UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MARIA LUISA DE BARROS RODRIGUES

PARÂMETROS POPULACIONAIS E FORENSES DE
POLIMORFISMOS *INDEL* E DETECÇÃO ALELO-
ESPECÍFICA

Ribeirão Preto

2018

MARIA LUISA DE BARROS RODRIGUES

PARÂMETROS POPULACIONAIS E FORENSES DE
POLIMORFISMOS *INDEL* E DETECÇÃO ALELO-
ESPECÍFICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Genética

Orientador:

Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rodrigues, Maria Luisa de Barros.

Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos *indel* e detecção alelo-específica. Ribeirão Preto, 2018.
71 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Simões, Aguinaldo Luiz.

1. *Indel*; 2. Parâmetros populacionais; 3. Parâmetros forenses; 4. *Primer* alelo-específico; 5. Mistura de DNA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigues, Maria Luisa de Barros.

Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos *indel* e detecção alelo-específica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Genética

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, por abrir as portas do Laboratório e da Pesquisa Científica. Agradeço por todas as conversas, trocas de experiências, por me instigar a buscar e criar conhecimentos, pela confiança e por extrair o meu melhor na execução desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório, Alice Norberto de Carvalho, Aline Silva Paula Brazorotto, Ana Lúcia Pimentel, Cláudia Emília Vieira Wiesel, Edna Maria Pereira, Fernanda Bueno Barbosa, Francisco César de Souza e Silva, Igor Caetano Dias Alcarás, Marcela Dambrowski dos Santos, Maria do Carmo Tomitão Canas, Sabrina Pereira Santos, Thaís Fenz Araujo e Vanessa Escolano Maso por todos os incentivos, conselhos e, principalmente, momentos de descontração e diversão, que trouxeram leveza à minha rotina.

Agradecimentos especiais à Aline, Ana Lúcia, Cláudia, Marcela e Maria, que contribuíram ativamente em meu projeto, seja com ideias, auxiliando em experimentos, tirando dúvidas e ensinando, ou me confortando. Agradeço ao carinho e prontidão para me ouvir e auxiliar. Mais uma vez à Maria, agradeço por me lembrar de respirar.

Outra vez ao Igor, pela companhia em viagens a congressos, por tudo que me ensinou, e principalmente pela confiança, por acompanhar minha trajetória e permitir que eu compartilhe o aprendizado de meu projeto, por me mandar mensagens de madrugada e em feriados para dar uma olhada nos primers.

À Ayling Martins Ng, por seu mestrado, cujos dados foram utilizados como ponto de partida em meu projeto. Novamente à Alice, por dar continuidade, em seu TCC, ao trabalho da Ayling, e por confiar em mim para auxiliá-la em seu projeto.

À Prof^a. Dra. Ana Lilia Alzate Marin, que disponibilizou o Laboratório para realização de parte dos meus experimentos, e às suas alunas e colegas de bloco Priscila Marlys Sá Rivas e Carolina Costa Silva pelo carinho e auxílio prestado; também pelas risadas e amizade nesses últimos meses de trabalho.

Aos demais colegas do bloco B, Ana Carolina Coelho, Elisabete Maria da Silveira Barreto Beira, Gabriella Macedo Mascarenhas Diniz, Jessica Luana Souza Cardoso, Rosana Márcia Silva Cruz, Wilson Lau Júnior. Agradeço em especial à Ana, Gabi e Jéssica, que, compartilhando o laboratório, estiveram presentes em muitos momentos, proporcionando muita troca de ideias e risadas.

À minha amiga Luana Bataglia, que me acompanha e compartilha as mesmas experiências e angústias desde o primeiro ano de graduação. Amiga que ouve desabafos, conforta e divide milk-shakes, que está sempre ali no bloco ao lado quando eu digo “miga, tô indo aí conversar”. Bem, uma margarita às nossas defesas de mestrado!

Aos meus pais Mônica Diniz de Barros Rodrigues e Marcelo Porto Rodrigues, à minha irmã Marina de Barros Rodrigues e ao meu cunhado Sidnei Rinaldo Priolo Filho, por me incentivarem a perseverar, pelos conselhos e ajuda nas tomadas de decisões; por estarem sempre presentes. Aos meus pais pelos abraços reconfortantes em momentos de dificuldades e pela disposição para ajudar na finalização deste trabalho. À minha irmã e ao meu cunhado pelo suporte e esclarecimento de dúvidas sobre conceitos médicos e sobre pós-graduação.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética, pela contribuição em meu aprendizado e trajetória acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Genética da FMRP, em especial à Susie Adriana Penha Nalon, pelo suporte administrativo.

Ao Programa de Excelência Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES/Proex) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo suporte financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	11
Indels.....	11
Misturas de <i>DNA</i>	13
Células residuais em pacientes de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	14
<i>DNA</i> fetal livre de células (<i>cell-free fetal DNA – cffDNA</i>)	15
JUSTIFICATIVA	18
HIPÓTESE	18
OBJETIVOS	19
Objetivos Gerais	19
Objetivos Específicos	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Desenho Experimental.....	20
Amostras Biológicas	20
Aspectos Éticos.....	20
Análise laboratorial.....	20
Seleção de <i>lôcus</i>	20
Desenho de <i>Primers</i>	21
Extração de <i>DNA</i>	23
Reação em Cadeia da Polimerase (<i>PCR</i>)	23
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	24
Análise Estatística.....	24
RESULTADOS	26
Seleção de <i>Lôcus</i>	26
Condições de Detecção	26
Determinação Fenotípica e Perfil dos <i>Lôcus</i>	27
Especificidade de <i>Primers</i>	29
Análises Estatísticas.....	30
Parâmetros Populacionais	30
Parâmetros Forenses	31
DISCUSSÃO	33
Especificidade de <i>Primers</i>	33
Análises Estatísticas.....	34
Parâmetros Populacionais	34
Parâmetros Forenses	36
CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	48
APÊNDICES	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Polimorfismo do tipo *indel* bialélico: caracterizado pela presença ou ausência de um ou mais pares de bases. A inserção está representada em azul (A). O ponto de inserção no alelo *deleção* está representado em verde (B). 11
- Figura 2. Esquema de pareamento de *primers*. Os *primers* *F* (*forward*) e *R* (*reverse*) são flaqueadores à região de inserção e amplificam ambos os alelos. Para amplificação específica do alelo *inserção* usam-se os pares de *primers* *F* e *R_i* ou *F_i* e *R* (A). Da mesma maneira, para amplificação específica do alelo *deleção* usam-se os pares de *primers* *F* e *R_d* ou *F_d* e *R* (B). Devemos notar que os *primers* *F_i* e *R_i* pareiam em regiões da inserção e os *primers* *F_d* e *R_d* pareiam em uma região que começa antes do ponto em que ocorre a inserção e esse pareamento termina em uma região após esse ponto de inserção, evitando assim o pareamento inespecífico no alelo *inserção*. 12
- Figura 3. Ciclagem de PCR utilizadas para amplificação com *primers* flaqueadores e alelo-específicos (A), cujas temperaturas de pareamento estão descritas na Tabela 5, e ciclagem para reações realizadas em multiplex (B). 24
- Figura 4. Visualização de padrão de bandas após amplificação com *primers* flaqueadores (A), inserção-específicos (B) e deleção-específicos (C). As amostras, para todos os loci, estão ordenadas por fenótipo *ii*, *id* e *dd* respectivamente. Em (B), não visualizamos a presença de bandas para indivíduos *dd*, assim como não vemos banda em indivíduos *ii* em (C). O marcador de 100 pares de bases está identificado por *M*. 28
- Figura 5. Visualização, em *PAGE*, de reações de *PCR* realizadas em Multiplex. As linhas horizontais delimitam cada locus do multiplex. No multiplex M2/L19/M17 visualizamos, na primeira amostra, um indivíduo triplo heterozigoto *id/id/id* (duas bandas por locus) e, na segunda amostra, um triplo homozigoto *ii/dd/ii* (uma amostra por locus); no M6/L8/M12 visualizamos primeiro um triplo heterozigoto *id/id/id* e depois uma amostra *id/ii/id*; e no M9/M1/M13/L22 visualizamos os perfis *dd/id/id/id* e *ii/ii/id/dd*. 28
- Figura 6. Amplificação com *primers* direcionados para o alelo *deleção* dos loci L8 e M9. Os fenótipos estão dispostos como *ii*, *id* e *dd*. Esses *primers* foram inespecíficos, assim podemos visualizar amplificação também em indivíduos *ii* (primeira amostra de cada locus). 30
- Figura 7. Pareamento inespecífico de *primers*. O pareamento de *primers* deleção-específicos (A) deveria amplificar somente o alelo deleção. O desenho incorreto pode ocasionar o pareamento da extremidade 3' do primer no alelo inserção (B) e permitir a amplificação mesmo sem pareamento da extremidade 5'. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locus selecionados, número de identificação (rs) no <i>dbSNP</i> , do NCBI, localização cromossômica dadas pelo programa In-Silico PCR (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr) e tamanho da sequência de inserção.....	21
Tabela 2. Sequências 5'-3' de <i>primers</i> flanqueadores (FL direto e reverso) e alelo-específicos (Ins e Del) para os locus selecionados. As sequências de primers flanqueadores e inserção-específicos para os locus L8, L19 e L22 provém da dissertação de Ng, 2015.....	22
Tabela 3. Tamanho, em pb, dos <i>amplicons</i> esperados para amplificação com <i>primers</i> flanqueadores (FL) e alelo-específicos (Ins e Del).....	22
Tabela 4. Quantidades, em μL , de <i>primers</i> (2,5 μM) e MgCl_2 (25 mM) utilizadas nas reações de PCR. Os <i>primers</i> flanqueadores estão indicados por FL _F /FL _R e os alelo-específicos por Ins _F /FL _R e Del _F /FL _R	23
Tabela 5. Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) de pareamento padronizadas para cada par de <i>primer</i> para amplificação em reação de PCR. Os <i>primers</i> flanqueadores estão indicados por FL _F /FL _R e os alelo-específicos por Ins _F /FL _R e Del _F /FL _R	24
Tabela 6. Análise de segregação. Número de cada tipo de trio mãe-filho-pai e X pai por locus. Não houve nenhuma exclusão. Em seis indivíduos não houve amplificação, não totalizando, portanto, 80 trios nos locus M6, M9, M17 e L17.	29
Tabela 7. Número de indivíduos observados e esperados, frequência alélica p_i para o alelo i , valor de p para Equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigose observada e esperada. Os parâmetros foram calculados pelo <i>software Genepop 4.7.0</i>	30
Tabela 8. Parâmetros forenses. Conteúdo de Informação do Polimorfismo (<i>PIC</i>), Poder de Exclusão (<i>PE</i>) e Poder de Discriminação (<i>PD</i>) calculados segundo equações constantes no ANEXO 6.	31
Tabela 9. Frequências do alelo <i>inserção</i> . Os dados das populações americanas (AMR), africanas (AFR), leste asiáticas (EAS), sul asiáticas (SAS) e europeias (EUR) foram obtidos no <i>dbSNP</i> , fornecidas pelo projeto <i>1000 Genomes</i> . A população do presente estudo está identificada por BSP.	35
Tabela 10. Estimativas de valores máximos, destacados abaixo, para H_{esp} , <i>PIC</i> , <i>PE</i> e <i>PD</i>	36
Tabela 11. Valores de <i>PIC</i> , <i>PE</i> e <i>PD</i> encontrados na literatura em diversos estudos populacionais.	38

RESUMO

Rodrigues, M. L. B. Parâmetros populacionais e forenses de polimorfismos *indel* e detecção alelo-específica. [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

Polimorfismos do tipo *indel* são os mais abundantes depois dos *SNPs*, representando 3,6 milhões das variantes caracterizadas pelo projeto *1000 Genomes*. Com uma distribuição que pode ser estimada em mais de um *indel* a cada 1000 pb, são facilmente encontrados em regiões de interesse. A baixa taxa de mutação e a possibilidade de desenhar *primers* alelo-específicos são as principais características dos *indels* que os diferenciam de *STRs*. O uso de *primers* alelo-específicos na detecção e dosagem de misturas de DNA apresenta maior sensibilidade e acurácia que as técnicas usualmente empregadas. Aqui foram descritos, para 10 loci *indel*, pares de *primers* flanqueadores e alelo-específicos para ambos os alelos (inserção e deleção) e foi realizado o estudo populacional em 160 indivíduos. A determinação de fenótipos e avaliação de especificidade dos *primers*, dos quais 28 foram específicos, foi realizada por *PCR* convencional seguida de *PAGE*. As análises populacionais e forenses mostraram que esses loci apresentam alta variabilidade (heterozigose de 30-50%) e consequentemente, alta informatividade. Os valores de *PIC*, *PE* e *PD* variaram de 0,2763 a 0,3750; 0,1381 a 0,1875 e 0,4978 a 0,6250 respectivamente. Os valores cumulativos de *PCE* e *PCD* foram respectivamente 0,8508 e 0,9999. Assim, esse conjunto de *indels* é indicado para serem testados na detecção e quantificação de misturas de DNA a partir da amplificação alelo-específica.

Palavras-chave: *Indel*; parâmetros populacionais; parâmetros forenses; *primer* alelo-específico; mistura de DNA.

ABSTRACT

Rodrigues, M. L. B. Population and forensic parameters of indel polymorphisms and allele-specific detection. [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School; 2018.

Indels polymorphisms are the most abundant after SNPs, representing 3.6 million of the variants characterized by the 1000 Genomes project. With a distribution that can be estimated at more than one indel per 1000 bp, they are easily found in regions of interest. The low mutation rate and the possibility of designing allele-specific primers are the main characteristics of the indels that differentiate them from STRs. The use of allele-specific primers in the detection and dosage of DNA mixtures is more sensitive and accurate than regularly employed techniques. Here, for 10 indel loci, pairs of flanking primers and allele-specific primers, for both alleles (insertion and deletion), were described and a population study was performed on 160 individuals. Determining phenotypes and evaluation of primers specificity, of which 28 were specific, was performed by conventional PCR followed by PAGE. In population and forensic analysis, these loci showed high variability (heterozygosity of 30-50%) and consequently high informativeness. The values of PIC, PE and PD ranged from 0.2763 to 0.3750, 0.1381 to 0.1875 and 0.49978 to 0.6250 respectively. Combined values of PCE and PCD were respectively 0.8508 and 0.9999. Thus, this set of indels is indicated to be tested for detection and quantification of DNA mixtures using the allele-specific amplification method.

Keywords: Indel; population parameters; forensic parameters; allele-specific primers; DNA mixture.

INTRODUÇÃO

Indels

Polimorfismos do tipo *indel* são resultado da inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos na sequência de *DNA* (Francez et al., 2012b). Muitos desses loci são bialélicos, apresentando somente o alelo *inserção* e/ou alelo *deleção* (Figura 1), sendo possível, portanto, apenas três genótipos: heterozigotos (*id*) e homozigotos para inserção (*ii*) ou para deleção (*dd*).

Figura 1. Polimorfismo do tipo *indel* bialélico: caracterizado pela presença ou ausência de um ou mais pares de bases. A inserção está representada em azul (A). O ponto de inserção no alelo *deleção* está representado em verde (B).

Os *indels* são os polimorfismos mais abundantes depois dos *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*) e, segundo publicação do *Projeto 1000 Genomes*, 2015 (Consortium, 2015), dentre as aproximadamente 88 milhões de variantes caracterizadas, 84,7 milhões são *SNPs*, 3,6 milhões são pequenos *indels* e 60 mil são variantes estruturais. Estudos de Mills et al. (2011), estimou a distribuição de 1 *indel* a cada 1500 pb de *DNA*, valores que tornaram obsoleta sua própria estimativa anterior em Mills et al. (2006) de 1 *indel* a cada 7200 pb. Comparando seus dados com os do *Projeto 1000 Genomes* 2010 (Consortium, 2010), Mills et al. (2011) sugeriram que a descoberta dos *indels* era ainda incompleta. A partir de dados mais recentes do *Projeto 1000 Genomes* 2015 (Consortium, 2015), estima-se a distribuição de *indels* em aproximadamente a um *indel* a cada 1000 pb.

