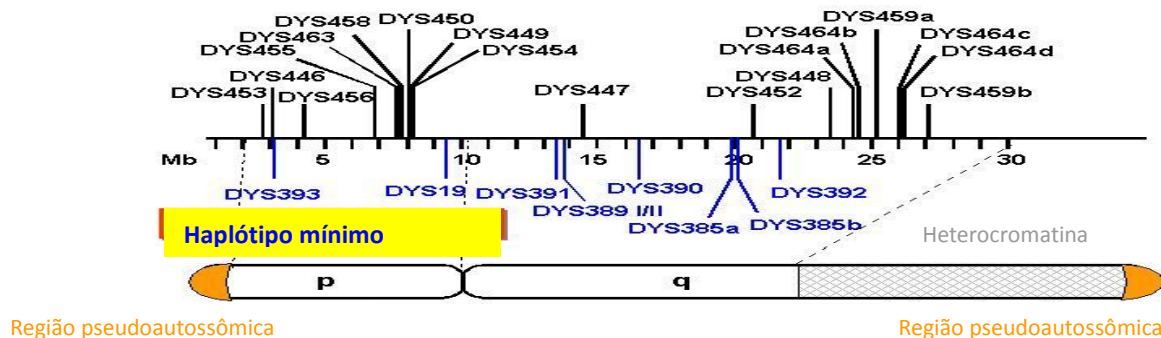


Figura 2– Posições dos locos Y-STRs ao longo do Cromossomo Y. Fonte:

<http://www.nist.gov>.

Em relação à população brasileira as informações a cerca dos locos Y-STRs para fins forenses ainda é pouco vasta, sendo representada por um número relativamente baixo de amostras para um grupo limitado de marcadores. A grande maioria dos estudos não incluem mais do que os 9 Y-STRs preconizados pelo YHRD e/ou o conjunto de 17 Y-STRs do kit comercial *YFiler* (*Life Technologies*). Desta maneira, o poder de discriminação para estes marcadores não é suficiente para evitar uma significativa proporção de alelos compartilhados dentro das populações estudadas (Grattapaglia *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Góis *et al.*, 2008; Schwengber *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2011; Wolfgramm *et al.*, 2011).

A população atual do Brasil é uma consequência da mistura de vários povos de origens diferentes, como Ameríndios, Europeus e Africanos (IBGE, 2010); e a contribuição genética de cada grupo é conhecida por ser heterogênea em todo o país (Ribeiro, 1995). Como demonstrado no estudo de Carvalho e colaboradores, em que foi realizada a análise das linhagens paternas na população brasileira (Manaus e Ribeirão Preto) e africana (Guiné-Bissau, Angola e Moçambique). Neste estudo foram comparadas as distâncias genéticas entre as diferentes populações, não sendo observada nenhuma diferença significativa entre as de Manaus e Ribeirão Preto e também quando comparadas estas com as populações da América do Sul. Porém quando comparadas as populações das duas cidades brasileiras (de descendentes de africanos do Rio de Janeiro e Ameríndios do Sul) com outras populações americanas foi encontrada uma diferença significativa.

Um estudo realizado no Estado do Rio Grande do Sul (RS) demonstrou que a distância entre os haplótipos observados na população do RS não foi significativamente diferente quando comparada à maioria das regiões do Brasil e Argentina, porém notou-se diferença para São Paulo, Itália e Norte de Portugal. Os haplótipos verificados no RS apresentaram-se muito distantes da Espanha, região Amazônica, Alemanha e Ameríndios do Sul. Quando os dados do RS foram divididos em sete regiões

geopolíticas notaram-se algumas diferenças, principalmente na região centro-leste, entretanto nenhuma região foi diferente de todo o Brasil (Schwengber *et al.*, 2009).

Poder de discriminação individual de STRs no Cromossomo Y

Estabelecidos os principais lócus a serem analisados, estudos em diferentes localidades do mundo foram desenvolvidos para aprimorar a técnica e a capacidade de discriminação dos Y-STRs. Pode-se observar que ao longo do tempo foram incluídos outros Y-STRs com o intuito de aumentar a capacidade discriminativa do teste (Pontes *et al.*, 2007). Altos níveis de diversidade podem ser encontrados quando estudado um maior número de lócus específicos do cromossomo Y. Em muitas populações humanas espera-se que mesmo um número relativamente pequeno de Y-STRs (de 9 a 17) produza uma percentagem de mais de 90% de haplótipos diferentes em populações com poucas amostras de indivíduos não relacionados (Carvalho-Silva *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007; Góis *et al.*, 2008; Palha *et al.*, 2011).

Os dados gerados em um estudo utilizando 17 Y-STRs de um kit comercial demonstraram que o haplótipo construído foi altamente polimórfico e discriminativo na população do norte de Portugal. A genotipagem com esse número de marcadores permitiu uma maior capacidade de discriminação quando comparado com um estudo realizado com menor número de marcadores, demonstrando a importância em relação à análise forense por permitir a genotipagem de um maior número de lócus Y-STRs e usando menor quantidade de amostra de DNA (Pontes *et al.*, 2005; Pontes *et al.*, 2007). Cálculos de frequência de um banco de dados são especialmente críticos para marcadores haploides, ainda mais se tratando de países com complexas histórias de miscigenação, como o Brasil. O grande esforço para aprimorar os bancos de dados torna-se necessário para capturar a real diversidade genética esperada de um país grande e heterogêneo. Os bancos de dados representativos de uma população são importantes para definir corretamente as frequências de distribuição alélica, haplotípica e genotípica (Quintana-Murci *et al.*, 2001).

Palha e colaboradores objetivando estabelecer um banco de dados representativo da população brasileira estudaram o perfil genético masculino de indivíduos provenientes das cinco diferentes regiões geopolíticas, usando 23 Y-STRs provenientes do haplótipo mínimo estabelecido pelo YHRD e 17 marcadores para cromossomo Y presentes no *Yfiler* (Life Technologies). A reação ocorreu em duas *PCR multiplex* e eles observaram a predominância de linhagens masculinas europeias em todas as regiões do país, porém nenhuma diferença importante quanto à história de colonização de cada região brasileira. Também observaram que o uso de um maior número de marcadores permitiu uma alta capacidade de discriminação entre os indivíduos não relacionados da

população e, também aumentou o poder discriminativo entre os parentes paternos (Palha *et al.*, 2012).

Com a finalidade de desenvolver novos sistemas multiplex para identificar casos em que o poder discriminatório individual de locus do cromossomo Y seja necessário, ou seja, quando for necessário identificar locus em que não exista a plena coincidência entre o perfil Y-STR de homens relacionados, Hanson e Ballantyne montaram um painel com 14 novos Y-STR. No seu trabalho, inicialmente, mais de 400 Y-STR loci foram identificados no cromossomo Y com potencial de discriminação superior ao dos kits comercialmente disponíveis. Os autores testaram 91 locus quanto à capacidade relativa para aumentar o potencial de discriminação dos Y-STR comumente usados. O resultado desta extensa avaliação foi o desenvolvimento de um sistema multiplex sistema com ultra-alto poder de discriminação (UHD) que permite a coamplificação robusta de 14 novos Y-STR. O uso combinado do multiplex UHD e o kit *AmpFISTRH Biosystems YfilerH* resultou em discriminação de 100% de todos os indivíduos dentro do conjunto de amostras testadas.

Ballantyne *et al.* (2010) analisaram taxas de mutações em 186 marcadores Y-STRs em pares confirmados pai/filho. Observaram que a maioria de 93% dos 186 Y-STRs, incluindo aqueles marcadores comumente utilizados na prática forense exibiram taxas de mutação entre 1×10^{-4} e 1×10^{-3} . Entretanto, 13 Y-STRs demonstraram estarem substancialmente acima das taxas médias de mutação observadas, desta maneira, os pesquisadores nomearam estes marcadores como “Y-STRs mutando rapidamente” (*rapidly mutating Y-STR; ou RM Y-STR*). Os achados sugerem que esses 13 marcadores altamente mutados podem fornecer um aumento da identificação masculina relativa e poderá alterar a análise forense do cromossomo Y de forma a diferenciar uma linhagem masculina prévia através da identificação individual masculina.

Ainda que apresentem um alto poder discriminatório, tanto o painel UHD como o RM, não estão disponíveis comercialmente. Um recente painel comercial de Y-STR, o *PowerPlex® Y23 System* (*Promega Corporation*), está agora disponível, e se baseia na reação de amplificação da polimerase com a meta de amplificar 23 Y-STRs em apenas uma reação. Assim, um grande número de locus podem ser tipados simultaneamente. Um estudo examinou a concordância entre seis populações de indivíduos não relacionados usando o protótipo do *PowerPlex® Y23 System* (que possui a mesma configuração do original) e o kit *AmpFSTR® Y-filer™* (*Life Technologies*) (Davis *et al.*, 2012). Entre os dois kits existem 17 Y-STRs em comum, os quais todos apresentaram resultados concordantes. O *PowerPlex® Y23 System* apresenta seis novos locus Y-STRs altamente discriminadores (Figura 3), os quais tiveram uma tipagem bem sucedida em 951 amostras do estudo citado (Davis *et al.*, 2012). O grande benefício do uso desse kit pode ser a presença de locus adicionais que aumentam o poder e a discriminação da tipagem dos Y-STRs. Também conhecendo-se as taxas de mutação dos Y-STRs deste

painel pode-se aumentar a chance de diferenciação da linhagem dos parentes paternos (Ge *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2012).