Um conjunto de características tornam a análise de loci *indels* uma alternativa viável aos marcadores genéticos que são mais amplamente utilizados, tais como: (a) também estão distribuídos por todo o genoma humano, incluindo os cromossomos sexuais (Mills et al., 2006), sendo habitualmente encontrados em regiões de interesse; (b) apresentam taxa de mutação muito mais baixa, $9,29 \times 10^{-10}$ por geração (Besenbacher et al., 2016), quando comparados a

STRs (*Short Tandem Repeat*), entre $6,6 \times 10^{-4}$ e $2,6 \times 10^{-3}$ por geração (Martinez et al., 2017), e até mesmo a *SNVs* (*Single Nucleotide Variation*), $1,29 \times 10^{-8}$ por geração (Besenbacher et al., 2016), o que reduz a probabilidade de se lidar com mutações *de novo*; (c) podem ter frequências alélicas significativamente diferentes entre regiões geográficas, podendo ser utilizados como marcadores informativos de ancestralidade (*AIM – Ancestral Informative Markers*) (Romanini et al., 2015, Weber et al., 2002); (d) sua análise pode ser realizada por meio de uma *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) simples seguida de eletroforese em gel (Weber et al., 2002) e (e) pequenos *indels* podem ser genotipados em pequenos *amplicons*, aumentando o sucesso nas análises de *DNA* degradado (Romanini et al., 2015).

Um diferencial dos *indels* frente aos amplamente utilizados *STRs*, é a possibilidade de desenhar *primers* alelo-específicos (Figura 2).

Figura 2. Esquema de pareamento de *primers*. Os *primers* *F* (*forward*) e *R* (*reverse*) são flancos à região de inserção e amplificam ambos os alelos. Para amplificação específica do alelo *inserção* usam-se os pares de *primers* *F* e *R_i* ou *F_i* e *R* (A). Da mesma maneira, para amplificação específica do alelo *deleção* usam-se os pares de *primers* *F* e *R_d* ou *F_d* e *R* (B). Devemos notar que os *primers* *F_i* e *R_i* pareiam em regiões da inserção e os *primers* *F_d* e *R_d* pareiam em uma região que começa antes do ponto em que ocorre a inserção e esse pareamento termina em uma região após esse ponto de inserção, evitando assim o pareamento inespecífico no alelo *inserção*.

Esses *primers*, como descrito por Liu et al. (2017), devem incluir a sequência de inserção ou, para o alelo *deleção*, a sequência de inserção deve ser excluída, passando de 2 a 10 nucleotídeos adiante na extremidade 3' do *primer*. Liu et al. (2017) utilizaram esse método de detecção alelo-específica para identificação de misturas desbalanceadas de *DNA*.

Misturas de DNA

A análise de mistura de *DNA* é necessária em diversas situações tais como análise de *cffDNA* (*cell-free fetal DNA*), análise de quimerismo em pacientes submetidos a transplantes de células-tronco hematopoiéticas e análises forenses. Nessas situações, mais de um indivíduo contribui com material genético em uma mesma amostra.

Para detecção dos perfis genéticos presente em uma mistura, geralmente identificam-se dois contribuintes, sendo um dos perfis já conhecido e o outro sendo inferido como do segundo indivíduo (Clayton et al., 1998). A identificação dos diferentes perfis é realizada de maneira laboriosa, atentando-se à quantidade de picos detectados em uma Eletroforese Capilar (*CE - Capillary Electrophoresis*) e à altura de cada um desses picos, evidenciando-se a presença, em proporções distintas, de mais alelos na amostra do que um único indivíduo poderia apresentar. É necessário ainda interpretar se a presença de picos mais baixos é devido a artefatos que produziram picos espúrios ou se correspondem ao perfil de um outro contribuidor. Subsequentemente, uma série de análises estatísticas são realizadas, tais como *Combined Probability of Inclusion e Exclusion (CPI/CPE)*, que se refere à proporção de uma dada população que poderá ser incluída ou excluída, respectivamente, como potencial contribuidor em uma mistura de *DNA* (Bieber et al., 2016).

Essas análises tornam-se ainda mais desafiadoras quanto trata-se de *DNA* degradado e a *CE* não tem sensibilidade o suficiente para detectar o *DNA* que esteja em proporções inferiores a 1:10 na mistura (Isaacson et al., 2015). Como alternativa, podem ser utilizadas técnicas mais elaboradas como *microarrays* de *SNPs* (Homer et al., 2008) e Sequenciamento de Nova Geração (*NGS - Next Generation Sequencing*) de *STRs*, sendo esse mais sensível em comparação à *CE*, havendo menor perda de alelos devido à degradação da amostra (Kim et al., 2016).

Tratando-se de amostras de misturas altamente desbalanceadas, utilizando um painel de *Massively Parallel Sequencing (MPS)* de *SNPs* e *indels* foi possível a identificação de perfis presentes em menos de 1% na mistura. Entretanto, apesar da sensibilidade da técnica, ainda

ocorreram tanto a perda de alelos do contribuidor minoritário como a presença de alelos espúrios por eventos estocásticos da *PCR* de *DNA* altamente degradado (Hwa et al., 2018).

O uso de *primers* alelo-específicos de *indels* para estudar misturas de *DNA* tem se mostrado muito mais sensível, detectando misturas não balanceadas em proporções de até 1:1000, quando comparados a métodos de detecção de *STRs* ou *NGS* de *SNPs*; além de ser mais simples, pode-se utilizar um conjunto maior de loci *indels* para compensar sua menor variabilidade com relação aos *STRs*. A detecção ocorre quando os contribuidores da mistura são homozigotos opostos ou quando o contribuidor majoritário é homozigoto e o minoritário é heterozigoto. O método pode ser utilizado somente em casos de mistura de dois *DNA*s, mas é muito efetivo em situações forenses para exclusão de suspeitos (Liu et al., 2017).

Células residuais em pacientes de transplante de células tronco hematopoiéticas

Receptores de aloenxertos apresentam perfil quimérico após o transplante de células-tronco hematopoiéticas (*Hematopoietic Stem Cell Transplantation – HSCT*), sendo classificado como quimerismo completo quando, após o enxerto, todas as células são de origem do doador, ou quimerismo misto se coexistirem células do doador e do hospedeiro. A análise desse quimerismo tem consequências importantes para avaliar a evolução do paciente e sua resposta a intervenções terapêuticas, bem como rejeição ao enxerto, recidiva da doença e doença do enxerto contra o hospedeiro (Santurtún et al., 2017).

Diversos métodos são utilizados para analisar as proporções de quimerismo após *HSCT*. Os exames são baseados em regiões polimórficas do *DNA* que forem diferentes entre o hospedeiro e doador. Esses marcadores serão informativos quando estiverem presentes em um indivíduo e ausentes no outro (Kim et al., 2014).

Usualmente, a quantificação é por análise de *STRs* por *PCR* seguida de *CE*. A sensibilidade do método detecta o minoritário em aproximadamente 3% a 5% (Kreyenberg et al., 2003, Thiede et al., 2004). Outras técnicas utilizadas são *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)* e *PCR* de *VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)*, com sensibilidade de 0,6% e 5% respectivamente (Lamba et al., 2004), ou ainda técnicas mais laboriosas como *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)* de leucócitos ou *Magnet Activated Cell Sorting (MACS)* (Bornhäuser et al., 2009).

A aplicação de *primers* alelo-específicos para loci *indel* surge então como alternativa para apurar análises quantitativas do quimerismo pós *HSCT*. O uso de *qPCR (Quantitative*

Polymerase Chain Reaction) de *indel*, em situações com baixa quantidade de *DNA*, mostrou maior sensibilidade se comparada à *PCR* de *STRs*, detectando quimerismo em menos de 1%, o que implica em indícios antecipados de recidiva da doença ou falha no enxerto e assim providencia melhores opções de tratamento para o paciente (Bach et al., 2015). Um conjunto de lócus *indel* para determinar quimerismo pós-transplante pode apresentar resultados similares aos de análise de *STRs*, além de que *indels* podem providenciar informações adicionais nos casos em que *STRs* apresentam problemas de sensibilidade, como quando há um componente quimérico em menor proporção (Santurtún et al., 2014). Além disso, um único *indel* informativo amplificado por *ddPCR* (*Droplet Digital PCR*) apresenta sensibilidade para detecção do componente minoritário em proporções de 0,5%, técnica que apresentou os mesmos resultados de um conjunto de *indels* ou *STRs* analisados por *PCR* convencional (Santurtún et al., 2017).

DNA fetal livre de células (cell-free fetal DNA – cffDNA)

Células fetais presentes no sangue periférico materno foram descritos pela primeira vez por Walknowska et al. (1969). O que ocorre é a migração transplacentária de células, já que a circulação sanguínea materna e fetal se separam apenas pela membrana placentária, que pode ser extremamente fina (menos de 2 micrômetros) (Jones and Fox, 1991). Embora já tenham sido encontrados diferentes tipos celulares fetais na circulação materna, os trofoblastos são encontrados mais abundantemente (Alberry et al., 2007). O *cffDNA* é liberado após apoptose dessas células devido ao envelhecimento celular normal, além de quebras acidentais e necrose (Kimura et al., 2011).

Com a detecção do *cffDNA* no sangue periférico materno, surgiram novas perspectivas para o desenvolvimento de técnicas moleculares para diagnóstico pré-natal não invasivo (*NIPD – Non-Invasive Prenatal Diagnosis*) (Lo et al., 1997). Desse modo evitam-se riscos associados aos diagnósticos realizados por técnicas invasivas como amniocentese (coleta de líquido amniótico) e amostragem de vilosidade coriônica, tais como amniotite, perda de líquido amniótico, deformidades nos membros do feto, infecção materna, aborto (Brambati et al., 1992, Seeds, 2004, Simpson, 2012).

O *NIPD* apresenta diversas aplicações como paternidade pré-natal não invasiva (Whittle et al., 2017), determinação de sexo, (Khorshid et al., 2013), predição de doenças genéticas no início da gestação, dentre elas Distrofia Muscular de *Duchenne* (DMD) (Yoo et al., 2015), *Huntington*

(Bustamante-Aragones et al., 2008), acondroplasia (Chitty et al., 2011), β -talassemia (Xiong et al., 2018), hemofilia (Tsui et al., 2011), surdez congênita (Meng et al., 2014), hiperplasia adrenal congênita (New et al., 2014), aneoploidias como trissomia dos cromossomos 21, 13, e 18 (Zhang et al., 2015), incompatibilidade de fator RhD (Lo et al., 1998a).

Essas análises são muito desafiadoras, uma vez que a concentração de *cffDNA* no plasma pode variar em valores extremamente baixos, como 0,39% a 11,9% (Lo et al., 1998b). Além das dificuldades já mencionadas para detecção e diagnóstico em misturas de DNA a partir de *SNPs* e *STRs*, o feto compartilha metade do genoma materno (Wright and Burton, 2008), o que restringe o diagnóstico fetal a sequências de origens paterna que sejam distintas da materna. Assim, muitos diagnósticos são realizados buscando alelos fetais ausentes na mãe, como na determinação de sexo fetal quando há risco de doenças genéticas ligadas ao sexo (Hill et al., 2011), diagnóstico de doenças monogênicas dominantes quando o pai é portador da mutação (Bustamante-Aragones et al., 2008) e doenças autossômicas causadas por uma mutação *de novo* (Chitty et al., 2011).

Uma aplicação importante decorrente da avaliação quantitativa do *cffDNA* no plasma materno é o *NIPD* quando há riscos de alterações da interface materno-fetal, como pré-eclâmpsia (Sifakis et al., 2015). Nesses casos, o nível de *cffDNA* no plasma materno é elevado antes mesmo do aparecimento de sintomas clínicos e tem associação com a severidade da doença, podendo servir como um marcador do quadro clínico. Mais além, um teste não invasivo, que pode ser realizado logo no início da gestação, traz grande contribuição para a tomada de tratamentos preventivos antecipados, diminuindo morbidade e mortalidade materna e fetal (Martin et al., 2014). Esse aumento na proporção de *cffDNA* também ocorre em gestações trissômicas, já que há a presença de cromossomo a mais contribuindo para isso (Nicolaidis et al., 2013), e em gestações em que há restrição de crescimento intrauterino (*Intrauterine growth restriction – IUGR*) (Alberry et al., 2009).

Para identificação do *DNA* fetal a partir de sequências autossômicas sem a interferência do abundante *DNA* materno, faz-se necessário o uso de *primers* específicos a sequências exclusivamente fetais. Essa técnica foi demonstrada por Santos (2014), que detectou *DNA* fetal autossômico por *qPCR* mediante a utilização de marcadores *indel* e *primers* complementares às sequências dos alelos inserção. Neste método, quando a mãe for homozigota *dd* e o pai for heterozigoto *id* ou homozigoto *ii*, se o feto for *id*, recebendo o alelo *inserção* do pai, um *primer* dirigido à inserção é específico para o *DNA* fetal. Analogamente, com o uso de *primer*

específico para o alelo *deleção*, quando a mãe for homozigota *ii* e o pai for heterozigoto *id* ou homozigoto *dd*, se o feto for *id*, recebendo o alelo *deleção* do pai, um *primer* dirigido à *deleção* será específico para o *DNA* fetal. Como consequência da amplificação alelo-específica, também é possível a dosagem de uma linhagem específica do *DNA* em menor concentração na presença de outro *DNA* em concentração abundante. Brazorotto (2017) também utilizou *primers* específicos ao alelo *inserção* de marcadores *indels* autossômicos e mostrou um método simples e preciso para quantificação do *cffDNA*, por *qPCR*, apesar da quantidade massiva de *DNA* genômico materno.

JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, fica demonstrada a necessidade de se obter um conjunto de loci *indels* que possam ser aplicados na detecção e dosagem de mistura de *DNA* a partir da amplificação com *primers* alelo-específicos.

As frequências alélicas dos loci são importantes para averiguar se esses são informativos, pois se as frequências não forem bem distribuídas, a possibilidade de um marcador ser informativo é reduzida (Liu et al., 2017). Portanto, é indispensável a descrição formal (definição de fenótipos, condições laboratoriais de detecção/diagnóstico, estimativa de frequências alélicas e outros parâmetros populacionais e forenses) para precisar quais loci são informativos o suficiente na obtenção de bons resultados, principalmente em análises de mistura de *DNA*.

HIPÓTESE

Neste trabalho são descritas as condições laboratoriais para análise de um conjunto de dez loci do tipo *indel* por *PCR*, com *primers* flanqueadores e alelo-específicos e bem como são estimadas as estatísticas populacionais e forenses correspondentes em uma amostra de população urbana brasileira.

Desta forma, as hipóteses deste trabalho são de que os *primers* desenhados para pareamento com as sequências relativas à *inserção* ou *deleção* são alelo-específicos e que as frequências alélicas e demais parâmetros são informativos na população avaliada.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Realizar estudo populacional para dez loci autossômicos bialélicos do tipo *indel* e padronizar *primers* flanqueadores e alelo-específicos, possibilitando o uso posterior desses *primers* em situações nas quais existam mistura de *DNA* de dois indivíduos distintos.

Objetivos Específicos

Pretende-se, portanto, para cada um dos dez loci:

1. Selecionar dez loci *indels* informativos.
2. Desenhar *primers* flanqueadores e específicos a cada alelo (inserção ou deleção).
3. Padronizar reações de *PCR* para cada tipo de *primers*.
4. Testar a possibilidade de reações de *PCR* multiplex (dois ou mais pares de *primers* em uma mesma reação).
5. Determinar os fenótipos em 80 trios mãe-filho-pai.
6. Verificar a segregação dos alelos parentais nos 80 trios mãe-filho-pai.
7. Estimar as frequências alélicas e fenotípicas correspondentes.
8. Estimar parâmetros populacionais de interesse forense.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho Experimental

Foram selecionados dez *locus indel*, dos quais três *locus* foram previamente estudados no projeto denominado “*Validação de marcadores inserção/deleção para genotipagem fetal não invasiva*” (Ng, 2015). Os demais sete *locus* foram selecionados a partir do banco de dados do NCBI (*dbSNP*) segundo critérios listados no item *Seleção de Locus*.

Primers flanqueadores e alelo-específicos, aqueles que pareiam em sequências específicas dos alelos *inserção* ou *deleção*, foram desenhados. As condições de *PCR* e detecção por eletroforese em gel poliacrilamida (*PAGE*) foram determinadas. Por fim, os 10 *locus* foram fenotipados em 80 trios (mãe-filho-pai) e foram realizadas análises populacionais e forenses.

Amostras Biológicas

Os 80 trios (mãe-filho-pai) foram selecionados a partir de casos que tiveram a paternidade confirmada por testes de rotina do Serviço de Investigação de Paternidade do HCFMRP-USP, vinculado ao Departamento de Genética da FMRP-USP. As amostras coletadas para investigação de paternidade nos anos de 2003 e 2004 foram inseridas no banco de amostras *Populações Urbanas* para fins de pesquisa.

Aspectos Éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP no processo HCRP nº 14090/2016 (ANEXO 1) com dispensa do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

Análise laboratorial

Seleção de Locus

Os três *locus* provenientes do projeto de Ng (2015) haviam sido estudados somente com *primers* flanqueadores, mas haviam sido desenhados *primers* *inserção*-específicos. Por atenderem aos critérios de seleção listados a seguir, foram mantidos no presente projeto para serem as

realizadas as respectivas análises com *primers* alelo-específicos, sendo os *primers* deleção-específicos desenhados neste trabalho.

Para seleção dos demais lócus, inicialmente foram elaboradas, a partir do Banco de Dados *dbSNP*, do *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), listas de lócus *indel* com heterozigose entre 30% a 50% e que foram validados pelo projeto *1000 Genomes* (Consortium, 2015). Dentre esses, foram selecionados sete lócus de acordo com os critérios seguintes: (a) lócus bialélicos; (b) tamanho mínimo da sequência de inserção de 20 pb; (c) lócus em que foi possível o desenho de *primers* flanqueadores e alelo-específicos; e (d) lócus localizados em cromossomos distintos. Na Tabela 1 estão descritos os dez lócus utilizados neste trabalho.

Tabela 1. Lócus selecionados, número de identificação (rs) no *dbSNP*, do *NCBI*, localização cromossômica dadas pelo programa In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) e tamanho da sequência de inserção.

Lócus	Rs	Localização Cromossômica	Tamanho Inserção (pb)
M1	rs138730495	Chr1 (q23.3)	26
M2	rs111797680	Chr2 (p25.2)	24
M6	rs66501513	Chr6 (q27)	30
L8	rs1305049	Chr8 (q24.21)	29
M9	rs150976846	Chr9 (q22.2)	24
M12	rs143237331	Chr12 (q21.31)	30
M13	rs67616458	Chr13 (q14.11)	27
M17	rs72083748	Chr17 (q24.3)	26
L19	rs148112183	Chr19 (p13.3)	26
L22	rs67519581	Chr22 (q12.2)	32

Desenho de *Primers*

Os *primers* foram desenhados com auxílio do *software GeneRunner* (<http://www.generunner.net/>) (Tabela 2); Na tabela 3 estão listados o tamanho dos fragmentos gerados após amplificação. As temperaturas de pareamento dos pares de *primers* foram verificados pelo *software online In-Silico PCR* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

Tabela 2. Sequências 5'-3' de *primers* flanqueadores (FL direto e reverso) e alelo-específicos (Ins e Del) para os loci selecionados. As sequências de primers flanqueadores e inserção-específicos para os loci L8, L19 e L22 provém da dissertação de Ng, 2015.

Locus	Primer FL Direto	Primer Ins Direto	Primer Del Direto	Primer FL Reverso
M1	GAACAGGCATG GATGCTCA	TGACCCAATCAC ACACTAAGG	TGACAGGTGAG GTTAAGCTGG	AGCTTGGGCGAC AAAGTGA
M2	AGGATTGACTCT TCTGATCAG	TTAGAGAACAG AAGAGGCAGG	AGAGCAATGCCT AGTCCGC	ATCACTGTTGTT AGGACGCA
M6	GAATGGCTTGAA CCTGGGA	ACTCCAGTCTGG CAACAGAGA	GCGATGGTGCCA CTGTAAAA	AGGACTGCGTAG TTTTGAGC
L8	TTTAGACCAAGG CTCAAGG	CTTTCCTAGAAC TCTGCCCT	CTGGATAATACA TGTTAGTTCC	CTGGAGCACATT CTGAACC
M9	GCTGGTCATAGT ATTTCGTGC	GAGAATTAACCT GAGGCCAGG	GGGAGGTCCAG GTGTTCAA	ATTCCCAGGCTG AAGTGAT
M12	GGTATCCCATCT TCAAAAGG	CTCCCCCAGTCT ATTCCAA	TCTGAGCTGCTG CTTCTCTG	CATAACCATGGG ATCCACTAGT
M13	CCTTTGGAGTCA ATGCTTG	AGAACAGTGGG ACCTTTTG	CTAAGCTCTGCC CCTTTATT	AAGACTGATGA GAAGGAGGAG
M17	CCATTTCTCAGT GTTGCTTG	ATTGCACATCAC ACATACCC	TTCAGGGTGCAA TGCTGTT	CCATCGAAGCAT CAGGAGA
L19	CCTCTCTGCTGT GTGGACTT	TCTCCCTGTCCG CACTGAT	TGGAATCAGTTC CCCGCT	CTGGACCTCACT CTCCTCAC
L22	GTGAGTGAGGG GACAGTCGT	TGGCCTGATAAC AGGGTAAGA	AGTCGTGTTGAG TGCCCTC	TGCAGGCCTGAC ATAGACC

Tabela 3. Tamanho, em pb, dos *amplicons* esperados para amplificação com *primers* flanqueadores (FL) e alelo-específicos (Ins e Del).

Locus	Tamanho do Amplicon (pb)			
	Primer FL		Primer Ins	Primer Del
	Alelo inserção	Alelo deleção		
M1	194	168	106	100
M2	234	210	197	189
M6	245	215	190	176
L8	188	159	137	124
M9	244	220	192	183
M12	130	100	79	75
M13	149	122	102	94
M17	127	101	67	60
L19	171	145	80	73
L22	103	71	73	57

Extração de DNA

As amostras de DNA pertencentes ao banco de amostras *Populações Urbanas* foram previamente extraídas, a partir de amostras de sangue ou *swab* bucal, pelo Serviço de Investigação de Paternidade do HCFMRP-USP, segundo protocolo adaptado do método descrito por Higuchi (1989) e encontram-se estocadas à temperatura de -20°C (ANEXO 2). Para as amostras em que houve necessidade de nova extração, utilizou-se a mesma metodologia.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os ensaios de padronização da amplificação dos loci *indel* por PCR foram realizados no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Os reagentes e procedimento estão descritos no protocolo do Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) (ANEXO 3). As quantidades de *primer* e cloreto de magnésio utilizadas estão relatadas na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidades, em μL , de *primers* (2,5 μM) e MgCl_2 (25 mM) utilizadas nas reações de PCR. Os *primers* flanqueadores estão indicados por FL_F/FL_R e os alelo-específicos por Ins_F/FL_R e Del_F/FL_R.

Reagente	Locus									
	M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
Primer FL_F/FL_R	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1,00	0,75	0,75
MgCl₂	1,00	1,00	0,75	1,00	0,75	0,90	0,75	1,00	0,75	1,00
Primer Ins_F/FL_R	1,00	0,75	0,75	0,75	1,00	0,90	1,00	1,00	0,75	0,75
MgCl₂	1,00	1,00	0,90	0,75	0,75	1,00	1,00	1,00	0,75	0,75
Primer Del_F/FL_R	1,00	0,90	0,90	*	*	1,00	0,90	1,20	0,90	0,90
MgCl₂	1,00	1,80	0,75	*	*	1,00	1,00	1,00	0,75	0,75
	Multiplex 1				Multiplex 2			Multiplex 3		
	M1	M9	M13	L22	M2	L19	M17	M6	L8	M12
Primer FL_F/FL_R	1,50	0,80	0,70	1,00	0,75	0,40	1,00	1,00	0,50	2,00
MgCl₂	2,00				2,00			2,00		

* *Primers* não padronizados.

As temperaturas de pareamento e a ciclagem de PCR estão dispostas na Tabela 5 e na Figura 3, respectivamente.

Tabela 5. Temperaturas (°C) de pareamento padronizadas para cada par de *primer* para amplificação em reação de PCR. Os *primers* flanqueadores estão indicados por FL_F/FL_R e os alelo-específicos por Ins_F/FL_R e Del_F/FL_R.

<i>Primers</i>	Lócus									
	M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
FL _F /FL _R	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Ins _F /FL _R	60	60	60	60	65	60	60	60	60	60
Del _F /FL _R	60	60	60	*	*	60	62	60	60	60

* *Primers* não padronizados

Figura 3. Ciclagem de PCR utilizadas para amplificação com *primers* flanqueadores e alelo-específicos (A), cujas temperaturas de pareamento estão descritas na Tabela 5, e ciclagem para reações realizadas em multiplex (B).

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), seguindo protocolo do Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética da FMRP-USP (ANEXOS 4 e 5).

Análise Estatística

Para cada um dos dez lócus *indel*, foram estimados Parâmetros Populacionais e Forenses considerando a amostra populacional parental, sendo esses indivíduos geneticamente

independentes. As frequências alélicas (p_i), o número de genótipos esperados, Heterozigose Observada e Esperada (H_{obs} e H_{esp}) e aderência das frequências genotípicas observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculadas pelo *software Genepop 4.7.0* (Rousset, 2008) encontrado em <http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>. O Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC - *Polymorphism Information Content*) (Botstein et al., 1980); Poder de Exclusão (PE) (Jamieson, 1965) e Probabilidade Cumulativa de Exclusão (PCE) (Evetts and Weir, 1998); Poder de Discriminação (PD) e Poder Cumulativo de Discriminação (PCD) (Jones, 1972); e Índice de Paternidade (IP) e Probabilidade de Paternidade (W) (Li and Chakravarti, 1985) foram estimados usando as facilidades do *software Microsoft Office Excel*. Todas as equações estão disponíveis no ANEXO 6.

Adicionalmente foram estimados valores de PE_{obs} e PD_{obs} a partir da análise e observação da amostra populacional para comparação com os valores obtidos nos cálculos por meio das equações mencionadas. Para estimar um valor de PE_{obs} , cada mãe e filho foram comparados com todos os outros pais da amostra, resultando em 6320 combinações mãe-filho-suposto pai. O valor de PE_{obs} foi dado pela razão entre o número de vezes em que o trio foi excluído e o total de combinações realizadas. Quanto às estimativas para valores de PD_{obs} , foram comparadas a identidade dos fenótipos de cada mãe com cada pai, resultando um total de 6400 combinações de dois indivíduos para cada locus. PD_{obs} foi então calculado como a razão entre o número de vezes em que os pares apresentaram fenótipos distintos e o total de combinações. Os valores de IP e W também foram calculados para trios falsos, combinando cada mãe e filho com os outros pais não correspondentes ao trio. No total foram 6320 trios falsos analisados.

RESULTADOS

Seleção de Locus

Neste trabalho foi proposta a descrição de condições laboratoriais, *PCR* seguida de visualização em *PAGE*, para dez locus *indel*.

A seleção dos locus foi realizada a partir do banco de dados *dbSNP* do *NCBI*, que apresentou um número inicial de *indels* humanos de mais de 12 milhões de sequências. Esse montante foi reduzido aplicando-se os filtros: sequências validadas pelo projeto *1000 Genomes* (4 milhões de *indels*); heterozigose de 30% a 50% (620 mil *indels*); locus bialélicos, com sequência de inserção maiores que 20 pb, eliminando sequências repetitivas que dificultariam o desenho de *primers* (688 *indels*). Destes 688 locus, buscou-se aqueles em que fosse possível o desenho tanto de pares de *primers* flanqueadores, que amplificam ambos alelos, como de *primers* alelo-específicos, que amplificam ou alelo *inserção* ou alelo *deleção*; considerou-se também os tamanhos esperados dos *amplicons* para que fosse possível o estudo de reações *PCR* multiplex. Por fim, foram escolhidos os sete novos locus para compor o total de dez locus utilizados neste trabalho.

Condições de Detecção

As condições de amplificação padronizadas estão descritas, em *Material e Métodos*, nas Tabelas 4 e 5 e na Figura 3.

As concentrações de *primer* e cloreto de magnésio utilizadas foram ajustadas de forma a evitar a amplificação de bandas espúrias. Na amplificação do locus M9, a presença de uma banda espúria persistiu, mas por ser um fragmento de menor tamanho que aqueles estudados, não dificultou as análises (Figura 4).

As temperaturas de pareamento utilizadas para amplificação com *primers* flanqueadores foi de 60°C. Para amplificação com *primer* inserção-específico, de nove locus, e deleção-específico, de sete locus, a padronização também foi realizada com temperatura de pareamento a 60°C. Para melhorar a especificidade da reação, foi necessário utilizar as temperaturas de pareamento de 65°C e 62°C respectivamente para amplificação dos locus M9 com *primer* inserção-específico e M13 com *primer* deleção-específico.

Mesmo com ajustes de temperaturas e concentrações de reagentes, não foi possível a amplificação específica do alelo *deleção* dos loci L8 e M9, uma vez que indivíduos homozigotos *ii* também mostraram amplificação nas reações com *primers* *deleção*-específicos.

No caso das reações realizadas em multiplex utilizando *primers* flanqueadores, além de considerados os tamanhos dos fragmentos, houve necessidade de novos ajustes nas concentrações dos reagentes, a fim de contornar competição entre *primers* (Tabela 4). As temperaturas de pareamento foram mantidas a 60°C, mas o tempo de extensão de foi reduzido de 2 para 1 minuto (Figura 3B).

Determinação Fenotípica e Perfil dos Locus

Os 10 loci *indel* selecionados foram fenotipados, com uso de *primers* flanqueadores, em 80 trios mãe-filho-pai com paternidade confirmada. Os fenótipos dos 240 indivíduos se encontram no APÊNDICE A. Não foram encontradas exclusões. Não houve amplificação em um indivíduo no locus M6, dois no locus M9, dois no M17 e um no L19. As amostras não amplificadas tiveram nova extração de *DNA* e as reações de *PCR* foram repetidas. Com a persistência da não amplificação, esses indivíduos não foram considerados nas análises estatísticas.

A visualização por *PAGE* (Figura 4) foi de bandas nítidas na região compatível com o tamanho dos fragmentos estimados pelo *software In-Silico PCR*. Na amplificação com *primers* flanqueadores (Figura 4A), apareceram duas bandas distintas em indivíduos heterozigotos, referente aos alelos *inserção* e *deleção*, e somente uma das bandas em indivíduos homozigotos. Na amplificação alelo-específica (Figura 4B e 4C), somente se visualiza uma banda em indivíduos heterozigotos e em um dos homozigotos, sendo o outro homozigoto identificado pela ausência de banda.

As reações realizadas em multiplex com *primers* flanqueadores foram visualizadas em *PAGE* como exemplificado na Figura 5.

Figura 4. Visualização de padrão de bandas após amplificação com *primers* flanqueadores (A), inserção-específicos (B) e deleção-específicos (C). As amostras, para todos os loci, estão ordenadas por fenótipo *ii*, *id* e *dd* respectivamente. Em (B), não visualizamos a presença de bandas para indivíduos *dd*, assim como não vemos banda em indivíduos *ii* em (C). O marcador de 100 pares de bases está identificado por *M*.

Figura 5. Visualização, em *PAGE*, de reações de *PCR* realizadas em Multiplex. As linhas horizontais delimitam cada locus do multiplex. No multiplex M2/L19/M17 visualizamos, na primeira amostra, um indivíduo triplo heterozigoto *id/id/id* (duas bandas por locus) e, na segunda amostra, um triplo homozigoto *ii/dd/ii* (uma amostra por locus); no M6/L8/M12 visualizamos primeiro um triplo heterozigoto *id/id/id* e depois uma amostra *id/ii/id*; e no M9/M1/M13/L22 visualizamos os perfis *dd/id/id/id* e *ii/ii/id/dd*.