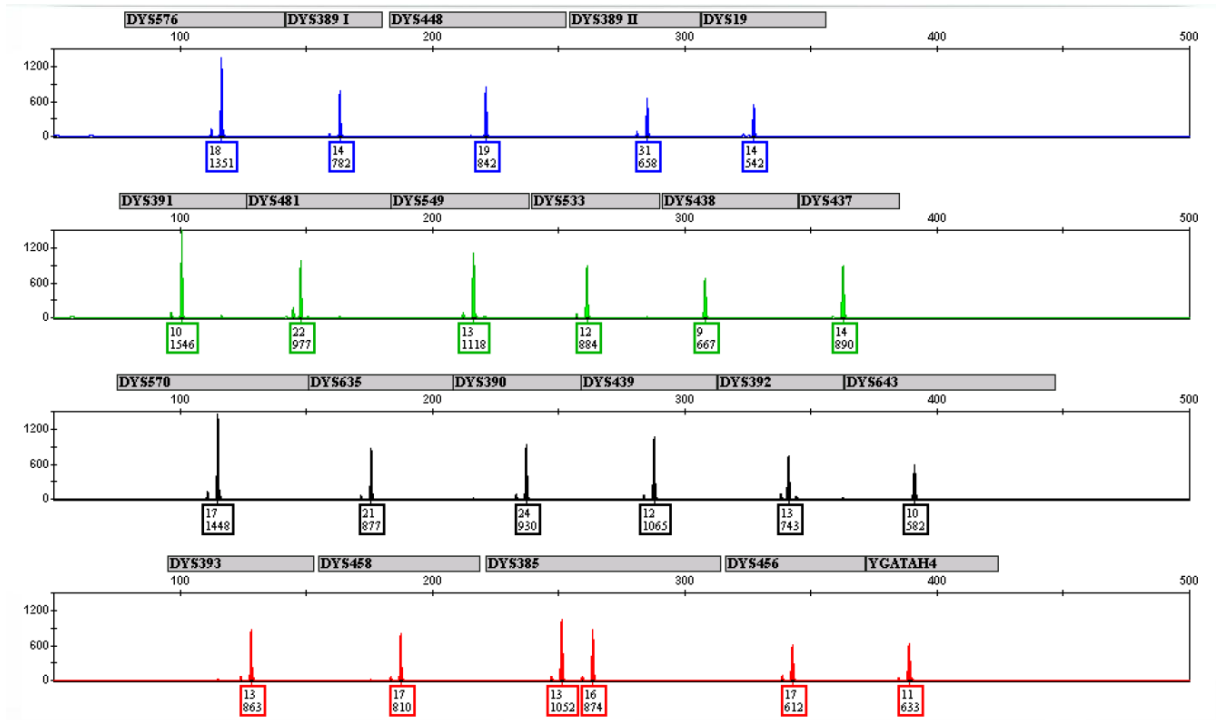


Figura 3 – Eletróferograma representativo exibindo o haplótipo Y23 do padrão NIST 2395 A. Fonte: Davis *et al.*, 2012.

Nosso grupo de pesquisa, neste momento, está desenvolvendo o presente estudo com a finalidade de prover informações confiáveis próprias da população do Rio Grande do Sul relativas aos marcadores moleculares STRs de cromossomo Y usando o sistema *PowerPlex® Y23 System*. Os resultados deste estudo deverão permitir a sua utilização para fins de emissão de laudos periciais, sejam eles criminais ou cíveis, bem como contribuir com o aprimoramento de bancos de dados de Y-STRs do Brasil e do mundo.

5 Objetivo

Estudar 23 marcadores moleculares STRs de cromossomo Y em 150 pares de pai-filho oriunda da população do Estado do Rio Grande do Sul e determinar as frequências alélicas e haplotípicas, a diversidade genética e as taxas e tipos de mutações *de novo*.

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

ANNOUNCEMENT OF POPULATION DATA

Genetic data and *de novo* mutation rates in father-son pairs of 23 Y-STR loci in Southern Brazil population.

Abstract

We evaluated haplotype and allele frequencies, as well as statistical forensic parameters, for 23 Y-chromosome short tandem repeats (STRs) loci of the PowerPlex®Y23 system (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y-GATA-H4, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, DYS643) in a sample of 150 apparently healthy males, resident in south Brazil. A total of 150 different haplotypes were identified. The highest gene diversity was observed for the single locus marker DYS570 (GD = 0.7888) and for a two-locus system DYS385 (GD = 0.9009). We also examined 150 father-son pairs by the same system, and observed a total of 13 mutations were identified in the 3,450 father-son allelic transfers, with an overall mutation rate across the 23 loci of 3.768×10^{-3} (95% CI, 3.542×10^{-3} to 3.944×10^{-3}). In all cases there was only one locus mutated with gain/loss of repeats in the son (5 one-repeat gains, and 7 one-repeat and 1 two-repeat losses); we observed no instances of mutations involving a non-integral number of repeats.

Keywords: Y-STR, Rio Grande do Sul, Brazil, mutation rate, paternity

1. Population and endorsements

Samples stored on FTA paper were obtained from 150 father/son pairs donors from paternity cases enrolled in Rio Grande do Sul, Brazil, a regions that was essentially colonized by Portuguese, German, and Italian immigrants in the eighteenth century [1]. The biological relationship of all father/son pairs was previously confirmed by autosomal STR analysis (AmpFLSTR® Identifier® PCR Amplification Kit; Applied Biosystems; Life Technologies, USA), with paternity index values > 10,000. The age of the father at the time of son's birth was noted. All of the participants signed informed consent forms, and this study was carried out in accordance with approved ethical standards (CAAE 11096212.6.0000.5336; Protocol # 180.121). We used the nomenclature recommended by the DNA

Commission of the International Society of Forensic Genetics [2], as well as the recommendations for publication of population data for forensic purposes [3].

2. DNA extraction

Genomic DNA was purified from dried blood samples preserved on FTA cards (Whatman Bioscience, Cambridge, UK) following the manufacturer's instructions.

3. PCR and typing

The DNA samples were amplified using the PowerPlex® Y23 System kit (Promega Corporation, Madison, WI) according to the manufacturer's recommendations. A large battery of loci can be typed simultaneously with this validated kit that target 23 Y-STR loci: DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y-GATA-H4, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, DYS643 [4, 5]. PCR products were separated and genotyped by capillary electrophoresis on an ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) following the user manual recommendations. Electrophoresis results were analyzed using GeneMapper® ID software v3.2 (Life Technologies, USA). Mutations were identified by electrophoresis as allele length differences between father and son. All mutational events cases were confirmed by re-analysis. The mutations were confirmed by a second typing by AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems; Life Technologies, USA) whenever the locus involved was present in in this different system.

4. Quality control and YHRD

Our laboratory participated in the GEP/ISFG Collaborative Study. A quality control check was performed using the proficiency testing of the Y-STR Haplotyping Quality Assurance Exercise. The 23 Y-STRs haplotype data for the sample of father/son pairs from Rio Grande do Sul, Brazil will be available in the YHRD database (<http://www.yhrd.org>).

5. Analysis of data

Allele and haplotype frequencies were determined using the software Arlequin, version v3.5.1.3 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) [6]. Haplotype diversity (HD), power of matching (PM),

power of discrimination (PD) and discrimination capacity (DC) were calculated as described elsewhere [7]. Y-STR haplotype frequencies and diversity were calculated treating the loci DYS385a and DYS385b as a single haplotype, and the locus DYS389I after subtracting the value of DYS389I. The Y-STR mutation rate at each locus was calculated as the number of mutations divided by the number of allele transfers from the father to son. The age of the fathers (at the time of son's birth) with and without mutations was compared by a Mann–Whitney U test.

6. Results and discussion

A total of 150 father-son pairs with full profiles were analyzed in this study. Allele/genotype frequencies and gene diversity values calculated for each locus in the sons are listed in Table 1 (the six new loci of the PowerPlex Y-23 kit are underlined and in grey box). The highest gene diversity was observed for the single locus marker DYS570 (GD = 0.7888) and for a two-locus system DYS385 (GD = 0.9009). We identified a total of 150 different haplotypes in a sample. The genotyping with the 23 Y-STR loci using PowerPlex® Y23 System kit resulted in a greater discrimination capacity when compared with previously published studies in the same RS population with 11 Y-STR loci (DC=84.0%) [8], and with 17 Y-STR loci (DC=96.9%) [9].