Paralelamente à determinação fenotípica, foi realizada a análise de segregação. O número de filhos, para cada fenótipo, obtidos a partir de cada tipo de cruzamento estão expostos na Tabela 6. Foram analisados todos os tipos de cruzamentos (MxP) e, em cada caso, os fenótipos possíveis de serem encontrados nos filhos.

Tabela 6. Análise de segregação. Número de cada tipo de trio mãe-filho-pai e X pai por locus. Não houve nenhuma exclusão. Em seis indivíduos não houve amplificação, não totalizando, portanto, 80 trios nos loci M6, M9, M17 e L17.

Mãe	Pai	Filho	M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
ii	ii	ii	32	8	7	17	9	32	0	9	8	5
	id	ii	6	2	8	12	8	7	4	10	5	5
		id	9	3	3	5	9	11	2	6	3	7
	dd	id	2	5	5	2	3	4	5	4	6	6
id	ii	ii	7	5	11	6	9	6	2	5	5	4
		id	9	5	11	7	7	6	1	3	7	3
	id	ii	2	7	6	3	3	3	5	7	4	3
		id	6	14	7	10	11	5	3	7	9	9
	dd	dd	2	3	7	6	2	1	6	6	4	8
		id	1	2	3	3	3	0	9	3	3	7
		dd	0	11	2	1	2	0	7	9	6	6
		dd	0	11	2	1	2	0	7	9	6	6
dd	ii	id	3	1	3	3	2	3	4	3	5	6
	id	id	1	5	1	1	1	0	7	2	6	2
		dd	0	5	3	2	6	2	5	3	5	2
	dd	dd	0	4	2	2	3	0	20	1	3	7
Total			80	80	79	80	78	80	80	78	79	80

Nos loci M1, M12 e M13, um total de oito trios Mãe-filho-pai não foram observados nesta amostra populacional. No locus M1 não foi observado M(id)-P(dd)-F(dd), M(dd)-P(id)-F(dd) e M(dd)-P(dd)-F(dd); no M12 não ocorreu M(id)-P(dd)-F(id), M(id)-P(dd)-F(dd), M(dd)-P(id)-F(id) e M(dd)-P(dd)-F(dd); e no M13 não encontramos M(ii)-P(ii)-F(ii).

Especificidade de Primers

A especificidade dos *primers* desenhados pode ser verificada na Figura 4 acima. Dentre os 30 pares de *primers* aqui avaliados, 28 foram específicos. Os pares deleção-específicos desenhados para os loci L8 e M9 amplificaram também o alelo *inserção* (Figura 6).

Figura 6. Amplificação com *primers* direcionados para o alelo *deleção* dos locos L8 e M9. Os fenótipos estão dispostos como *ii*, *id* e *dd*. Esses *primers* foram inespecíficos, assim podemos visualizar amplificação também em indivíduos *ii* (primeira amostra de cada locus).

Análises Estatísticas

Foram realizadas análises para inferência de dados populacionais e forenses em amostra de população urbana brasileira do interior do Estado de São Paulo.

Parâmetros Populacionais

As análises estatísticas foram realizadas considerando aqueles indivíduos geneticamente independentes, ou seja, os 160 indivíduos parentais. Os parâmetros populacionais estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Número de indivíduos observados e esperados, frequência alélica p_i para o alelo i , valor de p para Equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigose observada e esperada. Os parâmetros foram calculados pelo *software* Genepop 4.7.0.

Locus	Número de Indivíduos Observados			p_i	Número de Indivíduos Esperados			p (EHW)	H_{obs}	H_{esp}
	ii	id	dd		ii	id	dd			
M1	100	53	7	0,7906	99,9310	53,1379	6,9310	1,0000	0,3312	0,3321
M2	37	86	37	0,5000	39,8746	80,2508	39,8746	0,4289	0,5375	0,5015
M6	56	82	22	0,6062	58,6865	76,6270	24,6865	0,4097	0,5121	0,4788
L8	69	75	16	0,6656	70,7774	71,4451	17,7774	0,5953	0,4688	0,4465
M9	57	78	24	0,6038	57,8423	76,3155	24,8423	0,8684	0,4906	0,4799
M12	101	50	9	0,7875	99,1411	53,7179	7,1411	0,4762	0,3125	0,3358
M13	18	65	77	0,3156	15,8307	69,3386	74,8307	0,4654	0,4062	0,4335
M17	50	83	27	0,5719	52,2038	78,5925	29,2038	0,5199	0,5188	0,4911
L19	47	74	38	0,5283	44,2524	79,4953	35,2524	0,4271	0,4654	0,5001
L22	41	76	43	0,4938	38,8809	80,2382	40,8809	0,5295	0,4750	0,5016
Total									0,4518	0,4500

Os valores de Heterozigose esperada são todos dentro da faixa de 30%-50% conforme critério de seleção dos loci no *dbSNP*, embora a Heterozigose observada dos loci M2, M6 e M17 tenham sido um pouco superiores a 50%.

As frequências fenotípicas dos homozigotos para deleção nos loci M1 e M12 foram um pouco baixas (4,38% e 5,63% respectivamente) se comparadas aos demais loci, embora todos os loci tenham apresentado concordância com as proporções fenotípicas esperadas pelo EHW, dado valores de *p* (Tabela 7).

Parâmetros Forenses

Os Parâmetros Forenses, calculados segundo equações constantes no ANEXO 6, estão resumidos nas Tabelas 8 e APÊNDICE B.

Tabela 8. Parâmetros forenses. Conteúdo de Informação do Polimorfismo (*PIC*), Poder de Exclusão (*PE*) e Poder de Discriminação (*PD*) calculados segundo equações constantes no ANEXO 6.

Locus	<i>PIC</i>	<i>PE</i>	<i>PE_{obs}</i>	<i>PD</i>	<i>PD_{obs}</i>
M1	0,2763	0,1381	0,1291	0,4978	0,4980
M2	0,3750	0,1875	0,1907	0,6250	0,6086
M6	0,3636	0,1818	0,1878	0,6131	0,6047
L8	0,3461	0,1730	0,1472	0,5931	0,5850
M9	0,3640	0,1820	0,1719	0,6135	0,6139
M12	0,2787	0,1393	0,1661	0,5014	0,5052
M13	0,3387	0,1693	0,2051	0,5841	0,5973
M17	0,3698	0,1849	0,1993	0,6197	0,6119
L19	0,3742	0,1871	0,2086	0,6242	0,6439
L22	0,3750	0,1875	0,2054	0,6250	0,6413
Cumulativo		0,8508	0,8650	0,9999	0,9999

Os menores valores de *PIC* encontrados são 0,2763 e 0,2787 para os loci M1 e M12 respectivamente. Os demais apresentaram valores bem elevados considerando que são loci bialélicos, sendo os valores máximos, de 0,3750, encontrados para os loci M2 e L22.

Os valores de *PE* e *PD* variaram de 0,1381 a 0,1875 e 0,4978 a 0,6250, respectivamente. Os menores valores foram para o locus M1, e os valores máximos para os loci M2 e L22.

Os valores cumulativos, considerando o conjunto dos 10 loci *indel* aqui estudados, apresentaram valores de 99,99% de probabilidade de discriminar dois indivíduos em ao menos um locus e 85,08% de probabilidade de excluir uma paternidade em ao menos um locus.

A comparação entre os valores de PE e PD com os valores de PE_{obs} e PD_{obs} mostrou pouca variação dos valores, resultando nos mesmos valores de PCD e um valor de PCE_{obs} 1,42% maior.

A Probabilidade de Paternidade (W) foi calculada para cada trio (Tabela S1) e os valores variaram de 61,49% a 99,94%. Somente para seis trios os valores foram inferiores a 90%, para 27 trios os valores foram superiores a 99% e os 47 trios restante apresentaram valores de W entre 90% e 99%.

Considerando os 6320 trios com pais falsamente acusados, a exclusão ocorreu em 83,56% dos casos. Em 1039 trios que não houve exclusão, os valores de W foram inferiores aos encontrados nos trios verdadeiros, variando de 19,74% a 99,87% (Tabela S2).

DISCUSSÃO

Foi proposto neste trabalho uma busca de *lôcus* do tipo *indel* que fossem informativos na população estudada e o desenho de *primers* alelo-específicos. Um conjunto de dez *lôcus* caracterizados somente no projeto *1000 Genomes* foi selecionado e fenotipado em uma amostra de 80 trios mãe-filho-pai.

Pela primeira vez, sete desses *lôcus* são estudados em outra população, no caso brasileira, que não as analisadas no projeto *1000 Genomes*. Os outros três *lôcus* tiveram seu estudo iniciado, na mesma população, por Ng (2015) e seus *primers* flanqueadores e inserção-específicos foram mantidos. Os *primers* flanqueadores e inserção-específicos desenhados para os sete novos *lôcus*, assim como todos os *primers* deleção-específicos, foram desenhados neste projeto.

Todos os *lôcus* mostraram valores altos, para marcadores bialélicos, de *PIC*, *PE* e *PD*. A alta informatividade sugere que os *lôcus* sejam mantidos em pesquisas futuras.

Das 30 combinações de *primers*, foi confirmada a especificidade de 28. Apenas dois pares deleção-específicos, dos *lôcus* L8 e M9, não apresentaram a especificidade desejada.

Especificidade de Primers

Possivelmente, a não especificidade do *primer* L8 para deleção ocorre devido ao tamanho da extremidade 3' de 11pb, isto é, o comprimento da sequência do *primer* que faz pareamento depois da sequência de inserção (no sentido 5' da fita molde). Nessa situação, ainda que a extremidade 5' do *primer* não faça pareamento, é possível a amplificação (Figura 7). Não foi possível o desenho de um novo *primer* deleção-específico para o L8, uma vez que a temperatura de pareamento e porcentagem de bases C e G (%CG) ficam muito baixas. Para o *lôcus* M9, o comprimento da extremidade 3' é de 6pb, o que não deveria ser um problema para a especificidade do *primer*. Entretanto, é possível testar um novo *primer* com extremidade 3' de 4pb sem prejudicar a temperatura de pareamento e a %CG.

Figura 7. Pareamento inespecífico de primers. O pareamento de primers deleção-específicos (A) deveria amplificar somente o alelo deleção. O desenho incorreto pode ocasionar o pareamento da extremidade 3' do primer no alelo inserção (B) e permitir a amplificação mesmo sem pareamento da extremidade 5'.

A não especificidade desses *primers* mencionados reduz as possibilidades de encontrar situações informativas, ou seja, situações de mistura de *DNA* em que os indivíduos sejam homozigotos opostos ou um homozigoto (em maior concentração) e o outro heterozigoto (em menor concentração).

No caso dos loci L8 e M9, não seria possível a análise de misturas de *DNA* em que os indivíduos que têm maior contribuição com material genético sejam homozigotos *ii*. As frequências dos fenótipos *ii* desses loci são 43,13% e 35,85% respectivamente, sendo essas as situações de uso de *primers* deleção-específicos. O uso dos *primers* inserção-específicos dos loci L8 e M9 se restringem às proporções de indivíduos *dd*, que são respectivamente 10% e 15,09%. Assim, esses loci têm menor probabilidade de serem informativos, o que sugere a busca de outros loci cujos ambos os pares de *primers* alelo-específicos possam ser utilizados.

Análises Estatísticas

Parâmetros Populacionais

As frequências alélicas encontradas na amostra estudada foram comparadas com as frequências encontradas no *dbSNP*, fornecidas pelo projeto *1000 Genomes* (Tabela 9). Na última publicação, o *1000 Genomes* contava com 26 populações (Consortium, 2015), mas hoje já se encontram na página do projeto (<http://www.internationalgenome.org/data-portal/population>) 30 populações. Essas populações estão subdivididas em 5 superpopulações: africanas (AFR), americanas (AMR), leste asiáticas (EAS), europeias (EUR) e sul asiáticas (SAS).

Tabela 9. Frequências do alelo *inserção*. Os dados das populações americanas (AMR), africanas (AFR), leste asiáticas (EAS), sul asiáticas (SAS) e europeias (EUR) foram obtidos no *dbSNP*, fornecidas pelo projeto *1000 Genomes*. A população do presente estudo está identificada por BSP.

Lócus	BSP	AMR	AFR	EAS	SAS	EUR
M1	0,7906	0,6542	0,8737	0,4375	0,5890	0,7624
M2	0,4938	0,4870	0,4576	0,2659	0,4294	0,4781
M6	0,6062	0,5187	0,9440	0,4474	0,4816	0,4911
L8	0,6656	0,6499	0,2761	0,5496	0,7423	0,8032
M9	0,6038	0,6354	0,4887	0,7242	0,5399	0,6044
M12	0,7906	0,7522	0,8752	0,7847	0,5900	0,7644
M13	0,3156	0,2320	0,4607	0,2857	0,3231	0,3250
M17	0,5719	0,5202	0,6762	0,4603	0,5491	0,5865
L19	0,5283	0,5216	0,8411	0,6429	0,3814	0,3608
L22	0,4938	0,5231	0,6899	0,7877	0,6524	0,4742

Através de comparação sumária, foram encontradas mais semelhanças entre as frequências alélicas da população brasileira urbana do interior de SP (BSP) com populações AMR para os lócus M2, M6, L8 e L19 e EUR para os lócus M1, M9, M17 e L22. As frequências alélicas dos lócus M12 e M13 mostraram valores mais próximos das frequências leste e sul asiáticas, respectivamente, embora ainda muito semelhantes às frequências de populações EUR. As populações AFR e EAS foram as que apresentaram maiores discrepâncias comparadas às frequências da BSP, com diferenças de mais de 10%, chegando até 39%. De modo geral, as populações AMR e EUR foram as que apresentaram as menores diferenças comparadas à BSP.

Os principais grupos que contribuíram para a formação da população brasileira foram ameríndios, europeus e africanos. As migrações ocorreram diversamente nas regiões do país, prevalecendo imigração africana no Nordeste e europeia no Sul, ao passo que as populações ameríndias prevaleceram no Norte (IBGE, 2007). Decorrente disso, diversos estudos evidenciam as diferentes contribuições genéticas dos grupos étnicos ancestrais nas diferentes regiões do Brasil.

De modo geral, a maior contribuição ancestral encontrada é europeia. No caso de populações de São Paulo, dois estudos analisando *AIM indels*, encontraram resultados concordantes. No primeiro deles, verificou-se uma contribuição europeia de $0,574 \pm 0,221$, seguida por $0,283 \pm 0,217$ de contribuição africana e $0,143 \pm 0,101$ ameríndia (Cardena et al., 2013). No segundo estudo, notou-se uma contribuição europeia de 0,629, africana de 0,225 e ameríndia de 0,116

(Manta et al., 2013). Na análise da população de Macapá, percebeu-se $0,50 \pm 0,0115$ de contribuição europeia, seguida de $0,29 \pm 0,0113$ de ameríndia e $0,21 \pm 0,0131$ de africana (Francez et al., 2012a), confirmando maior contribuição de ameríndios na região Norte do que Sudeste.

Apesar da maior similaridade da BSP com AMR e EUR e menor similaridade com AFR, não há contradição com a literatura citada. A superpopulação AMR inclui populações do México, Peru, Colômbia e Porto Rico (Consortium, 2015), as quais são também populações altamente miscigenadas e que contam com contribuições genéticas de ameríndios, europeus e africanos (Martínez-Cruzado et al., 2005, Ruiz-Linares et al., 2014), tais como as populações brasileiras.

Parâmetros Forenses

Foram estimados os valores máximos de *PIC*, *PE* e *PD* (Tabela 10), ou seja, quando as frequências de todos os alelos apresentam o mesmo valor, 50% no caso de locos bialélicos. Esses marcadores cujas frequências mais se aproximam de $1/n$, n = número de alelos, são considerados mais informativos para fins forenses (Hildebrand et al., 1994, Jamieson and Taylor, 1997).

Tabela 10. Estimativas de valores máximos, destacados abaixo, para H_{exp} , *PIC*, *PE* e *PD*.

p_i	H_{exp}	<i>PIC</i>	<i>PE</i>	<i>PD</i>
0,1000	0,1800	0,1638	0,0819	0,3114
0,2000	0,3200	0,2688	0,1344	0,4864
0,3000	0,4200	0,3318	0,1659	0,5754
0,4000	0,4800	0,3648	0,1824	0,6144
0,5000	0,5000	0,3750	0,1875	0,6250
0,6000	0,4800	0,3648	0,1824	0,6144
0,7000	0,4200	0,3318	0,1659	0,5754
0,8000	0,3200	0,2688	0,1344	0,4864
0,9000	0,1800	0,1638	0,0819	0,3114

PIC, originalmente, é a fração esperada de prole que permite dedução do genótipo parental quanto a um marcador codominante, quando esse marcador é ligado a um gene dominante para uma doença e os genótipos parentais são heterozigoto (afetado) e homozigoto recessivo (não afetado) (Botstein et al., 1980). Essa medida, por conseguinte, indica quão polimórfico é um marcador.

O valor máximo para PIC considerando locus bialélicos é 0,3750 (Hildebrand et al., 1994), valor estimado para os locus M2 e L22, embora todos os locus tenham apresentado valores elevados, incluindo os locus M1 e M12, que apesar de serem um pouco inferiores aos demais (0,2763 e 0,2787), ainda apresentaram informatividade mediana ($0,25 < PIC < 0,50$) (Botstein et al., 1980). Com isso, o conjunto de locus aqui estudados se mostrou bastante polimórfico para marcadores bialélicos.

PE é probabilidade de um homem aleatório ser excluído em um teste de paternidade para um determinado locus. Adicionalmente, considerando um conjunto de locus, PCE é a probabilidade de um homem ser excluído em ao menos um locus (Evetts and Weir, 1998). O valor máximo esperado para PE de locus bialélicos é 0,1875, o que resulta, para um conjunto de 10 marcadores, em um PCE de 87,46%. Esse valor é somente 2,38% e 0,96% maior que PCE e PCE_{obs} aqui encontrados, respectivamente, sugerindo que esse conjunto de locus, apesar de ser insuficiente, deve ser considerado para integrar um possível kit maior de *indels*.

Sendo P_I a probabilidade de identidade entre dois indivíduos aleatórios na população, $PD = 1 - P_I$ é a probabilidade de que esses indivíduos tenham fenótipos distintos (Butler, 2005). PCD , analogamente ao PCE , é a probabilidade de dois indivíduos aleatórios terem genótipos discordantes em ao menos um locus no conjunto analisado. Tratando-se de um conjunto de 10 marcadores bialélicos, o valor máximo que PD que podemos obter é 0,6250, resultando em PCD de 99,99%. Esse valor foi atingido tanto para PCD esperado quanto observado, mostrando que esses 10 locus de *indels* formam um conjunto que é suficiente para diferenciar dois indivíduos aleatórios.

Os valores aqui encontrados para o Índice de Paternidade, são insuficientes para a obtenção dos valores $W \geq 99,99\%$, o que implica em uma necessidade de uma obtenção de um maior conjunto de locus *indel*.

Diversos outros estudos populacionais foram analisados e seus valores de PIC , PE , PD e IP estão reunidos na Tabela 11. É nítido que os valores estimados quando são usados locus *STRs* são bem mais elevados devido à maior diversidade alélica. Entretanto, os valores inferiores obtidos por locus *indels* podem ser aumentados ao usar um conjunto de maior número de locus.

Tabela 11. Valores de *PIC*, *PE* e *PD* encontrados na literatura em diversos estudos populacionais.

Tipo de locus	Número de Locus	População	Tamanho Amostral	<i>PIC</i> mín.	<i>PIC</i> máx.	<i>PE</i> mín.	<i>PE</i> máx.	<i>PCE</i>	<i>PD</i> mín.	<i>PD</i> máx.	<i>PCD</i>	Referência
<i>indel</i>	48	Amazônia Brasileira	130	0,14	0,37	0,052	0,26	0,999456321	0,254	0,638	0,9999999999999999	(Francez et al., 2012a)
<i>indel</i>	30	SC, Brasil	108	-	-	0,087	0,261	0,997304338284356	0,568	0,656	0,9999999999999999	(Torres et al., 2014)
<i>indel</i>	30	PA, AM, DF, SP, RJ, SC, Brasil	519	-	-	0,1228	0,192	0,9973	0,568	0,625	0,999999	(Palha et al., 2015)
<i>indel</i>	30	Chineses Kazak	513	0,2955	0,3759	0,0887	0,2135	0,9945	0,5264	0,6381	0,9999999999999999	(Kong et al., 2017)
<i>indel</i>	30	Tibetanos de Tibet	123	0,1382	0,375	0,0121	0,2466	0,9913	0,2558	0,6472	0,9999999999999999	(Guo et al., 2016)
<i>indel</i>	30	Autonomous Region of Qinghai province of China	122	0,1391	0,3748	0,0207	0,1948	0,9862	0,2741	0,6552	0,9999999999999999	(Guo et al., 2016)
<i>indel</i>	30	Vietnã	300	0,164	0,375	-	-	0,987	-	-	0,9999999999999999	(Du et al., 2017)
<i>indel</i>	30	Nigéria	140	0,09	0,375	-	-	0,9676	-	-	0,9999999999999999	(Du et al., 2017)
<i>indel</i>	30	Chineses Tujia	236	0,0814	0,3742	0,0067	0,2231	0,986	0,1621	0,6476	0,9999999999999999	(Shen et al., 2016)
<i>indel</i>	30	Chineses Bai	125	0,1741	0,3749	0,0181	0,2542	0,9859	0,31	0,6533	0,9999999999999999	(Yang et al., 2017)
<i>indel</i>	21	Turquia	100	0,14	0,36	0,005	0,253	-	0,219	0,651	0,9999	(Ünsal et al., 2017)
<i>STR</i>	22	Chineses Han	152	0,686	0,8566	0,4552	0,7315	0,9999999999999999	0,8831	0,9627	0,9999999999999999	(Li et al., 2015)
<i>STR</i>	21	Mongolia	267	0,5599	0,9341	0,342	0,847	-	0,854	0,99	-	(Choi et al., 2017)
<i>STR</i>	26	Brasil	1575	0,512	0,8057	0,3115	0,6636	0,999999998	0,5214	0,9232	0,995553535	(Pereira et al., 2018)

Para estimar o número de locus *indel* necessários para obtenção de valores de *PCE* e *PCD* superiores a 99,99%, podemos realizar uma comparação dos dados descritos por Lee et al. (2017) estimando quantos locus *SNPs* seriam necessários para substituir *STRs* em análises forenses. Essa comparação pode ser realizada, pois *SNPs* também são bialélicos. Para obter *PCE* de no mínimo 99,99% são necessários de 45 a 47 *SNPs* com frequências alélicas 0,3/0,7, 0,4/0,6 e 0,5/0,5. Da mesma maneira, são necessários de 10 a 11 *SNPs* com essas mesmas frequências alélicas para encontrar valores de *PCD* de 99,99%. Foram estimados também quantos *SNPs* seriam necessários para substituir os 13 marcadores *STRs* do *FBI's Combined DNA Index System (CODIS)* e os 22 do *Powerplex® Fusion* em uma investigação de paternidade. Considerando *SNPs* altamente polimórficos, frequências alélicas o mais próximo possível de 0,5, foram necessários de 41 a 60 e 71 a 104 locus respectivamente (Lee et al., 2017).

Consequentemente, marcadores *indels*, assim como *SNPs*, não têm informatividade suficiente para substituírem *STRs* em exames de paternidade, por exemplo. Entretanto, *indels* são muito importantes se utilizados como complemento, devido à taxa de mutação mais baixa, quando há suspeita de mutações em algum locus *STR*. Já para os casos em que é necessária a detecção e quantificação de *DNA* em misturas, o uso dos *primers* alelo-específicos para *indels* pode substituir locus *STRs* sem prejuízos.

CONCLUSÕES

Os 10 *locus indel* deste trabalho foram analisados em uma população de 80 trios mãe-filho-pai do interior do Estado de São Paulo.

As fenotipagens foram realizadas com *primers* flanqueadores, por *PCR* convencional e *PAGE*, e apresentaram as bandas esperadas. A análise populacional e forense mostrou alta informatividade para todos os *locus*, sugerindo esses sejam mantidos em próximos estudos e integrados em um possível painel de marcadores *indel*. Os *primers* flanqueadores foram padronizados também em reações de *PCR* multiplex.

Dos pares de *primers* alelo-específicos, 18 apresentaram a especificidade esperada em análises por *PCR* convencional e *PAGE*. Excetuando os *locus* L8 e M9 cuja especificidade dos *primers* deleção-específicos não foi confirmada, a perspectiva futura é utilizar os *primers* alelo-específicos dos demais *locus* em *qPCR* e testar a detecção e quantificação de mistura de *DNA*.

O presente estudo descreveu novos *primers* e *locus* anteriormente não estudados em populações brasileiras. O levantamento de dados populacionais e forenses viabiliza o uso desses *locus* em projetos vindouros e a padronização de *primers* alelo-específicos abre muitas perspectivas para análises de misturas forenses de *DNA*, diagnóstico fetal não-invasivo e análise de quimerismo em pacientes submetidos a transplantes de células hematopoiéticas.

REFERÊNCIAS

- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal diagnosis*. 2007;27(5):415-8.
- Alberry MS, Maddocks DG, Hadi MA, Metawi H, Hunt LP, Abdel-Fattah SA, et al. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2009;200(1):98. e1-. e6.
- Bach C, Tomova E, Goldmann K, Weisbach V, Roesler W, Mackensen A, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism by real-time quantitative PCR of micro insertions/deletions in samples with low DNA quantities. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2015;42(1):38-45.
- Besenbacher S, Sulem P, Helgason A, Helgason H, Kristjansson H, Jonasdottir A, et al. Multi-nucleotide de novo Mutations in Humans. *PLoS genetics*. 2016;12(11):e1006315.
- Bieber FR, Buckleton JS, Budowle B, Butler JM, Coble MD. Evaluation of forensic DNA mixture evidence: protocol for evaluation, interpretation, and statistical calculations using the combined probability of inclusion. *BMC genetics*. 2016;17(1):125.
- Bornhäuser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *haematologica*. 2009;94(11):1613-7.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*. 1980;32(3):314.
- Brambati B, Simoni G, Travi M, Danesino C, Tului L, Privitera O, et al. Genetic diagnosis by chorionic villus sampling before 8 gestational weeks: efficiency, reliability, and risks on 317 completed pregnancies. *Prenatal diagnosis*. 1992;12(10):789-99.
- Brazorotto ASP. Quantificação de DNA fetal por marcadores inserção/deleção no plasma de parturientes: Univerisade de São Paulo; 2017.
- Bustamante-Aragones A, Trujillo-Tiebas M, Gallego-Merlo J, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Cantalapiedra D, et al. Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *European journal of neurology*. 2008;15(12):1338-44.
- Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers: Academic Press; 2005.
- Cardena MM, Ribeiro-dos-Santos Â, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One*. 2013;8(4):e62005.

- Chitty L, Griffin D, Meaney C, Barrett A, Khalil A, Pajkrt E, et al. New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2011;37(3):283-9.
- Choi E-J, Park K-W, Lee Y-H, Nam Y-H, Suren G, Ganbold U, et al. Forensic and population genetic analyses of the GlobalFiler STR loci in the Mongolian population. *Genes & Genomics*. 2017;39(4):423-31.
- Clayton T, Whitaker J, Sparkes R, Gill P. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International*. 1998;91(1):55-70.
- Consortium GP. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
- Consortium GP. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-73.
- Du W, Peng Z, Feng C, Zhu B, Wang B, Wang Y, et al. Forensic efficiency and genetic variation of 30 InDels in Vietnamese and Nigerian populations. *Oncotarget*. 2017;8(51):88934.
- Evett IW, Weir BS. Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic scientists: Sinauer; 1998.
- Francez PAdC, Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos SEB. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Forensic Science International: Genetics*. 2012a;6(1):132-5.
- Francez PAdC, Rodrigues EMR, de Velasco AM, dos Santos SEB. Insertion-deletion polymorphisms—utilization on forensic analysis. *International journal of legal medicine*. 2012b;126(4):491-6.
- Guo Y, Shen C, Meng H, Dong Q, Kong T, Yang C, et al. Population differentiations and phylogenetic analysis of Tibet and Qinghai Tibetan Groups based on 30 InDel loci. *DNA and cell biology*. 2016;35(12):787-94.
- Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. *PCR technology*: Springer; 1989. p. 31-8.
- Hildebrand CE, David C, Torney C, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. *The Human Genome Project: deciphering the blueprint of heredity* University Science Books, CA, USA. 1994:100-2.
- Hill M, Taffinder S, Chitty LS, Morris S. Incremental cost of non-invasive prenatal diagnosis versus invasive prenatal diagnosis of fetal sex in England. *Prenatal diagnosis*. 2011;31(3):267-73.
- Homer N, Szelinger S, Redman M, Duggan D, Tembe W, Muehling J, et al. Resolving individuals contributing trace amounts of DNA to highly complex mixtures using high-density SNP genotyping microarrays. *PLoS genetics*. 2008;4(8):e1000167.

- Hwa H-L, Chung W-C, Chen P-L, Lin C-P, Li H-Y, Yin H-I, et al. A 1204-single nucleotide polymorphism and insertion-deletion polymorphism panel for massively parallel sequencing analysis of DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*. 2018;32:94-101.
- IBGE. Brasil: 500 anos de povoamento. Centro de Documentação e Disseminação de Informações ed. Rio de Janeiro: Divisão de Biblioteca e Acervos Especiais; 2007. 232 p.
- Isaacson J, Schwoebel E, Shcherbina A, Ricke D, Harper J, Petrovick M, et al. Robust detection of individual forensic profiles in DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*. 2015;14:31-7.
- Jamieson A. The genetics of transferrins in cattle. *Heredity*. 1965;20(3):419.
- Jamieson A, Taylor C. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal genetics*. 1997;28(6):397-400.
- Jones CJ, Fox H. Ultrastructure of the normal human placenta. *Electron microscopy reviews*. 1991;4(1):129-78.
- Jones D. Blood samples: probability of discrimination. *Journal of the Forensic Science Society*. 1972;12(2):355-9.
- Khorshid HRK, Zargari M, Sadeghi MR, Edallatkah H, Shahhosseiny MH, Kamali K. Early fetal gender determination using real-time PCR analysis of cell-free fetal DNA during 6th-10th weeks of gestation. *Acta Medica Iranica*. 2013;51(4):209-14.
- Kim EH, Lee HY, Yang IS, Jung S-E, Yang WI, Shin K-J. Massively parallel sequencing of 17 commonly used forensic autosomal STRs and amelogenin with small amplicons. *Forensic Science International: Genetics*. 2016;22:1-7.
- Kim SY, Jeong MH, Park N, Ra E, Park H, Seo SH, et al. Chimerism monitoring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using quantitative real-time PCR of biallelic insertion/deletion polymorphisms. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2014;16(6):679-88.
- Kimura M, Hara M, Itakura A, Sato C, Ikebuchi K, Ishihara O. Fragment size analysis of free fetal DNA in maternal plasma using Y-STR loci and SRY gene amplification. *Nagoya journal of medical science*. 2011;73(3-4):129-35.
- Kong T, Chen Y, Guo Y, Wei Y, Jin X, Xie T, et al. Autosomal InDel polymorphisms for population genetic structure and differentiation analysis of Chinese Kazak ethnic group. *Oncotarget*. 2017;8(34):56651.
- Kreienberg H, Hölle W, Möhrle S, Niethammer D, Bader P. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia*. 2003;17(1):237.