A total of 13 mutations were identified in the 3,450 father-son allelic transfers, with an overall mutation rate across the 23 loci of 3.768×10^{-3} (95% Ci, 3.542×10^{-3} to 3.944×10^{-3}). This rate varied from other Y-STRs studies in other populations as is showed in Table 2, but this difference was not statically significant considering an overall proportion of 2.432×10^{-3} (P = 0.116, Binomial Test - Bilateral; see Table 2). Based in the data from Table 2 we compare the proportion of mutation per meiosis (father to son transmission of the whole Y chromosome) calculated by the number of mutations within the whole Y chromosome divided by the number of the father-son pairs analyzed; as expected, a larger number of mutations is encountered when the Y-STR system have more loci (Figure 1).

In the 23 Y-STR panel we observed a not so different number of gains (N = 5) and losses (N = 8) of repeats in the son; this proportions were similar to global proportions of 55.2% of gains (P = 0.225) and 44.8% of losses (P = 0.350, Binomial Test - Bilateral; see Table 2). Some variations among studies might be resulting of the differences in the sample size and/or in the number of analyzed loci. In all cases there was only one single locus mutated per pair with gain/loss of repeats in the son; five were gain of one-repeat (single-step), seven were loss of one-repeat, and in one case there was a two-repeat loss (locus DYS481) (Table 3). Ninety-two percent (12/13) were mutations that resulted in

one repeat difference, which is consistent with the concept that due to strand slippage during replication, the majority of mutations comprise single step repeat gain or loss [10].

In order to confirm the paternity of these 13 alleged father-son pairs, the AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems; Life Technologies, USA) results were reviewed. None of these father-son pairs was found to have observable *de novo* mutations with the 15 autosomal STRs. The combined paternity index (CPI) values for each sample pair using the 15 autosomal AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit STR loci genotyping results considering father-son pair, as well as the CPI with mothers' profile included were showed in Table 3. In these cases the CPI for father-son pair were above 4.2×10^2 , and when the mother's profile is included for each pair, the CPI was above 8.3×10^6 . Table 3 shows also the age of the fathers involved in the observed mutation events. No significant differences between mutation event and the father's age at the birth of child was observed ($P = 0.7970$; Mann-Whitney U-Test) since the average age of the fathers involved in mutation events was 27.84 years ($SD=8.21$) and for no-mutation transmissions, the average was 29.00 years ($SD=9.07$). A similar result was noticed in a study with 1,766 father-son pairs (15,894 meioses) in nine Y-STR loci [11]. However, it is in contrast with a collaborative work with 3,026 father-son pairs in 17 Y-STR loci [12] where the authors found that mutation rate increased with the age ($p<0.001$; Mann-Whitney U-Test), and with subsequent work that analyzed 1,730 father-son pairs by AmpF/STR® 17Yfiler® PCR amplification kit [13]. Variations among these and other studies are in Table 4 and might be explained by the differences in the number of Y-STR analyzed loci or by the still small group of fathers who transmit mutations (about 0.2% of all evaluated men).

The observed mutation rates at 23 Y-STR loci were 6.7×10^{-2} (in DYS458, DYS358a/b, and DYS456), 1.3×10^{-3} (in DYS481, DYS570, and DYS390), and 2×10^{-3} in DYS576. In 16 Y-STR loci there were no mutations. Since mutation rate is believed to increase with the length of allele repeat size [10], we recorded the allele category size (the alleles were categorized into 25%, 50%, and 25% quantiles for short, moderate, and long sizes, respectively); all mutations occurred in the progenitor alleles (father's alleles) with moderate size.

We observed no instances of mutations involving a non-integral number of repeats, like du- or tri- plication, deletion, micro-variant, etc. in our sample. Knowledge of the mutation rates of the loci described above will improve the exclusion criteria in paternity testing and the interpretation of the DNA profiles in the population of southern Brazil. These data show that the present set of 23 Y-STR markers studied with PowerPlex® Y23 System kit are highly polymorphic and discriminative in the Brazilian southernmost state population.

References

- [1] Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), Brasil 500 anos de povoamento, IBGE, Rio de Janeiro, 2000.
- [2] L. Gusmão, J.M. Butler, A. Carracedo, P. Gill, M. Kayser, W.R. Mayr, N. Morling, M. Prinz, L. Roewer, C. Tyler-Smith, P.M. Schneider, International Society of Forensic Genetics, DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis, *Int. J. Legal Med.* 120(4) (2006) 191-200.
- [3] A. Carracedo, J.M. Butler, L. Gusmão, W. Parson, L. Roewer, P.M. Schneider, Publication of population data for forensic purposes, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4(3) (2010) 145-147.
- [4] C. Davis, J. Ge, C. Sprecher, A. Chidambaram, J. Thompson, M. Ewing, P. Fulmer, D. Rabbach, D. Storts, B. Budowle, Prototype PowerPlex® Y23 System: A concordance study, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7(1) (2013) 204-208.
- [5] J.M. Thompson, M.M. Ewing, W.E. Frank, J.J. Pogemiller, C.A. Nolde, D.J. Koehler, A.M. Shaffer, D.R. Rabbach, P.M. Fulmer, C.J. Sprecher, D.R. Storts, Developmental validation of the PowerPlex® Y23 System: A single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 240–250.
- [6] L. Excoffier, H.E. Lischer, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Mol. Ecol. Resour.* 10(3) (2010) 564-567.
- [7] S. Willuweit, L. Roewer, International Forensic Y Chromosome User Group, Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2) (2007) 83-87.
- [8] F.P. Leite, S.M. Callegari-Jacques, B.A. Carvalho, T. Kommers, C.H. Matte, P.E. Raimann, S.P. Schwengber, V.A. Sortica, L.T. Tsuneto, M.L. Petzl-Elmer, F.M. Salzano, M.H. Hutz, Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations, *Am. J. Hum. Biol.* 20 (2008) 359–363.
- [9] S.P. Schwengber, T. Kommers, C.H. Matte, P.E. Raimann, B.A. Carvalho, F.P. Leite, M.A. Medeiros, L.F. Souza, C.S. Castro, F.G. Chassot, S.L. Bonatto, Population data of 17 Y-STR loci from Rio Grande do Sul state (South Brazil), *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2009) e31-e33.
- [10] J. Ge, B. Budowle, X.G. Aranda, J.V. Planz, A.J. Eisenberg, R. Chakraborty, Mutation rates at Y chromosome short tandem repeats in Texas populations, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3(3) (2009) 179-184.
- [11] B.M. Dupuy, M. Stenersen, T. Egeland, B. Olaisen, Y-chromosomal microsatellite mutation rates: differences in mutation rate between and within loci, *Hum. Mutat.* 23(2) (2004) 117-124.
- [12] L. Gusmão, P. Sánchez-Diz, F. Calafell, P. Martín, C.A. Alonso, F. Alvarez-Fernández, C. Alves, L. Borjas-Fajardo, W.R. Bozzo, M.L. Bravo, J.J. Builes, J. Capilla, M. Carvalho, C. Castillo, C.I. Catanesi, D. Corach, A.M. Di Lonardo, R. Espinheira, E. Fagundes de Carvalho, M.J. Farfán, H.P. Figueiredo, I. Gomes, M.M. Lojo, M. Marino, M.F. Pinheiro, M.L. Pontes, V. Prieto, E. Ramos-Luis, J.A. Riancho, A.C. Souza Góes, O.A. Santapa, D.R. Sumita, G. Vallejo, L. Vidal Rioja, M.C. Vide, C.I. Vieira da Silva, M.R.

Whittle, W. Zabala, M.T. Zarrabeitia, A. Alonso, A. Carracedo, A. Amorim, Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites, *Hum. Mutat.* 26(6) (2005) 520-528.

[13] M. Goedbloed, M. Vermeulen, R.N. Fang, M. Lembring, A. Wollstein, K. Ballantyne, O. Lao, S. Brauer, C. Krüger, L. Roewer, R. Lessig, R. Ploski, T. Dobosz, L. Henke, J. Henke, M.R. Furtado, M. Kayser, Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit, *Int. J. Legal Med.* 123(6) (2009) 471-482.

[14] A. Laouina, S. Nadifi, R. Boulouiz, M. El Arji, J. Talbi, B. El Houate, H. Yahia, F. Chbel, Mutation rate at 17 Y-STR loci in "Father/Son" pairs from moroccan population, *Leg. Med. (Tokyo)*. 15(5) (2013) 269-71.

[15] M.J. Farfán, V. Prieto, Mutations at 17 Y-STR loci in father-son pairs from Southern Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series*. 2 (2009) 425-426.

[16] V. Onofri, L. Buscemi, A. Tagliabracci, Evaluating Y-chromosome STRs mutation rates: A collaborative study of the Ge.F.I.-ISFG Italian Group, *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series*. 2 (2009) 419-420.

[17] P. Sánchez-Diz, C. Alves, E. Carvalho, M. Carvalho, R. Espinheira, O. García, M.F. Pinheiro, L. Pontes, M.J. Porto, O. Santapa, C. Silva, D. Sumita, S. Valente, M. Whittle, I. Yurrebaso, A. Carracedo, A. Amorim, L. Gusmão; GEP-ISFG (The Spanish and Portuguese Working Group of the International Society for Forensic Genetics), Population and segregation data on 17 Y-STRs: results of a GEP-ISFG collaborative study, *Int. J. Legal Med.* 122(6) (2008) 529-33.