- Lamba R, Abella E, Kukuruga D, Klein J, Savasan S, Abidi M, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia*. 2004;18(10):1681-6.
- Lee H-J, Lee JW, Jeong SJ, Park M. How many single nucleotide polymorphisms (SNPs) are needed to replace short tandem repeats (STRs) in forensic applications? *International journal of legal medicine*. 2017;131(5):1203-10.
- Li C, Chakravarti A. Basic fallacies in the formulation of the paternity index. *American journal of human genetics*. 1985;37(4):809.
- Li J, Luo H, Song F, Hou Y. Genetic polymorphisms of 22 autosomal STR loci in Chinese Han population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2015;5:e45-e7.
- Liu J, Wang J, Zhang X, Li Z, Yun K, Liu Z, et al. A mixture detection method based on separate amplification using primer specific alleles of INDELs-a study based on two person's DNA mixture. *Journal of forensic and legal medicine*. 2017;46:30-6.
- Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The lancet*. 1997;350(9076):485-7.
- Lo YD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*. 1998a;339(24):1734-8.
- Lo YD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*. 1998b;62(4):768-75.
- Manta FSdN, Pereira R, Vianna R, de Araújo ARB, Gitaí DLG, da Silva DA, et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PloS one*. 2013;8(9):e75145.
- Martin A, Krishna I, Martina B, Samuel A. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenatal diagnosis*. 2014;34(7):685-91.
- Martínez-Cruzado JC, Toro-Labrador G, Viera-Vera J, Rivera-Vega MY, Startek J, Latorre-Esteves M, et al. Reconstructing the population history of Puerto Rico by means of mtDNA phylogeographic analysis. *American journal of physical anthropology*. 2005;128(1):131-55.
- Martinez J, Braganholi DF, Ambrósio IB, Polverari FS, Cicarelli RMB. Mutation rates for 20 STR loci in a population from São Paulo state, Southeast, Brazil. *Annals of human biology*. 2017;44(7):659-62.
- Meng M, Li X, Ge H, Chen F, Han M, Zhang Y, et al. Noninvasive prenatal testing for autosomal recessive conditions by maternal plasma sequencing in a case of congenital deafness. *Genetics in Medicine*. 2014;16(12):972.

- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome research*. 2006;16(9):1182-90.
- Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, Mahurkar AA, et al. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome research*. 2011;gr. 115907.110.
- New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KA, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(6):E1022-E30.
- Ng AM. Validação de marcadores inserção/deleção para genotipagem fetal não invasiva. Ribeirão Preto - SP: Universidade de São Paulo (USP); 2015.
- Nicolaides K, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenatal diagnosis*. 2013;33(6):575-9.
- Palha TdJBF, Rodrigues EMR, Cavalcante GC, Marrero A, de Souza IR, Uehara CJS, et al. Population genetic analysis of insertion–deletion polymorphisms in a Brazilian population using the Investigator DIPlex kit. *Forensic Science International: Genetics*. 2015;19:10-4.
- Pereira TFC, Malaghini M, Magalhães JCM, Moura-Neto R, Sotomaior VS. Genetic data for 26 autosomal STR markers from Brazilian population. *International journal of legal medicine*. 2018;1-3.
- Romanini C, Romero M, Puerto MS, Catelli L, Phillips C, Pereira R, et al. Ancestry informative markers: inference of ancestry in aged bone samples using an autosomal AIM-Indel multiplex. *Forensic Science International: Genetics*. 2015;16:58-63.
- Rousset F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 2008;8(1):103-6.
- Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS genetics*. 2014;10(9):e1004572.
- Santos M. Marcadores inserção/deleção na identificação humana pré-natal por método não invasivo: Universidade de São Paulo (USP); 2014.
- Santurtún A, Riancho J, Yañez L, Santurtún M, Zarrabeitia M. Analysis of post-transplant chimerism by using a single amplification reaction of 38 Indel polymorphic loci. *Bone marrow transplantation*. 2014;49(11):1432.
- Santurtún A, Riancho JA, Arozamena J, López-Duarte M, Zarrabeitia MT. Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis. *International journal of legal medicine*. 2017;131(1):67-72.

- Seeds JW. Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2004;191(2):607-15.
- Shen C, Zhu B, Yao T, Li Z, Zhang Y, Yan J, et al. A 30-InDel Assay for Genetic Variation and Population Structure Analysis of Chinese Tujia Group. *Scientific reports*. 2016;6:36842.
- Sifakis S, Koukou Z, Spandidos DA. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications. *Molecular medicine reports*. 2015;11(4):2367-72.
- Simpson JL. Invasive procedures for prenatal diagnosis: Any future left? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2012;26(5):625-38.
- Thiede C, Bornhäuser M, Ehninger G. Evaluation of STR informativity for chimerism testing—comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia*. 2004;18(2):248.
- Torres SRR, Uehara CJS, Sutter-Latorre AF, de Almeida BS, Sauerbier TS, Muniz YCN, et al. Population genetic data and forensic parameters of 30 autosomal InDel markers in Santa Catarina State population, Southern Brazil. *Molecular biology reports*. 2014;41(8):5429-33.
- Tsui NB, Kadir RA, Chan KA, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood*. 2011;117(13):3684-91.
- Ünsal T, Filoğlu G, Aşıcıoğlu F, Bülbül Ö. Population data of new 21 mini-InDels from Turkey. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e189-e91.
- Walknowska J, Conte F, Grumbach M. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *The Lancet*. 1969;293(7606):1119-22.
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;71(4):854-62.
- Whittle M, Francischini C, Sumita D. Routine implementation of noninvasive prenatal paternity testing with STRs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e233-e4.
- Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human reproduction update*. 2008;15(1):139-51.
- Xiong L, Barrett AN, Hua R, Ho SS, Jun L, Chan KA, et al. Non-invasive prenatal testing for fetal inheritance of maternal β -thalassaemia mutations using targeted sequencing and relative mutation dosage: a feasibility study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2018;125(4):461-8.
- Yang C-H, Yin C-Y, Shen C-M, Guo Y-X, Dong Q, Yan J-W, et al. Genetic variation and forensic efficiency of autosomal insertion/deletion polymorphisms in Chinese Bai ethnic group: phylogenetic analysis to other populations. *Oncotarget*. 2017;8(24):39582.

- Yoo S-K, Lim BC, Byeun J, Hwang H, Kim KJ, Hwang YS, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of duchenne muscular dystrophy: comprehensive genetic diagnosis in carrier, proband, and fetus. *Clinical chemistry*. 2015;61(6):829-37.
- Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015;45(5):530-8.

ANEXOS

ANEXO 1. APROVAÇÃO PELCOMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DO HCFMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 09 de dezembro de 2016

Ofício nº 4149/2016
CEP/LVG

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“PARÂMETROS POPULACIONAIS DE POLIMORFISMOS DO TIPO INDEL E PADRONIZAÇÃO LABORATORIAL PARA SUA DETECÇÃO”**, bem como o **Biorrepositório**, foram analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 442ª Reunião Ordinária realizada em 05/12/2016 e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 14090/2016.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. LUÍS VICENTE GARCIA
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MARIA LUISA DE BARROS RODRIGUES
PROF. DR. AGUINALDO LUIZ SIMÕES (Orientador)
Depto. de Genética da FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO 2. EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE SANGUE E SWAB BUCAL (ADAPTADO DE HIGUCHI 1989)

Reagentes e soluções

- 1. Tampão de lise de eritrócitos (Lise I): Tris/HCl 0,01 M pH 7,6; Sacarose 0,32 M; MgCl₂ 5,0 mM; Triton X-100 1%.
- 2. Tampão de lise de leucócitos (Lise II): Tris/HCl 0,01 M pH 8,5; KCl 0,05 M; MgCl₂ 2,5 mM; NP-40 (Detergente Nonidet) 1%; Tween 20 – 0,45%.
- 3. Proteinase K (SIGMA-ALDRICH): 10 mg/mL.

Procedimento

- Pipetar 100 µL de sangue total, ou 700 µL da amostra coletada por swab bucal, em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL.
- Para amostras de sangue, acrescentar 1,0 mL de tampão de lise de I e homogeneizar (sem uso de vortex). Para amostras de coleta por swab bucal, acrescentar 700 µL do mesmo tampão e realizar o procedimento da mesma forma.
- Centrifugar a 6.000 G por 2 minutos e descartar o sobrenadante.
- Acrescentar ao precipitado, novamente 1,0 mL de tampão de lise I, para o caso de amostras de sangue, ou 700 µL para amostras de coletas por swab oral. Centrifugar a 6.000 G por 2 minutos e descartar o sobrenadante. Repetir esse procedimento até que o precipitado apresente cor clara (2-3 repetições), indicando a ausência de contaminação por hemoglobina (para amostras de sangue), ou até que o precipitado fique visível (para amostras coletadas por swab bucal).
- Ressuspender o precipitado em solução com 300 µL de tampão de lise II e 5 µL de proteinase K.
- Armazenar as amostras, por mínimo 1 hora, em estufa a 65°C.
- Inativar a proteinase K aquecendo as amostras a 94°C por 10 minutos.
- Estocar em freezer a -20°C.

ANEXO 3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – POLIMERASE CHAIN REACTION)

Reagentes e soluções

- Tampão de reação 10X livre de $MgCl_2$: Tris/HCl 100 mM pH 8,3; KCl 500 mM (SIGMA-ALDRICH).
- $MgCl_2$: 25 mM (SIGMA-ALDRICH).
- *Taq DNA polimerase*: 5 U/ μ L em Tris-HCl 20 mM, pH8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, estabilizadores, glicerol 50% (SIGMA-ALDRICH).
- Solução de *primers*: solução trabalho única a 2,5 μ M de cada *primer* (direto e reverso) (SIGMA-ALDRICH).
- dNTP: solução trabalho única a 20 mM de cada base (GE Healthcare Life Sciences).
- Água destilada ultrapura (MilliQ - Millipore Corporation).

Procedimento

Cada tubo de reação teve volume final de 25 μ L, sendo:

- 4 μ L de DNA genômico previamente extraído (aproximadamente 200 ng/ μ L);
- 21 μ L do mix de reação, preparado em microtubo de 1,5 mL:
 - 2,5 μ L de tampão de reação;
 - 0,25 μ L de dNTP;
 - 0,1 μ L de Taq;
 - Quantidade padronizada de $MgCl_2$ (Tabela 4);
 - Quantidade padronizada da solução de *primer* (Tabela 4);
 - Quantidade necessária de água ultrapura para completar o volume final de 21 μ L.

Após a adição de 4 μ L de DNA genômico de cada amostra em seu respectivo microtubo de 0,5 mL, adicionou-se os 21 μ L do mix de reação. Para cada reação houve um controle negativo, com a adição de 4 μ L de água ultrapura ao invés de DNA.

ANEXO 4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO-DESNATURANTE

Reagentes e soluções

- Solução de acrilamida/bisacrilamida (29:1): 29 g de acrilamida (PM= 71,08); 1 g de bisacrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida; PM= 154,17), 100 mL de água destilada.
- Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0: 186 g de EDTA (PM = 372,24); 1 L de água destilada; pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH) para ajuste do pH.
- Tampão TBE 10X 0,9 M pH 8,0: 108 g de Tris (PM = 121,1); 53 g de ácido bórico (PM = 61,83); 40 mL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0; água destilada para completar volume final de 1 L.
- Tampão de corrida TBE 1X 0,9 M pH 8,0: 100 mL de Tampão TBE 10X; 900 mL de água destilada.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) (SIGMA-ALDRICH).
- Solução hipersaturada de persulfato de potássio: 650 mg de persulfato de potássio (PM = 270,32); 6,5 mL de água destilada.
- Tampão de amostra: 900 µL de bromofenol; 900 µL de xilenocianol; 900 µL de TBE 10X; 4,5 mL de Ficol 30% diluído em água; 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; 3,6 g de sacarose (completamente diluída na solução final).
- Mix para gel não-desnaturante 10%: 6,66 mL de solução acrilamida/bisacrilamida; 1,4 mL de glicerol; 9,7 mL de água destilada; 2,0 mL de TBE 10%.
- Padrão de peso molecular 100 pb (Promega): 5 µL de solução estoque do padrão de peso molecular 500 µg/µL; 150 µL de água destilada; 50 µL de tampão de amostra.

Procedimento

Montagem do cassete de vidro:

- Colocar dois espaçadores de teflon, nas bordas laterais, entre duas placas de vidro 16 cm x 14 cm, próprias para eletroforese.
- Prender o conjunto com grampos nas bordas laterais.

Preparo do Gel:

- Em um béquer, adicionar 20 µL de TEMED (catalisador da reação de polimerização) e 500 µL de persulfato de potássio a 20 mL do mix para gel.
- Imediatamente após a preparação, despejar a mistura no cassete de vidro previamente montado na posição horizontal e encaixar um pente de teflon (de 30 poços) na parte superior do cassete.
- Aguardar aproximadamente 20 minutos a reação de polimerização do gel.
- Remover o pente e os grampos, sem desmontar o cassete, e lavar os poços com água corrente.
- Remover a água acumulada nos poços vertendo repetidamente o cassete com os poços voltados para baixo.

Eletroforese

- Posicionar o cassete verticalmente na cuba de eletroforese e prendê-lo com grampos nas laterais.
- Colocar o tampão de corrida (TBE 1x) em ambos os polos da cuba enchendo os poços com tampão.

- Conectar a cuba a uma fonte de voltagem constante e realizar uma pré-corrida, por poucos minutos, antes da aplicação das amostras.
- Preparar as amostras para aplicação no gel (4 μ L de DNA amplificado adicionado a 5 μ L de tampão de amostra).
- Desligar a fonte e aplicar as amostras com uma seringa de vidro, cada uma em um poço do gel, colocando, no primeiro pocinho, 6 μ L de marcador de peso molecular e, no último, o controle negativo da PCR.
- Inicia-se a corrida de 1h30 a 2h, baseado na resolução desejada, com fonte de voltagem constante ajustada a 200 V e 400 mA.

ANEXO 5. COLORAÇÃO E SECAGEM DO GEL

Reagentes e soluções

- Solução fixadora (volume 1L): 167 mL de álcool etílico; 7 mL de ácido acético glacial e 826 mL de H₂O.
- Solução reveladora (volume 1L): 22,5g de NaOH (PM= 40,00); 1L de água destilada. No momento da coloração, adicionar 2 mL de formaldeído (PM = 30,05) para cada 100 mL de solução reveladora utilizada.
- Solução de nitrato de prata (volume 1L): 100 g de nitrato de prata; 1 L de água (armazenada sob abrigo da luz).

Procedimento

Coloração:

Depois de finalizada a corrida eletroforética:

- Retirar o cassete de vidro da cuba, removendo os grampos.
- Retirar os espaçadores e separar cuidadosamente as placas de vidro com ajuda de uma espátula
- Remover o gel com a espátula e mergulhá-lo em 100 mL da solução fixadora, adicionada de 4 mL da solução de nitrato de prata. Manter sob leve agitação por 5 minutos e descartar a solução.
- Lavar rapidamente com 100 mL de água destilada a 60°C.
- Descartar a água e adicionar 100 mL da solução reveladora levemente aquecida e adicionada de 2 mL de formaldeído. Manter sob leve agitação por alguns minutos até aparecimento de bandas nítidas.
- Descartar a solução reveladora e, para bloqueio da reação de revelação, adicionar 100 mL da solução fixadora.

Secagem do gel:

- Forrar uma placa de vidro com papel celofane culinário umedecido.
- Posicionar o gel sobre a placa forrada e cobrir com outra folha de papel celofane umedecido. Não deixar que formem bolhas de ar entre as camadas de celofane sobre o vidro e sobre o gel.
- Deixar o conjunto secar completamente em condições ambientes, cerca de 2 dias.

ANEXO 6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Parâmetros Populacionais

Frequências alélicas (p_i) e genotípicas (p_{ii}):

$$p_i = \frac{2n_{ii} + n_{id}}{2n} \quad \text{e} \quad p_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Em que:

p_i = frequência do alelo *inserção*;

p_{ii} = frequência do genótipo (*ii*);

n_{ii} = número de homozigotos observados para o alelo *inserção*;

n_{id} = número de heterozigotos observados;

n = número de indivíduos analisados.

Heterozigose Observada (H_o) e Esperada segundo Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_o = \frac{n_{id}}{n} \quad \text{e} \quad H_e = 2pq$$

Em que:

n_{id} = número de heterozigotos observados;

n = número de indivíduos analisados;

p = frequência do alelo *inserção*;

q = frequência do alelo *deleção*.

Teorema de Hardy-Weinberg:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Em que:

p = frequência do alelo *inserção*;

q = frequência do alelo *deleção*;

p^2 = frequência esperada de homozigotos para o alelo *inserção*;

$2pq$ = frequência esperada de heterozigotos;

q^2 = frequência esperada de homozigotos para o alelo *deleção*.

Parâmetros Forenses

Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC), equação encontrada em Botstein et al. (1980):

PIC é definido como uma fração de prole informativa quanto aos genótipos parentais em um cruzamento, ou em outras palavras, é a probabilidade de uma dada prole permitir a dedução dos genótipos parentais (Botstein et al., 1980, Hildebrand et al., 1994)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Em que:

n = número de alelos;

p_i = frequência do i-ésimo alelo;

p_j = frequência do j-ésimo alelo.

Poder de Exclusão (PE), equações encontradas em (Jamieson (1965), Jamieson and Taylor (1997)):

PE é a probabilidade de um locus excluir um indivíduo não relacionado à paternidade (Evetts and Weir, 1998).

$$PE = \sum_{i=1}^n p_i(1 - p_i)^2 - \frac{1}{2} \sum_i^n \sum_{j \neq i}^n p_i^2 p_j^2 (4 - 3p_i - 3p_j)$$

Em que:

n = número de alelos;

p_i = frequência do i-ésimo alelo;

p_j = frequência do j-ésimo alelo diferente de i-ésimo.

O valor de PE será aumentado ao utilizar um conjunto de loci, sendo aqui identificado como Probabilidade Cumulativa de Exclusão (PCE) e corresponde à probabilidade de exclusão em ao menos um locus do conjunto (Evetts and Weir, 1998).

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

Em que:

n = número de loci avaliados;

PE_i = PE do i-ésimo alelo.

Poder de Discriminação (PD), equação encontrada em Jones (1972):

$$PD = 1 - \sum_{i=1}^n x_i^2$$

Em que:

n = número de genótipos possíveis;

x_i = frequência do i-ésimo genótipo.

$PD = 1 - P_I$, onde $P_I = \sum_{i=1}^n x_i^2$ (Probabilidade de Identidade) é a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente tenham genótipos idênticos no mesmo locus (Butler, 2005).

Podemos calcular, para um conjunto de marcadores, o Poder Cumulativo de Discriminação (PCD):

$$PCD = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PD_i)$$

Em que:

n = número de loci avaliados;

PD_i = PD do i -ésimo alelo.

Índice de Paternidade (IP), equações encontradas em Li and Chakravarti (1985):

$$IP = \frac{P(C|M, F)}{P(C|M)}$$

Em que:

C = genótipo da criança;

M = genótipo da mãe;

F = genótipo do suposto pai;

Nessa equação temos a razão entre a probabilidade de segregação mendeliana, considerando genótipos da mãe e do suposto pai, e a média ponderada de probabilidades de segregação, considerando o pai como um indivíduo aleatório da população (Li and Chakravarti, 1985).

Para um conjunto de marcadores, quando quando o suposto pai não foi excluído, a Probabilidade de Paternidade (W) é dada por (Li and Chakravarti, 1985):

$$W = \frac{\prod_{i=1}^n IP_i}{1 + \prod_{i=1}^n IP_i}$$

Em que:

n = número de loci avaliados;

IP_i = IP do i -ésimo alelo.

APÊNDICES

APÊNDICE A. FENÓTIPOS DE 80 TRIOS MÃE-FILHO-PAI PARA DEZ MARCADORES *INDEL*.

ID	Locus									
	M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
4711 M	ii	id	id	ii	dd	ii	dd	id	id	id
4711 F	id	dd	dd	ii	dd	id	id	dd	id	id
4711 P	id	dd	id	ii	id	dd	ii	dd	id	id
4714 M	ii	dd	id	ii	id	ii	id	id	dd	ii
4714 F	ii	id	id	ii	dd	ii	ii	ii	dd	id
4714 P	ii	id	ii	ii	id	ii	id	id	dd	dd
4717 M	ii	id	id	ii	id	ii	dd	id	id	id
4717 F	ii	id	ii	ii	dd	id	id	id	dd	ii
4717 P	ii	ii	ii	ii	dd	id	id	id	dd	ii
4723 M	id	id	dd	ii	id	ii	dd	ii	ii	id
4723 F	id	id	dd	ii	ii	ii	dd	ii	id	id
4723 P	id	id	dd	ii	ii	ii	dd	id	dd	id
4725 M	ii	ii	ii	id	id	id	dd	id	id	ii
4725 F	id	id	ii	dd	id	id	dd	id	ii	id
4725 P	id	dd	id	id	id	ii	id	id	id	id
4728 M	id	id	id	ii	id	id	ii	id	id	id
4728 F	id	id	id	ii	id	ii	id	ii	ii	id
4728 P	ii	id	id	ii	id	ii	dd	ii	ii	ii
4731 M	id	id	ii	id	id	id	dd	id	dd	ii
4731 F	id	dd	ii	ii	ii	id	dd	ii	id	id
4731 P	id	id	ii	ii	ii	ii	dd	ii	id	dd
4763 M	id	id	dd	ii	id	ii	dd	id	dd	id
4763 F	id	id	dd	id	id	id	dd	dd	id	ii
4763 P	ii	dd	id	id	id	id	dd	id	ii	id
4764 M	ii	id	ii	ii	id	id	ii	ii	ii	dd
4764 F	ii	dd	ii	id	id	ii	ii	ii	ii	dd
4764 P	id	dd	ii	id	id	id	id	id	ii	dd
4766 M	ii	id	id	dd	dd	ii	id	dd	id	id
4766 F	id	ii	dd	dd	dd	ii	id	id	id	id
4766 P	id	id	id	dd	dd	ii	dd	ii	id	ii
4769 M	ii	id	id	ii	ii	id	dd	id	dd	ii
4769 F	ii	id	ii	ii	ii	ii	id	dd	dd	id
4769 P	id	id	ii	id	id	id	id	id	id	id
4771 M	ii	id	id	id	ii	ii	ii	id	ii	id
4771 F	ii	id	id	id	ii	ii	id	ii	id	id
4771 P	ii	id	dd	id	id	ii	dd	id	id	id
4773 M	ii	dd	id	ii	ii	ii	ii	id	ii	ii
4773 F	ii	id	ii	id	ii	ii	ii	dd	ii	ii
4773 P	ii	id	ii	id	id	id	id	id	ii	id

ID		Locus									
		M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
4774	M	ii	dd	ii	dd	ii	ii	dd	ii	dd	dd
4774	F	ii	dd	ii	dd	id	ii	dd	ii	dd	id
4774	P	ii	id	ii	id	id	id	dd	ii	dd	ii
4775	M	id	ii	id	id	id	dd	dd	ii	ii	ii
4775	F	id	ii	id	id	id	dd	dd	id	ii	id
4775	P	ii	ii	ii	id	id	id	dd	dd	id	id
4776	M	ii	dd	id	ii	id	id	dd	ii	dd	id
4776	F	ii	dd	id	ii	dd	id	dd	id	dd	id
4776	P	id	id	id	id	id	ii	dd	id	id	id
4778	M	id	id	ii	ii	dd	ii	ii	ii	id	id
4778	F	ii	id	ii	ii	id	id	id	ii	id	id
4778	P	ii	id	id	ii	ii	id	dd	id	ii	id
4779	M	id	id	id	ii	id	ii	dd	ii	id	dd
4779	F	id	dd	ii	id	id	ii	id	ii	id	dd
4779	P	ii	dd	ii	dd	id	ii	ii	ii	id	dd
4800	M	id	id	dd	ii	id	id	id	ii	ii	dd
4800	F	id	id	id	ii	ii	dd	id	ii	id	dd
4800	P	ii	ii	ii	id	ii	id	id	ii	dd	dd
4801	M	ii	id	ii	id	ii	ii	id	id	dd	dd
4801	F	ii	dd	id	id	id	id	ii	dd	id	id
4801	P	ii	dd	dd	id	dd	id	id	dd	id	ii
4851	M	ii	ii	id	ii	ii	id	ii	ii	id	dd
4851	F	ii	id	ii	ii	ii	ii	id	ii	dd	dd
4851	P	ii	id	id	id	ii	ii	dd	ii	dd	id
4860	M	ii	dd	dd	id	ii	ii	dd	id	id	ii
4860	F	ii	id	id	dd	ii	ii	id	ii	ii	ii
4860	P	ii	id	ii	id	ii	ii	ii	ii	id	ii
4862	M	ii	id	ii	ii	id	ii	dd	id	id	ii
4862	F	ii	ii	id	id	id	ii	dd	id	id	ii
4862	P	ii	id	id	id	id	ii	dd	ii	id	id
4877	M	ii	dd	id	id	ii	id	id	ii	id	id
4877	F	id	dd	id	ii	id	ii	dd	ii	dd	dd
4877	P	id	dd	ii	id	id	ii	dd	ii	id	id
4906	M	ii	id	ii	id	id	id	ii	ii	id	ii
4906	F	ii	ii	ii	dd	ii	id	ii	id	dd	id
4906	P	ii	id	ii	id	id	ii	id	id	dd	id
4910	M	id	ii	id	ii	id	ii	id	ii	dd	id
4910	F	id	id	ii	id	id	ii	dd	ii	id	dd
4910	P	id	dd	ii	id	dd	ii	dd	ii	id	dd
4957	M	ii	ii	dd	ii	id	ii	dd	id	id	id
4957	F	ii	ii	dd	ii	id	id	id	dd	id	dd
4957	P	ii	ii	dd	ii	id	dd	id	id	dd	id
4960	M	ii	ii	id	ii	id	id	id	ii	id	ii
4960	F	id	ii	id	ii	id	ii	id	ii	dd	id
4960	P	dd	id	ii	ii	id	ii	dd	ii	dd	dd

ID		Locus									
		M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
4969	M	id	id	ii	id	ii	ii	dd	id	id	ii
4969	F	ii	id	ii	id	id	ii	dd	id	ii	id
4969	P	ii	id	ii	ii	id	ii	dd	id	ii	id
4973	M	id	id	ii	id	dd	id	id	id	ii	id
4973	F	ii	ii	ii	id	dd	ii	id	dd	id	id
4973	P	ii	id	id	ii	dd	ii	dd	dd	id	dd
4975	M	ii	ii	ii	id	ii	ii	dd	dd	dd	dd
4975	F	ii	id	ii	id	na	ii	id	dd	id	id
4975	P	ii	id	ii	id	dd	id	id	id	ii	ii
4978	M	id	ii	ii	ii	id	ii	id	ii	id	dd
4978	F	id	ii	ii	ii	ii	ii	dd	ii	dd	id
4978	P	id	ii	id	ii	ii	id	dd	ii	dd	ii
4981	M	id	id	id	ii	ii	ii	id	ii	id	dd
4981	F	dd	ii	dd	ii	ii	id	ii	ii	id	id
4981	P	id	id	id	id	id	id	id	id	ii	id
4985	M	id	id	id	ii	id	ii	dd	id	dd	id
4985	F	id	ii	id	id	id	id	dd	dd	id	ii
4985	P	id	ii	dd	dd	ii	id	dd	id	ii	ii
4986	M	id	id	id	id	ii	ii	id	id	id	ii
4986	F	id	ii	id	id	ii	ii	id	ii	dd	id
4986	P	id	ii	id	id	ii	ii	id	id	id	dd
4994	M	ii	id	ii	id	ii	ii	id	dd	ii	id
4994	F	id	dd	ii	ii	ii	ii	dd	dd	ii	id
4994	P	id	dd	id	id	ii	ii	dd	dd	id	id
5010	M	id	id	id	id	dd	id	dd	id	id	id
5010	F	dd	ii	id	ii	dd	id	dd	ii	id	id
5010	P	id	id	id	ii	id	id	id	id	id	id
5017	M	ii	id	id	ii	id	ii	id	ii	ii	id
5017	F	ii	dd	id	ii	id	ii	id	id	id	dd
5017	P	ii	id	ii	id	ii	ii	dd	id	dd	id
5023	M	ii	id	id	ii	ii	ii	id	ii	id	ii
5023	F	ii	dd	dd	ii	ii	ii	ii	id	id	id
5023	P	id	dd	id	id	id	ii	ii	dd	ii	dd
5024	M	dd	dd	dd	dd	id	ii	dd	ii	id	id
5024	F	id	dd	dd	id	ii	ii	id	ii	id	dd
5024	P	ii	id	id	ii	id	ii	id	id	id	dd
5025	M	ii	dd	ii	ii	id	id	id	id	dd	id
5025	F	ii	dd	id	ii	ii	id	id	dd	dd	dd
5025	P	ii	dd	dd	id	ii	id	dd	dd	dd	dd
5028	M	dd	ii	id	id	ii	ii	dd	dd	id	dd
5028	F	id	id	ii	ii	ii	ii	dd	id	ii	dd
5028	P	ii	dd	ii	id	ii	ii	dd	id	ii	dd
5029	M	ii	ii	id	id	id	ii	id	ii	dd	ii
5029	F	id	ii	ii	dd	id	ii	dd	ii	dd	ii
5029	P	id	ii	ii	id	ii	ii	id	ii	id	ii

ID		Locus									
		M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
5030	M	ii	ii	id	id	id	id	dd	dd	id	dd
5030	F	ii	ii	id	id	id	id	dd	dd	id	dd
5030	P	ii	ii	id	dd	ii	ii	dd	id	ii	dd
5031	M	ii	dd	id	id	ii	ii	dd	id	ii	dd
5031	F	id	id	dd	id	id	id	id	dd	id	id
5031	P	dd	id	id	ii	id	id	id	id	id	ii
5032	M	ii	dd	id	ii	dd	ii	ii	id	id	id
5032	F	ii	dd	ii	ii	dd	id	id	id	id	dd
5032	P	ii	id	id	ii	id	id	id	id	id	id
5034	M	ii	dd	ii	dd	id	dd	id	ii	ii	id
5034	F	ii	id	id	id	ii	dd	id	na	ii	ii
5034	P	ii	id	id	id	id	id	dd	id	ii	ii
5036	M	ii	dd	id	ii	id	ii	id	dd	ii	id
5036	F	id	dd	ii	ii	id	ii	id	id	ii	id
5036	P	id	dd	id	ii	dd	ii	dd	ii	ii	id
5038	M	id	id	ii	ii	ii	ii	dd	id	id	ii
5038	F	id	id	id	ii	id	ii	dd	ii	ii	ii
5038	P	ii	ii	id	ii	dd	ii	dd	ii	id	ii
5045	M	id	id	id	id	ii	ii	ii	dd	ii	dd
5045	F	id	dd	id	id	ii	id	id	id	ii	id
5045	P	ii	id	id	ii	ii	id	id	ii	ii	ii
5049	M	id	id	id	ii	ii	ii	ii	id	ii	id
5049	F	id	id	id	ii	id	ii	id	ii	id	dd
5049	P	ii	ii	ii	ii	id	id	dd	id	dd	id
5050	M	ii	ii	id	id	id	ii	id	id	id	ii
5050	F	ii	ii	id	dd	ii	ii	dd	dd	ii	id
5050	P	ii	ii	id	id	ii	ii	dd	dd	ii	dd
5051	M	dd	dd	ii	ii	id	ii	id	id	id	id
5051	F	id	dd	id	ii	id	id	dd	ii	id	ii
5051	P	id	id	dd	id	id	dd	id	ii	ii	id
5053	M	id	ii	dd	ii	na	ii	dd	id	id	id
5053	F	ii	ii	id	ii	dd	ii	dd	id	dd	id
5053	P	ii	ii	ii	id	id	ii	id	id	dd	dd
5054	M	ii	id	id	ii	ii	ii	dd	id	dd	id
5054	F	ii	ii	ii	ii	id	ii	dd	dd	id	dd
5054	P	ii	ii	id	ii	id	ii	dd	dd	ii	dd
5055	M	id	id	ii	id	ii	ii	id	ii	dd	id
5055	F	ii	id	ii	id	id	id	dd	id	dd	ii
5055	P	ii	ii	id	ii	id	dd	id	id	id	ii
5058	M	ii	id	id	id	dd	ii	id	id	ii	id
5058	F	ii	id	ii	id	dd	ii	id	id	ii	id
5058	P	ii	id	ii	ii	id	ii	dd	id	ii	dd
5059	M	ii	id	ii	ii	ii	id	id	ii	id	ii
5059	F	ii	dd	na	ii	ii	id	id	id	id	id
5059	P	ii	dd	dd	id	id	id	dd	id	id	id