[18] M. Caplinskiene, A. Pauliukevicius, J. Jankauskiene, D. Bunokiene, J. Kukiene, K. Savanevskyte, A. Jurenienė, Autosomal and Y-STR mutations in Lithuanian population, *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series*. 1 (2008) 237-238.

[19] A.E. Decker, M.C. Kline, J.W. Redman, T.M. Reid, J.M. Butler, Analysis of mutations in father-son pairs with 17 Y-STR loci, *Forensic Sci. Int. Genet.* 2(3) (2008) e31-5.

[20] M.L. Pontes, D. Abrantes, G. Lima, L. Cainé, M.J. Pereira, P. Matos, M.F. Pinheiro, AmpF ℓ STR[®] Y-filer[™]: A new tool for rapid Y-STR forensic haplotyping, *Int. Congr. Ser.* 1288 (2006) 180-182.

[21] B. Budowle, M. Adamowicz, X.G. Aranda, C. Barna, R. Chakraborty, D. Cheswick, B. Dafoe, A. Eisenberg, R. Frappier, A.M. Gross, C. Ladd, H.S. Lee, S.C. Milne, C. Meyers, M. Prinz, M.L. Richard, G. Saldanha, A.A. Tierney, L. Viculis, B.E. Krenke, Twelve short tandem repeat loci Y chromosome haplotypes: genetic analysis on populations residing in North America, *Forensic Sci. Int.* 150 (2005) 1–15.

[22] D.J. Ballard, C. Phillips, G. Wright, C.R. Thacker, C. Robson, A.P. Revoir, D.S. Court. A study of mutation rates and the characterisation of intermediate, null and duplicated alleles for 13 Y chromosome STRs, *Forensic Sci. Int.* 155 (2005) 65–70.

[23] R. Kurihara, T. Yamamoto, R. Uchihi, S.L. Li, T. Yoshimoto, H. Ohtaki, K. Kamiyama, Y. Katsumata, Mutations in 14 Y-STR loci among Japanese father-son haplotypes, *Int. J. Legal Med.* 118 (2004) 125–131.

- [24] M. Kayser, L. Roewer, M. Hedman, L. Henke, J. Henke, S. Brauer, C. Kruger, M. Krawczak, M. Nagy, T. Dobosz, R. Szibor, P. de Knijff, M. Stoneking, A. Sajantila, Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs, *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 1580–1588.
- [25] J.A. Soares-Vieira, A.E.C. Billerbeck, E.S.M. Iwamura, B.B. Mendonca, L. Gusmão, P.A. Otto, Population and mutation analysis of Y-STR loci in a sample from the city of São Paulo (Brazil), *Genet. Mol. Biol.* 31 (2008) 651-656.
- [26] J.R. Padilla-Gutiérrez, Y. Valle, A. Quintero-Ramos, G. Hernández, K. Rodarte, R. Ortiz, N. Olivares, F. Rivas, Population data and mutation rate of nine Y-STRs in a mestizo Mexican population from Guadalajara, Jalisco, México, *Leg. Med. (Tokyo)*. 10(6) (2008) 319-20.
- [27] P.M. Domingues, L. Gusmão, D. A. da Silva, A. Amorim, W.P. Rinaldo, E.F. Carvalho, Sub-Saharan Africa descendents in Rio de Janeiro (Brazil): population and mutational data for 12 Y-STR loci, *Int. J. Legal Med.* 121 (2007) 238–241.
- [28] C. Hohoff, K. Dewa, U. Sibbing, K. Hoppe, P. Forster, B. Brinkmann, Y-chromosomal microsatellite mutation rates in a population sample from northwestern Germany, *Int. J. Legal Med.* 121 (2007) 359–363.
- [29] C. Vieira-Silva, P. Dario, T. Ribeiro, I. Lucas, H. Geada, R. Espinheira, Y-STR mutational rates determination in South Portugal Caucasian population, *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series.* 2 (2009) 60–61.
- [30] H.Y. Lee, M.J. Park, U. Chung, H.Y. Lee, W.I. Yang, S.-H. Cho, K.-J. Shin, Haplotypes and mutation analysis of 22 Y-chromosomal STRs in Korean father–son pairs, *Int. J. Legal Med.* 121 (2007) 128–135.

TABLE 1- Allelic and genotype (DYS385) frequencies and gene diversity (GD) values at PowerPlex®Y23 system loci in population sample from Southern Brazil (the six new loci of the kit are underlined and in grey box).

ALLELE	ALLELE LOCI														HAPLOTYPE								
	DYS576	DYS389 I	DYS448	DYS389 II	DYS19	DYS391	DYS481	DYS549	DYS533	DYS438	DYS437	DYS570	DYS635	DYS390	DYS439	DYS392	DYS643	DYS393	DYS458	DYS456	Y-H4	DYS358	
8																						9.16	0.0067
9		0.0067				0.0667		0.0400	0.0533								0.0800					10.15	0.0067
10		0.0067				0.5000	0.0267	0.0467	0.3267				0.0600			0.0133	0.4133					10.16	0.0067
11						0.4333	0.1467	0.2600	0.1533				0.3733			0.3867	0.1733					11.11	0.0133
12		0.1867					0.3933	0.5000	0.4533				0.4200			0.0933	0.2467	0.1067				11.12	0.0067
13		0.6600			0.1333		0.3467	0.1133	0.0133	0.0067			0.1333			0.4333	0.0533	0.6733	0.0067	0.0333		11.13	0.0400
14	0.0267	0.1400			0.5133		0.0733	0.0400		0.3867			0.0133			0.0667	0.0333	0.1667	0.0267	0.1133		11.14	0.2867
15	0.0533				0.2133		0.1330			0.4933	0.0067					0.0067		0.0400	0.1467	0.4067		11.15	0.0600
16	0.1467	0.0067			0.1000					0.1067	0.0867						0.0133	0.2200	0.2733		11.16	0.0267	
17	0.1867				0.0400					0.0067	0.3533	0.0067						0.3600	0.1400		11.17	0.0067	
18	0.3467	0.0667								0.2267								0.1400	0.0333		12.12	0.0133	
19	0.2067	0.4600								0.1400	0.0067							0.0333			12.14	0.0400	
19.2																					12.15	0.0267	
20	0.0333	0.2733				0.0067				0.0933	0.0733							0.0133			12.18	0.0067	
20.2																					13.13	0.0067	
21						0.1200				0.0600	0.2333	0.0867						0.0133			13.14	0.0600	
22						0.2933				0.0267	0.1200	0.1200						0.2200	0.2733		13.15	0.0333	
23						0.2533				0.0067	0.4800	0.2333						0.0067			13.16	0.0067	
24						0.0867				0.0867	0.0733	0.4800						0.0133			13.17	0.0133	
25						0.0867				0.0867	0.0067	0.0067						0.0133			13.18	0.0133	
26						0.0867				0.0867	0.0067	0.0067						0.0133			13.19	0.0133	
27						0.0400				0.0400	0.0267	0.0267						0.0133			14.14	0.0267	
28						0.0133				0.0133	0.1000	0.1000						0.0133			14.15	0.0600	
29						0.4667				0.4667	0.4667	0.4667						0.0133			14.16	0.0267	
30						0.2400				0.2400	0.2400	0.2400						0.0067			14.18	0.0067	
31						0.1067				0.1067	0.1067	0.1067						0.0067			15.14	0.0067	
32						0.0400				0.0400	0.0400	0.0400						0.0267			15.15	0.0267	
																		0.0267			15.16	0.0267	
																		0.0333			15.17	0.0333	
																		0.0067			15.18	0.0067	
																		0.0067			16.16	0.0067	
																		0.0200			16.17	0.0200	
																		0.0133			16.18	0.0133	
																		0.0067			16.19	0.0067	
																		0.0067			17.17	0.0067	
																		0.0133			17.18	0.0133	
																		0.0067			17.19	0.0067	
																		0.0067			17.21	0.0067	
																		0.0067			18.18	0.0067	
GD	0.7812	0.5132	0.6834	0.7054	0.6661	0.5615	0.8163	0.6844	0.6686	0.6657	0.5996	0.7888	0.6945	0.6915	0.6671	0.6537	0.7328	0.5091	0.7827	0.7301	0.6193	-	0.9009

TABLE 2- Proportion of overall averages of *de novo* mutations, repeat gains or losses, and other data comparing this and other studies.

Reference	Population	Y-STR Loci	Number of		Allele Transfers ^a	Number of		Overall Mutat.		Losses	
			Father-son pairs	Transfers ^a		Mutations ^b	Mutations ^b	Rate Average ^c	N	(%)	N
This work	Southern Brazil	23	150	3,450	13	3.77 x 10 ⁻³	5	8	(38.5)	8	(61.5)
This work	Southern Brazil	17	150	2,550	6	2.35 x 10 ⁻³	3	3	(50.0)	3	(50.0)
Laouina <i>et al.</i> , 2013	Morocco	17	252	4,284	15	3.50 x 10 ⁻³	9	6	(60.0)	6	(40.0)
Ge <i>et al.</i> , 2009	Texas ^d	17	2916	49,578	102	2.06 x 10 ⁻³	48	54	(47.1)	54	(52.9)
Farfán <i>et al.</i> , 2009	Spain	17	113	1,920	3	1.56 x 10 ⁻³	1	2	(33.3)	2	(66.7)
Vieira-Silva, <i>et al.</i> , 2009	Portugal	17	95	1,615	3	1.86 x 10 ⁻³	2	1	(66.7)	1	(33.3)
Goedbloed <i>et al.</i> , 2009	Germany, Poland	17	1752	29,792	84	2.82 x 10 ⁻³	43	41	(51.2)	41	(48.8)
Onofri <i>et al.</i> , 2009	Italy	17; 12	433 (291; 142)	6,651	20	2.95 x 10 ⁻³	12	8	(60.0)	8	(40.0)
Sánchez-Díaz <i>et al.</i> , 2008	Iberian ^e	17	701	11,917	26	2.81 x 10 ⁻³	14	12	(53.8)	12	(76.9)
Decker <i>et al.</i> , 2008	Fairfield ^f	17	389	6,613	24	3.63 x 10 ⁻³	13	11	(54.2)	11	(45.8)
Soares-Vieira <i>et al.</i> , 2008	Southwest Brazil	7	222	1,554	6	3.86 x 10 ⁻³	4	2	(66.7)	2	(33.3)
Padilla-Gutierrez <i>et al.</i> , 2008	Mexico	9	200	1,800	5	2.78 x 10 ⁻³	3	2	(60.0)	2	(40.0)
Caplinkiene <i>et al.</i> , 2007	Lithuania	17	130	2,210	8	3.62 x 10 ⁻³	4	4	(50.0)	4	(50.0)
Hohoff <i>et al.</i> , 2007	Germany	15	1,079	15,435	32	2.08 x 10 ⁻³	20	12	(62.5)	12	(37.5)
Domingues <i>et al.</i> , 2007	Southwest Brazil ^g	12	135	1,620	3	1.85 x 10 ⁻³	1	2	(33.3)	2	(66.7)
Lee <i>et al.</i> , 2007	Korean	22	369	8,118	34	4.19 x 10 ⁻³	16	18	(47.1)	18	(52.9)
Pontes <i>et al.</i> , 2006	Portugal	17	45	765	1	1.32 x 10 ⁻³	0	1	0	1	(100)
Gusmão <i>et al.</i> , 2005	Iberian ^h	17	1590	27,029	54	2.00 x 10 ⁻³	36	18	(66.7)	18	(33.3)
Budowle <i>et al.</i> , 2005	North America	13	692	8,996	13	1.57 x 10 ⁻³	8	5	(61.5)	5	(38.5)
Ballard <i>et al.</i> , 2005	Britain, Ireland	13	216	2,813	13	4.62 x 10 ⁻³	7	6	(53.8)	6	(46.2)
Kurihara <i>et al.</i> , 2004	Japan	14	12	161	5	3.11 x 10 ⁻²	4	1	(80.0)	1	(20.0)
Dupuy <i>et al.</i> , 2004	Norway	9	1766	15,894	36	2.26 x 10 ⁻³	24	12	(66.7)	12	(33.3)
Kayser <i>et al.</i> , 2000	Germany, Poland	15	333	4,999	14	2.80 x 10 ⁻³	10	4	(71.4)	4	(28.6)
Total			13,742	209,804	520	2.48 x 10⁻³	287	233	(55.2)	233	(44.8)

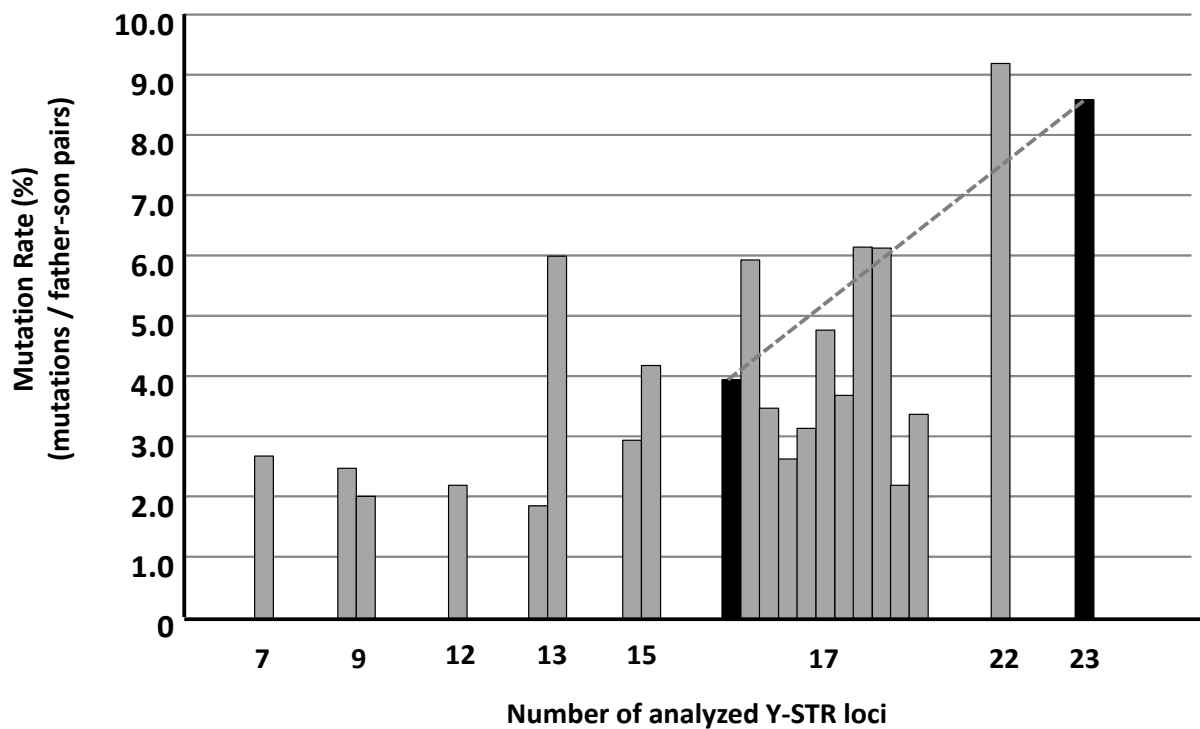


FIGURE 1- Proportion of mutation per meiosis (father to son transmission of the whole Y chromosome) calculated by the number of mutations within the whole Y chromosome divided by the number of the father-son pairs analyzed. Each bar correspond to one study according the number of Y-STR loci analyzed: 7: Soares-Vieira et al, 2008 (2.70%)[25]; 9: Padilla-Gutierrez et al, 2008 (2.50%) [26]; Dupuy et al, 2004 (2.04%) [11]; 12: Domingues et al, 2007 (2.22%) [27]; 13: Budowle et al, 2005 (1.88%) [21]; Ballard et al, 2005 (6.02%) [22]; 15: Hohoff et al, 2007 (2.97%) [28]; Kayser et al, 2000 (4.20%) [24]; 17: This work with 17 Y-STRs loci, in black bar (3.97%); Laouina et al, 2013 (5.95%) [14]; Ge et al, 2009 (3.50%) [10]; Farfán et al, 2009 (2.65%) [15]; Vieira-Silva, et al, 2009 (3.16%) [29]; Goedbloed et al, 2009 (4.79%) [13]; Sánchez-Diz et al, 2008 (3.71%) [17]; Decker et al, 2008 (6.17%) [19]; Caplinskiene et al, 2007 (6.15%) [18]; Pontes et al, 2006 (2.22%) [20]; Gusmão et al, 2005 (3.40%) [12]; 22: Lee et al, 2007 (9.21%) [30]; 23: This work with 23 Y-STRs loci, in black bar (8.61%). The studies of Kurihara et al (2004) [23] and Onofri et al (2009) [16], that they are in Table 2, are not in this graph.

TABLE 3- *De novo* mutations detected in father-son pairs, per locus, and combined paternity index (CPI) values for each sample pair using the 15 autosomal AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit STR loci genotyping results.

Locus	Case No.	Father	Son	CPI (F+S)	CPI (F+S+M)	Father Age (years)*
DYS576	3015	19	18	3.1×10^7	5.5×10^9	18
-	3420	20	19	8.0×10^5	2.5×10^8	25
-	3581	18	17	5.3×10^6	5.4×10^8	40
DYS481	2491	28	26	4.5×10^2	8.3×10^6	27
-	3045	22	23	8.2×10^5	1.5×10^8	40
DYS570	3211	18	19	4.5×10^5	1.0×10^8	36
-	3476	19	18	3.0×10^5	1.8×10^8	33
DYS390	2444	24	25	4.4×10^4	8.5×10^6	29
	3049	25	24	4.3×10^5	2.0×10^8	36
DYS458	3462	16	17	1.2×10^7	7.4×10^9	15
DYS385a/b	3186	15-15	15-14	5.6×10^4	7.4×10^7	19
	3244	11-14	11-15	2.0×10^6	1.4×10^{10}	21
DYS456	3001	15	14	1.5×10^5	8.2×10^7	23
			Average	4.1×10^6	2.2×10^9	27.85
			SD	8.7×10^6	4.3×10^9	8.21

F: father; S: son; M: mother; * Age of the fathers at the time of the son birth.

TABLE 4- Age of the fathers with or without Y-STR mutations at the time of the sons' birth.

Reference	Father age mean		P Value
	With mutation	Without mutation	
This work	27.9	29.0	NS
Kayser <i>et al.</i> , 2000	25.9	28.9	NS
Dupuy <i>et al.</i> , 2004	29.3	29.1	NS
Gusmão <i>et al.</i> , 2005	37.3	31.3	<0.001
Lee <i>et al.</i> , 2007	31.3	31.0	NS
Hohoff <i>et al.</i> , 2007	40.0	24.0	NS
Sánchez-Díaz <i>et al.</i> , 2008	31.8	31.6	NS
Goedbloed <i>et al.</i> , 2009	34.4	30.3	<0.001
Onofri <i>et al.</i> , 2009	33.2	35.7	NS
Farfán <i>et al.</i> , 2009	26.0	31.8	NC

NS: no statically significance; NC: no calculated.

CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A população avaliada para os fins deste estudo consiste em amostras de 150 pares de pai-filho, residentes no sul do Brasil, cuja paternidade fora confirmada previamente através de marcadores nos cromossomos autossômicos. Utilizando o painel comercial *PowerPlex® Y23 System (Promega Corporation)* - que é capaz de analisar variantes em 23 loci em uma única reação – foi possível avaliar a frequência alélica e genotípica desta população, bem como os parâmetros estatísticos forenses.

A genotipagem utilizando os 23 loci Y-STR resultou em uma grande capacidade de discriminação haplotípica (DC=100%) quando comparado com estudos previamente publicados na população do Rio Grande do Sul (RS) com 11 Y-STR (DC=84,0%) (Leite, 2008) e com 17 Y-STR (DC=96,9%) (Schwengber, 2009).

Nos 150 pares analisados foram observadas um total de 13 mutações em 3,450 transferências alélicas entre pai-filho, sendo a taxa total de mutação nos 23 Y-STR de $3,278 \times 10^{-3}$ (95% CI, $3,542 \times 10^{-3}$ para $3,944 \times 10^{-3}$). Essa taxa de mutação apresentou variação levando em consideração outros estudos que analisaram os marcadores Y-STR em outras populações (Kayser *et al.*, 2000; Dupuy *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2007; Vieira-Silva *et al.*, 2009; Laouina *et al.*, 2013), mas esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa observando a proporção geral de $2,432 \times 10^{-3}$ ($P = 0,116$). Para as amostras em que foram observadas mutações, utilizou-se o kit *Yfiler (Life Technologies)* para comprovar os resultados, tendo completa concordância entre todas as amostras analisadas para os 17 marcadores em comum nos dois kits.

Para os 23 loci Y-STR, observou-se um número considerado similar de ganhos (N=5) e perdas (N=8) de repetições nos filhos; que foram próximos às proporções globais de 55,2% de ganhos ($P = 0,225$) e 44,8% de perdas ($P = 0,350$). Variações entre ganhos e perdas entre diferentes estudos podem ser resultantes de diferentes tamanhos amostrais e/ou do número de loci analisados. Em relação à idade paterna no momento do nascimento do filho, nenhuma diferença significativa foi observada; um resultado similar foi obtido em um estudo com 1.766 pares pai-filho com nove loci Y-STR (Dupuy, 2004); entretanto há um contraste com outros trabalhos em que foram investigados, respectivamente, 3.026 e 1.730 pares de pai e filho para 17 Y-STR, nestes dois últimos estudos os autores concluíram que a taxa de mutação aumenta conforme a idade paterna.

As taxas de mutações observadas nos 23 loci Y-STR mostraram que em 16 loci não houve mutações, enquanto que a maior taxa de mutação foi observada no DYS576 (2×10^{-3}). Acredita-se que as taxas de mutação estejam relacionadas também com o tamanho do alelo, porém no presente estudo foi verificado que todas as mutações ocorreram em um alelo paterno de tamanho moderado.

Com a finalidade de prover informações confiáveis próprias da população do Rio Grande do Sul, relativas aos marcadores moleculares STR de cromossomo Y, os resultados deste estudo permitem a sua utilização para fins de emissão de laudos periciais, sejam eles criminais ou cíveis, bem como contribuir com o aprimoramento de banco de dados de Y-STR do Brasil e do mundo. As mutações nestes marcadores podem impactar estudos evolucionários e cálculos forenses de parentesco, desta maneira, o conhecimento sobre as taxas de mutação e o processo mutacional nos Y-STR é crucial para a correta interpretação dos perfis genéticos resultantes.

REFERÊNCIAS CITADAS NO TEXO

- Antonarakis SE, Cooper DN. Human Gene Mutation: Mechanisms and Consequences in M.R. Speicher *et al.* (eds.), Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010; 319-363.
- Ayub Q, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi SQ, Tyler-Smith C. Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(2): e8.
- Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, Choi Y, Duijn KV, Vermeulen M, Brauer S, Decorte R, Poetsch M, Wurmb-Schwark NV, Knijff P, Labuda D, Vézina H, Knoblauch H, Lessig R, Roewer L, Ploski R, Dobosz T, Henke L, Henke J, Furtado MR, Kayser M. Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molecular Bases, and Forensic Implications. *The Am J Hum Genet.* 2010; 87: 341–353.
- Ballantyne KN, van Oven M, Ralf A, Stoneking M, Mitchell RJ, van Oorschot RA, Kayser M. MtDNA SNP multiplexes for efficient inference of matrilineal genetic ancestry within Oceania. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(4):425-36.
- Carvalho M, Brito P, Lopes V, Andrade L, Anjos MJ, Real FC, Gusmão L. Analysis of paternal lineages in Brazilian and African populations. *Genet Mol Biol.* 2010; 33(3):422-7.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Hutz MH, Salzano FM, Pena SD. Divergent human Y-chromosome microsatellite evolution rates. *J Mol Evol.* 1999; 49(2): 204–214.
- Carvalho-Silva DR, Tarazona-Santos E, Rocha J, Pena SDJ, Santos FR. Y chromosome diversity in Brazilians: switching perspectives from slow to fast evolving markers. *Genetics.* 2006; 126: 251–260.
- Charlesworth B. The organization and evolution of the human Y chromosome. *Genome Biol.* 2003; 4(9): 226.
- Davis C, Ge J, Sprecher C, Chidambaram A, Thompson J, Ewing M, Fulmer P, Rabbach D, Storts D, Budowle B. Prototype PowerPlex(®) Y23 System: A concordance study. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; *In Press.*
- Knijff P, Kayser M, Caglià A, Corach D, *et al.* Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Legal Med.* 1997; 110(3): 134–149.
- Decker AE, Kline MC, Redman JW, Reid TM, Butler JM. Analysis of mutations in father–son pairs with 17 Y-STR loci. *Forensic Sci Int Genet.* 2008; 2(3): e31–e35.
- Diederich M, Martín P, Amorim A, Corte-Real F, Gusmão L. A case of double alleles at three Y-STR loci: forensic implications. *Int J Legal Med.* 2005; 119: 223–225.
- Domingues PM, Gusmão L, da Silva DA, Amorim A, Pereira RW, de Carvalho EF. Sub-Saharan Africa descendents in Rio de Janeiro (Brazil): population and mutational data for 12 Y-STR loci. *Int J Legal Med.* 2007; 121(3):238-41.
- Dupuy BM, Stenersen M, Egeland T, Olaisen B. Y-chromosomal microsatellite mutation rates: differences in mutation rate between and within loci. *Hum Mutat.* 2004; 23(2): 117-124.

- Farfán MJ, Prieto V. Mutations at 17 Y-STR loci in father–son pairs from Southern Spain. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 2: 425–426.
- Foster EA, Jobling MA, Taylor PG, Donnelly P, de Knijff P, Mieremet R, Zerjal T, Tyler-Smith C. Jefferson fathered slave's last child. *Nature.* 1998; 396(6706):27-8.
- Futuyma DJ. *Evolutionary Biology.* 3. ed. Sinauer, Sunderland, MA. 1998.
- Góis CC, Martins JA, Pereira GA, Freschi A, Paneto GG, Alvarenga VL, Cicarelli RM, Hirata MH, Oliveira RN. Genetic population data of 12 STR loci of the PowerPlex Y system in the state of São Paulo population (Southeast of Brazil). *Forensic Sci Int.* 2008; 174(1): 81–86.
- Grattapaglia D, Kalupniek S, Guimarães CS, Ribeiro MA, Diener PS, Soares CN. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *Forensic Sci Int.* 2005; 149(1):99-107.
- Gusmão L, Sánchez-Diz P, Calafell F, Martín P, Alonso CA, Alvarez-Fernández F, Alves C, Borjas-Fajardo L, Bozzo WR, Bravo ML, Builes JJ, Capilla J, Carvalho M, Castillo C, Catanesi CI, Corach D, Di Lonardo AM, Espinheira R, Fagundes de Carvalho E, Farfán MJ, Figueiredo HP, Gomes I, Lojo MM, Marino M, Pinheiro MF, Pontes ML, Prieto V, Ramos-Luis E, Riancho JA, Souza Góes AC, Santapa OA, Sumita DR, Vallejo G, Vidal Rioja L, Vide MC, Vieira da Silva CI, Whittle MR, Zabala W, Zarrabeitia MT, Alonso A, Carracedo A, Amorim A. Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites. *Hum Mutat.* 2005; 26(6): 520-528.
- Hammer MF. A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature.* 1995; 378(6555):376-378.
- Hanson EK, Ballantyne J. An ultra-high discrimination Y chromosome short tandem repeat multiplex DNA typing system. *PLoS One.* 2007; 2(8):e688.
- Haplotype Reference Database (YHRD). <http://www.yhrd.org/>. Acessado em 01 de outubro de 2012.
- Heyer E, Puymirat J, Dieltjes P, Bakker E, de Knijff P. Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(5):799-803.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. <http://www.ibge.gov.br> (Acesso em: setembro/2012).
- Inman K, Rudin N. The origin of evidence. *Forensic Sci Int.* 2002; 126(1): 11-16.
- Järve M, Zhivotovsky LA, Rootsi S, Help H, Rogaev EI, Khusnutdinova EK, Kivisild T, Sanchez JJ. Decreased rate of evolution in Y chromosome STR loci of increased size of the repeat unit. *PLoS One.* 2009; 4(9):e7276.
- Jeffreys AJ, Turner M, Debenham P. The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am J Hum Genet.* 1991; 48(5): 824-840.
- Jobling MA, Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 1995;11(11):449-456.
- Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(8): 598-612.

- Kayser M, de Knijff P, Dieltjes P, Krawczak M, Nagy M, Zerjal T, Pandya A, Tyler-Smith C, Roewer L. Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping. *Electrophoresis*. 1997; 18(9): 1602-1607.
- Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, Mehdi SQ, Rosser Z, Stoneking M, Jobling MA, Sajantila A, Tyler-Smith C. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am J Hum Genet*. 2004; 74(6): 1183–1197.
- Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, Kruger C, Krawczak M, Nagy M, Dobosz T, Szibor R, de Knijff P, Stoneking M, Sajantila A. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet*. 2000; 66: 1580–1588.
- Kayser M, Sajantila A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci Int*. 2001; 118: 116-121.
- Kayser M, Vermeulen M, Knoblauch H, Schuster H, Krawczak M, Roewer L. Relating two deep-rooted pedigrees from Central Germany by high-resolution Y-STR haplotyping. *Forensic Sci Int Genet*. 2007; 1(2):125-8.
- Kirby LT. Case applications. In: *DNA fingerprinting: an introduction*. New York: Oxford University Press. 1992; 217-260.
- Kong A, Barnard J, Gudbjartsson DF, Thorleifsson G, Jonsdottir G, Sigurdardottir S, Richardsson B, Jonsdottir J, Thorgeirsson T, Frigge ML, Lamb NE, Sherman S, Gulcher JR, Stefansson K. Recombination rate and reproductive success in humans. *Nat Genet*. 2004; 36(11):1203-6.
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WS, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*. 2012; 488(7412):471-475.
- Knijff P, Kayser M, Caglia A, Corach D, *et al*. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Legal Med*. 1997; 110(3): 134–149.
- Krenke BE, Viculis L, Richard ML, Prinz M, Milne SC, Ladd C, Gross AM, Gornall T, Frappier JR, Eisenberg AJ, Barna C, Aranda XG, Adamowicz MS, Budowle B. Validation of a male-specific, 12-locus fluorescent short tandem repeat (STR) multiplex. *Forensic Sci Int*. 2005; 151(1): 111-124.
- Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet*. 2001; 2(3): 207-216.
- Laouina A, Nadifi S, Boulouiz R, El Arji M, Talbi J, El Houate B, Yahia H, Chbel F. Mutation rate at 17 Y-STR loci in "Father/Son" pairs from moroccan population. *Leg Med (Tokyo)*. 2013; 15(5) 269-71.
- Leite FP, Callegari-Jacques SM, Carvalho BA, Kommers T, Matte CH, Raimann PE, Schwengber SP, Sortica VA, Tsuneto LT, Petzl-Elmer ML, Salzano FM, Hutz MH. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. *Am J Hum Biol*. 2008; 20: 359–363.

- Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(3):203-21.
- Magalhães IM, de Melo e Silva D. Informações Acerca de Marcadores Moleculares Uniparentais: DNA mitocondrial e Cromossomo Y. *Estud Biol.* 2006; 28(63): 81-88.
- Martin PD, Schmitter H, Schneider PM. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int.* 2001; 119(2): 225-231.
- Mayntz-Press KA, Sims LM, Hall A, Ballantyne J. Y-STR profiling in extended interval (> or = 3 days) postcoital cervicovaginal samples. *J Forensic Sci.* 2008; 53(2):342-8.
- Mulero JJ, Chang CW, Calandro LM, Green RL, Li Y, Johnson CL, Hennessy LK. Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. *J Forensic Sci.* 2006; 51(1): 64-75.
- Nunes AC, Silva DA, Teixeira MA, Nunes DD, Lopes CM, Netto OR, Gusmão L, Carvalho EF, Moura MM. Y chromosome comparative analysis of Rondônia with other Brazilian populations. *Leg Med (Tokyo).* 2011; 13(3):161-3.
- Palha TJ, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos A, Guerreiro JF, de Moura LS, Santos S. Male ancestry structure and interethnic admixture in African-descent communities from the Amazon as revealed by Y-chromosome Strs. *Am J Phys Anthropol.* 2011; 144(3): 471-478.
- Palha T, Gusmão L, Ribeiro-Rodrigues E, Guerreiro JF, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S. Disclosing the Genetic Structure of Brazil through Analysis of Male Lineages with Highly Discriminating Haplotypes. *PLoS One.* 2012; 7(7):e40007.
- Pascali VL, Dobosz M, Brinkmann B. Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts. *Int J Legal Med.* 1999; 112(1): 1.
- Pereira R, Monteiro E, Hirschfeld G, Wang A, Grattapaglia D. Haplotype diversity of 17 Y-chromosome STRs in Brazilians. *Forensic Sci Int.* 2007; 171: 226–236.
- Pontes L, Cainé LM, Abrantes D, Lima G, Pinheiro F. Genetic data of 11 Y-Chromosome STRs in males from a North of Portugal population. *J Forensic Sci.* 2005; 50: 950–954.
- Pontes ML, Cainé L, Abrantes D, Lima G, Pinheiro MF. Allele frequencies and population data for 17 Y-STR loci (AmpF ℓ STR[®] Y-filer[™]) in a Northern Portuguese population sample. *Forensic Sci Int.* 2007; 170: 62–67.
- Prinz M, Ishii A, Coleman A, Baum HJ, Shaler RC. Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. *Forensic Sci Int.* 2001;120(3):177-88.
- Quintana-Murci L, Krausz C, McElreavey K. The human Y chromosome: function, evolution and disease. *Forensic Sci Int.* 2001; 118(2-3): 169-181.
- Redd AJ, Agellon AB, Kearney VA, Contreras VA, Karafet T, Park H, de Knijff P, Butler JM, Hammer MF. Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome. *Forensic Sci Int.* 2002; 130(2-3):97-111.
- Ribeiro D. *O Povo Brasileiro: A Formação e o Sentido do Brasil.* Companhia das Letras, São Paulo. 1995; 480.

- Svidzinski AE, Maia FAS, Amaral MR, Arantes LC, Paula KAA (2012): Análise de marcadores de STRS do cromossomo X em teste de paternidade onde os supostos pais são indivíduos relacionados. Anais do IV Seminário de DNA Forense, Cuiabá, Brasil.
- Schneider PM. Basic issues in forensic DNA typing. *Forensic Sci Int.* 1997; 88(1): 17-22.
- Schlötterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(2):211-5.
- Schwengber SP, Kommers T, Matte CHF, Raimann PE, Carvalho BA, Leite FP, Medeiros MA, Souza LF, Castro CS, Chassot FG, Bonatto SL. Population data of 17 Y-STR loci from Rio Grande do Sul state (South Brazil). *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 4: e31-e33.
- Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(3):974-80.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003; 423(6942): 825-837.
- Tamaki K, Jeffreys AJ. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Leg Med.* 2005; 7(4): 244-250.
- Vieira-Silva C, Dario P, Ribeiro T, Lucas I, Geada H, Espinheira R. Y-STR mutational rates determination in South Portugal Caucasian population. *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series.* 2009; 2: 60–61.
- Wolfgramm EV, Silva BC, Aguiar VR, Malta FS, de Castro AM, Ferreira AC, Prezoti AN, de Paula F, Louro ID. Genetic analysis of 15 autosomal and 12 Y-STR loci in the Espírito Santo State population, Brazil. *Forensic Sci Int Genet.* 2011; 5(3):e41-3.
- Zhivotovsky LA, Underhill PA, Cinnioğlu C, Kayser M, Morar B, Kivisild T, Scozzari R, Cruciani F, Destro-Bisol G, Spedini G, Chambers GK, Herrera RJ, Yong KK, Gresham D, Tournev I, Feldman MW, Kalaydjieva L. The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(1): 50–61.

ADENDO

HAPLOTIPOS DOS FILHOS (em vermelho os lócus mutados)

Sample	DYS576	DYS389	DYS448	DYS389	DYS19	DYS391	DYS481	DYS549	DYS633	DYS438	DYS437	DYS570	DYS635	DYS390	DYS439	DYS392	DYS643	DYS393	DYS458	DYS385	DY385b	DYS456	FGATAH
2397F	16	13	24	23	15	10	21	12	10	10	15	20	21	21	11	11	12	16	18	13	15	18	11
2399F	18	13	19	28	14	11	22	14	12	12	15	16	23	24	12	13	10	13	13	11	16	16	11
2444F	18	10	19	26	14	11	23	13	12	12	15	17	23	26	12	14	10	13	18	12	14	16	12
2454F	16	13	20	30	14	10	26	12	11	10	16	19	22	22	11	11	11	12	13	15	13	14	11
2456F	18	13	19	28	14	11	22	12	12	12	15	18	23	24	12	13	10	14	17	11	15	16	12
2457F	16	12	21	28	14	10	23	12	11	10	16	19	22	22	13	11	12	13	15	13	14	15	11
2464F	16	13	21	29	14	9	22	12	12	12	14	22	24	23	11	11	10	12	14	13	16	16	12
2466F	19	14	20	31	16	10	23	11	13	10	15	17	21	23	12	12	12	15	17	15	16	13	11
2470F	17	13	19	30	14	11	23	13	13	12	15	17	23	24	12	13	9	14	16	11	14	15	13
2473F	16	13	19	30	14	10	25	13	12	9	14	17	21	23	12	13	10	13	18	14	16	15	11
2479F	15	13	20	31	15	11	29	11	11	14	19	21	21	23	12	13	11	14	16	15	17	15	12
2487F	18	13	20	29	16	11	26	11	14	10	15	20	21	23	11	12	12	14	15	14	15	16	11
2491F	18	14	20	30	13	9	26	11	11	10	14	22	22	24	10	11	12	13	18	13	14	16	12
2497F	20	13	20	29	14	10	24	12	11	14	17	23	24	24	12	14	10	13	15	13	14	15	11
2515F	18	14	22	30	16	10	22	12	12	10	15	17	22	23	12	11	11	13	19	12	14	12	12
2519F	18	13	19	29	14	11	22	12	12	12	14	17	23	24	12	13	9	13	17	11	14	14	12
3001F	18	13	19	29	14	10	22	13	13	12	14	17	23	24	12	13	10	13	17	11	14	16	13
3006F	18	12	21	28	15	11	22	11	9	10	16	19	21	22	13	12	11	14	16	15	15	17	12
3020F	14	13	21	29	15	10	21	11	10	10	16	19	21	23	11	12	12	13	18	15	15	15	11
3022F	14	12	21	29	16	11	21	12	9	10	16	17	20	22	11	11	11	13	16	14	14	15	12
3023F	14	13	19	30	16	11	23	13	12	9	13	18	21	23	11	13	10	13	15	15	15	14	11
3025F	18	13	18	29	15	11	23	13	11	12	15	21	23	24	12	11	9	13	17	11	11	16	11
3028F	16	14	19	31	14	10	22	12	12	12	15	17	23	25	12	14	12	13	17	11	14	16	13
3033F	18	14	19	32	15	10	26	12	12	10	14	19	21	23	12	12	13	14	16	13	14	16	12
3034F	17	13	21	29	14	10	26	12	11	10	15	21	22	22	11	11	12	13	15	13	15	14	11
3036F	15	13	21	29	13	10	23	12	12	10	14	18	21	24	12	11	13	13	15	15	17	12	12
3039F	18	13	20	28	16	11	23	11	12	10	15	20	21	22	13	11	10	13	17	11	12	15	12
3042F	19	13	20	29	15	10	22	12	12	12	15	18	23	24	12	13	10	13	17	11	14	16	13
3045F	15	13	20	30	15	10	26	11	12	11	14	18	24	24	12	11	12	14	21	14	16	15	10
3048F	18	14	19	30	14	11	23	14	14	12	15	17	23	24	12	13	11	14	16	17	14	18	13
3049F	19	14	21	30	13	9	26	11	12	10	14	22	21	24	10	12	13	17	19	14	15	15	12
3049F	18	13	20	31	17	11	23	12	11	14	19	23	24	24	11	11	10	13	14	12	14	15	13
3051F	17	13	19	29	14	11	22	13	12	15	17	24	24	24	12	13	11	14	15	16	18	16	11
3052F	17	13	19	29	14	11	22	13	12	12	15	17	24	24	11	13	10	15	18	12	15	16	12
3056F	19	13	18	28	14	10	22	14	12	12	15	18	23	24	12	13	10	13	17	11	14	16	13
3057F	19	13	18	28	14	11	22	13	12	12	15	18	23	23	13	13	10	13	18	11	14	16	13
3058F	18	13	20	29	14	11	22	12	12	12	15	17	23	24	13	13	10	13	17	11	14	15	10
3060F	20	13	19	30	15	10	22	14	12	12	15	18	23	24	13	13	10	13	17	11	14	16	13
3061F	18	13	19	29	14	10	22	14	12	12	15	18	23	24	11	13	10	13	14	16	16	15	12
3061F	18	13	19	29	14	10	22	14	12	13	15	20	23	25	11	13	10	12	16	11	14	16	13
3062F	18	13	20	31	16	10	25	11	11	11	14	19	21	21	12	11	14	15	16	18	18	16	11
3067F	18	13	19	29	14	11	22	13	12	12	15	17	23	24	11	13	10	15	18	12	15	16	12
3071F	17	13	20	31	15	10	25	10	12	11	14	19	23	24	12	13	11	13	14	17	15	15	11
3075F	16	13	21	29	17	10	24	11	11	14	17	21	21	21	12	11	12	14	16	17	18	15	11
3083F	17	13	21	30	13	10	21	12	11	10	14	17	20	23	11	11	15	14	16	17	17	16	11
3085F	17	13	19	29	14	11	22	13	12	12	15	17	24	25	14	13	10	12	14	16	16	16	12
3090F	16	13	21	29	15	9	22	14	12	9	14	18	21	23	11	11	10	12	14	13	17	15	12
3091F	17	12	19	28	14	11	23	13	13	9	16	17	21	24	11	9	12	16	18	14	14	11	11
3097F	19	14	19	30	14	11	22	13	12	12	15	17	23	24	12	13	10	13	17	11	14	16	11
3098F	16	13	19	29	16	11	24	13	12	12	14	16	23	23	13	13	10	13	17	11	14	15	12
3103F	17	14	21	31	14	10	26	13	13	12	14	18	21	23	14	11	9	12	18	13	19	15	12
3104F	18	13	19	29	14	11	24	12	13	12	15	17	23	24	12	13	10	12	16	11	15	17	12
3106F	17	13	19	29	14	10	22	12	11	10	14	18	20	23	11	11	9	12	20	13	19	15	11
3108F	18	13	19	31	14	10	24	12	11	11	15	19	23	24	13	11	12	13	17	15	16	15	11
3110F	19	14	20	31	14	11	22	13	12	12	15	17	23	24	13	11	13	18	17	15	16	16	11
3113F	18	13	19	29	14	11	22	12	12	12	15	16	23	24	12	13	10	13	16	11	14	15	11
3116F	19	13	19	30	14	11	22	12	13	12	15	17	24	25	13	13	10	13	13	11	13	16	11
3118F	20	13	18	30	13	10	22	12	12	10	14	19	22	23	12	11	12	13	16	17	21	17	12
3189F	16	13	18	29	13	10	21	13	12	12	14	17	23	24	13	13	10	13	16	12	14	15	11
3122F	16	13	19	29	14	11	21	12	13	12	15	17	21	24	12	13	10	13	16	12	14	15	11
3127F	17	13	21	28	17	10	23	10	12	10	15	20	22	23	12	11	12	13	18	12	14	17	12
3128F	15	13	21	28	15	10	29	11	11	14	20	21	21	21	12	10	14	14	17	15	18	15	12
3131F	19	14	19	30	14	11	22	12	12	12	15	17	23	24	12	13	10	13	18	11	15	15	12
3132F	17	13	20	30	15	11	24	11	13	10	14	20	21	24	11	12	12	13	17	11	17	15	11
3142F	19	13	18	29	15	10	24	14	11	9	16	17	21	24	13	11	11	12	17	15	17	13	11
3150F	18	12	20	29	14	10	25	12	11	11	14	16	22	23	12	14	10	13	15	13	19	15	12
3153F	18	13	19	29	14	11	22	12	12	12	15	17	23	24	11	13	10	13	16	11	14	15	12
3155F	19	12	21	29	16	10	25	11	12	10	15	18	20	23	10	12	12	14	17	12	14	13	12
3158F	19	13	19	29	13																		