ID		Locus									
		M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
5060	M	dd	id	id	id	ii	ii	id	id	id	dd
5060	F	id	ii	id	dd	id	ii	dd	id	id	id
5060	P	ii	ii	ii	dd	id	ii	id	dd	ii	id
5062	M	ii	id	id	id	dd	ii	ii	ii	id	id
5062	F	ii	id	ii	id	id	ii	ii	ii	id	id
5062	P	ii	id	ii	id	ii	ii	id	id	dd	id
5065	M	ii	id	id	dd	ii	ii	dd	ii	id	ii
5065	F	ii	id	id	id	ii	ii	dd	ii	dd	ii
5065	P	ii	id	ii	ii	ii	ii	dd	id	id	id
5069	M	id	id	ii	id	id	id	dd	ii	ii	dd
5069	F	ii	ii	id	id	id	id	dd	id	id	dd
5069	P	id	id	dd	ii	dd	id	id	id	dd	dd
5070	M	id	id	ii	dd	id	ii	id	ii	ii	ii
5070	F	ii	id	id	dd	ii	ii	dd	ii	id	ii
5070	P	ii	id	dd	dd	ii	id	dd	id	dd	id
5072	M	ii	ii	dd	ii	dd	dd	id	id	id	dd
5072	F	ii	id	id	ii	id	id	id	id	ii	dd
5072	P	id	dd	id	id	id	ii	ii	dd	id	dd
5076	M	ii	dd	id	id	id	id	dd	id	na	dd
5076	F	ii	id	ii	id	ii	ii	dd	id	id	dd
5076	P	ii	ii	ii	id	ii	ii	dd	ii	dd	id
5078	M	id	id	id	id	id	dd	id	id	id	ii
5078	F	id	id	ii	id	id	id	ii	id	id	id
5078	P	ii	id	ii	id	ii	ii	ii	id	ii	id
5079	M	ii	ii	id	id	ii	ii	id	ii	dd	id
5079	F	ii	id	id	dd	ii	ii	dd	ii	dd	dd
5079	P	ii	dd	ii	id	id	ii	dd	id	id	id
5080	M	ii	ii	id	id	dd	dd	id	id	dd	ii
5080	F	ii	ii	dd	id	dd	id	dd	ii	id	ii
5080	P	ii	id	dd	id	id	ii	id	id	ii	id
5082	M	ii	id	ii	ii	id	ii	dd	ii	id	id
5082	F	ii	dd	ii	ii	id	ii	dd	id	id	id
5082	P	ii	dd	id	ii	ii	ii	dd	dd	dd	dd
5083	M	ii	id	id	id	ii	ii	id	id	ii	id
5083	F	ii	id	id	ii	ii	id	ii	dd	ii	dd
5083	P	ii	id	dd	ii	ii	id	id	dd	id	id
5084	M	ii	id	ii	ii	id	ii	dd	id	ii	id
5084	F	ii	id	ii	ii	ii	ii	dd	ii	ii	id
5084	P	ii	dd	id	ii	ii	ii	dd	id	ii	dd
5087	M	id	ii	id	id	ii	id	dd	dd	dd	id
5087	F	ii	ii	ii	ii	id	ii	dd	dd	id	id
5087	P	id	ii	id	ii	id	id	id	id	id	ii
5088	M	ii	id	id	id	id	ii	id	id	dd	ii
5088	F	id	dd	dd	ii	dd	ii	dd	dd	id	ii
5088	P	id	dd	id	ii	dd	ii	id	dd	id	ii

ID		Locus									
		M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22
5089	M	id	dd	dd	id	dd	ii	dd	id	id	id
5089	F	ii	dd	dd	ii	dd	ii	id	dd	dd	ii
5089	P	ii	dd	id	ii	dd	id	id	dd	id	id
5090	M	ii	id	id	ii	dd	id	dd	id	id	id
5090	F	id	ii	id	ii	dd	id	dd	id	ii	dd
5090	P	id	ii	ii	ii	id	ii	dd	dd	ii	id
5091	M	ii	id	id	id	id	ii	dd	id	ii	ii
5091	F	ii	id	id	id	id	ii	id	na	ii	ii
5091	P	ii	id	ii	dd	ii	ii	ii	dd	id	ii
5094	M	ii	id	id	id	ii	ii	id	ii	id	id
5094	F	ii	dd	dd	id	ii	ii	ii	ii	id	id
5094	P	ii	dd	id	id	id	ii	id	id	id	dd
5095	M	ii	id	ii	dd	id	ii	dd	ii	ii	id
5095	F	ii	id	ii	dd	id	ii	dd	id	ii	id
5095	P	ii	id	ii	id	id	ii	dd	dd	ii	dd
5097	M	ii	ii	id	id	ii	id	dd	dd	dd	id
5097	F	ii	id	dd	id	id	id	dd	id	id	dd
5097	P	id	id	dd	dd	dd	id	dd	id	id	dd
5100	M	id	id	id	dd	ii	ii	id	id	ii	id
5100	F	id	dd	ii	id	ii	id	id	id	ii	dd
5100	P	dd	dd	id	ii	ii	id	id	ii	id	dd

APÊNDICE B. ÍNDICE DE PATERNIDADE (IP) E PROBABILIDADE DE PATERNIDADE (W)
CALCULADOS SEGUNDO EQUAÇÕES CONSTANTES NO ANEXO 6.

Trio	IP										W
	M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22	
4711	2,3878	2,0000	1,2700	1,5024	1,2620	4,7059	3,1686	2,3359	2,0000	2,0000	0,9994
4714	1,2649	1,0000	1,6496	1,5024	1,2620	1,2698	1,5843	0,8743	2,1200	1,9755	0,9668
4717	1,2649	2,0000	1,6496	1,5024	2,5240	2,3529	1,5843	2,0000	2,1200	2,0251	0,9980
4723	2,0000	2,0000	2,5400	1,5024	1,6562	1,2698	1,4611	0,8743	2,1200	2,0000	0,9943
4725	2,3878	2,0000	0,8248	1,4952	2,0000	1,2698	0,7306	2,0000	0,9464	0,9878	0,9533
4728	1,2649	2,0000	2,0002	1,5024	2,0000	1,2698	1,4611	1,7486	1,8929	2,0251	0,9947
4731	2,0000	1,0000	1,6496	1,5024	1,6562	1,2698	1,4611	1,7486	0,9464	1,9755	0,9803
4763	1,2649	2,0000	1,2700	1,4952	2,0000	2,3529	1,4611	1,1680	1,8929	1,0126	0,9867
4764	0,6324	2,0000	1,6496	1,4952	2,0000	0,6349	1,5843	0,8743	1,8929	1,9755	0,9535
4766	2,3878	1,0000	1,2700	2,9904	2,5240	1,2698	1,4611	1,7486	2,0000	2,0251	0,9967
4769	0,6324	2,0000	1,6496	0,7512	0,8281	0,6349	1,5843	1,1680	1,0600	0,9878	0,6149
4771	1,2649	2,0000	2,5400	2,0000	0,8281	1,2698	1,4611	0,8743	1,0600	2,0000	0,9734
4773	1,2649	1,0000	1,6496	1,4952	0,8281	0,6349	1,5843	1,1680	1,8929	1,0126	0,8533
4774	1,2649	1,0000	1,6496	1,4952	1,2620	0,6349	1,4611	1,7486	2,1200	2,0251	0,9648
4775	1,2649	2,0000	1,6496	2,0000	2,0000	2,3529	1,4611	2,3359	0,9464	0,9878	0,9921
4776	0,6324	1,0000	2,0002	0,7512	1,2620	1,2698	1,4611	1,1680	1,0600	2,0000	0,8464
4778	1,2649	2,0000	0,8248	1,5024	1,6562	2,3529	1,4611	0,8743	1,8929	2,0000	0,9834
4779	1,2649	2,0000	1,6496	2,9904	2,0000	1,2698	3,1686	1,7486	2,0000	1,9755	0,9986
4800	1,2649	2,0000	1,6496	0,7512	1,6562	2,3529	2,0000	1,7486	2,1200	1,9755	0,9944
4801	1,2649	2,0000	2,5400	2,0000	2,5240	2,3529	1,5843	2,3359	0,9464	2,0251	0,9982
4851	1,2649	1,0000	0,8248	0,7512	1,6562	1,2698	1,4611	1,7486	2,1200	0,9878	0,8981
4860	1,2649	1,0000	1,6496	1,4952	1,6562	1,2698	3,1686	1,7486	0,9464	2,0251	0,9859
4862	1,2649	1,0000	1,2700	1,4952	2,0000	1,2698	1,4611	1,7486	2,0000	1,0126	0,9693
4877	2,3878	2,0000	1,6496	0,7512	1,2620	1,2698	1,4611	1,7486	1,0600	0,9878	0,9621
4906	1,2649	1,0000	1,6496	1,4952	0,8281	1,2698	1,5843	1,1680	2,1200	0,9878	0,9271
4910	2,0000	2,0000	1,6496	1,4952	2,5240	1,2698	1,4611	1,7486	0,9464	1,9755	0,9934
4957	1,2649	2,0000	2,5400	1,5024	2,0000	4,7059	1,5843	1,1680	2,1200	0,9878	0,9972
4960	4,7755	1,0000	1,6496	1,5024	2,0000	1,2698	1,4611	1,7486	2,1200	1,9755	0,9969
4969	1,2649	2,0000	1,6496	1,5024	1,2620	1,2698	1,4611	2,0000	1,8929	0,9878	0,9821
4973	1,2649	1,0000	0,8248	1,5024	2,5240	1,2698	1,4611	2,3359	1,0600	1,9755	0,9729
4975	1,2649	1,0000	1,6496	2,0000	-	0,6349	1,5843	1,1680	1,8929	2,0251	0,9495
4978	2,0000	2,0000	0,8248	1,5024	1,6562	0,6349	1,4611	1,7486	2,1200	2,0251	0,9828
4981	2,3878	1,0000	1,2700	0,7512	0,8281	2,3529	1,5843	0,8743	1,8929	1,0126	0,9218
4985	2,0000	2,0000	2,5400	2,9904	1,6562	2,3529	1,4611	1,1680	1,8929	2,0251	0,9987
4986	2,0000	2,0000	2,0002	2,0000	1,6562	1,2698	2,0000	0,8743	1,0600	1,9755	0,9919
4994	2,3878	2,0000	0,8248	0,7512	1,6562	1,2698	1,4611	2,3359	0,9464	2,0000	0,9757
5010	2,3878	1,0000	2,0002	1,5024	1,2620	2,0000	0,7306	0,8743	2,0000	2,0000	0,9788
5017	1,2649	1,0000	1,6496	0,7512	1,6562	1,2698	1,4611	1,1680	2,1200	0,9878	0,9218
5023	0,6324	2,0000	1,2700	0,7512	0,8281	1,2698	3,1686	2,3359	1,8929	1,9755	0,9723
5024	1,2649	1,0000	1,2700	1,5024	0,8281	1,2698	1,5843	0,8743	2,0000	1,9755	0,9328
5025	1,2649	2,0000	2,5400	0,7512	1,6562	2,0000	1,4611	2,3359	2,1200	1,9755	0,9956
5028	1,2649	2,0000	1,6496	0,7512	1,6562	1,2698	1,4611	0,8743	1,8929	1,9755	0,9692

Trio	IP										W
	M1	M2	M6	L8	M9	M12	M13	M17	L19	L22	
5029	2,3878	2,0000	1,6496	1,4952	1,6562	1,2698	0,7306	1,7486	1,0600	2,0251	0,9855
5030	1,2649	2,0000	2,0002	2,9904	1,6562	1,2698	1,4611	1,1680	1,8929	1,9755	0,9951
5031	4,7755	1,0000	1,2700	1,5024	1,2620	2,3529	1,5843	1,1680	1,0600	2,0251	0,9908
5032	1,2649	1,0000	0,8248	1,5024	1,2620	2,3529	0,7306	2,0000	2,0000	0,9878	0,9307
5034	1,2649	1,0000	1,2700	0,7512	0,8281	2,3529	1,4611	-	1,8929	2,0251	0,9294
5036	2,3878	2,0000	0,8248	1,5024	2,5240	1,2698	1,4611	1,7486	1,8929	2,0000	0,9946
5038	1,2649	2,0000	1,2700	1,5024	2,5240	1,2698	1,4611	1,7486	0,9464	2,0251	0,9870
5045	1,2649	1,0000	2,0002	1,5024	1,6562	2,3529	0,7306	1,7486	1,8929	2,0251	0,9864
5049	1,2649	2,0000	1,6496	1,5024	1,2620	0,6349	1,4611	0,8743	2,1200	0,9878	0,9307
5050	1,2649	2,0000	2,0002	1,4952	1,6562	1,2698	1,4611	2,3359	1,8929	1,9755	0,9951
5051	0,6324	1,0000	2,5400	0,7512	2,0000	4,7059	0,7306	1,7486	1,8929	1,0126	0,9653
5053	1,2649	2,0000	1,6496	0,7512	-	1,2698	0,7306	2,0000	2,1200	1,9755	0,9606
5054	1,2649	2,0000	0,8248	1,5024	1,2620	1,2698	1,4611	2,3359	1,8929	1,9755	0,9846
5055	1,2649	2,0000	0,8248	1,5024	1,2620	4,7059	0,7306	1,1680	1,0600	2,0251	0,9715
5058	1,2649	2,0000	1,6496	1,5024	1,2620	1,2698	1,4611	2,0000	1,8929	1,9755	0,9910
5059	1,2649	2,0000	-	0,7512	0,8281	2,0000	1,4611	1,1680	2,0000	0,9878	0,9139
5060	1,2649	2,0000	1,6496	2,9904	1,2620	1,2698	0,7306	2,3359	1,8929	1,0126	0,9849
5062	1,2649	2,0000	1,6496	2,0000	1,6562	1,2698	1,5843	0,8743	2,1200	2,0000	0,9904
5065	1,2649	2,0000	1,6496	1,5024	1,6562	1,2698	1,4611	0,8743	1,0600	1,0126	0,9476
5069	0,6324	1,0000	2,5400	1,5024	2,5240	2,0000	0,7306	1,1680	2,1200	1,9755	0,9775
5070	1,2649	2,0000	2,5400	2,9904	1,6562	0,6349	1,4611	0,8743	2,1200	1,0126	0,9823
5072	0,6324	2,0000	0,8248	0,7512	0,8281	1,2698	3,1686	2,3359	0,9464	1,9755	0,9194
5076	1,2649	2,0000	1,6496	2,0000	1,6562	1,2698	1,4611	1,7486	-	0,9878	0,9779
5078	1,2649	2,0000	1,6496	2,0000	1,6562	1,2698	3,1686	2,0000	1,8929	0,9878	0,9952
5079	1,2649	2,0000	1,6496	1,4952	0,8281	1,2698	1,4611	0,8743	1,0600	0,9878	0,8977
5080	1,2649	1,0000	2,5400	2,0000	1,2620	1,2698	0,7306	0,8743	1,8929	1,0126	0,9265
5082	1,2649	2,0000	0,8248	1,5024	1,6562	1,2698	1,4611	2,3359	2,1200	1,9755	0,9895
5083	1,2649	2,0000	2,5400	1,5024	1,6562	2,3529	1,5843	2,3359	0,9464	0,9878	0,9924
5084	1,2649	2,0000	0,8248	1,5024	1,6562	1,2698	1,4611	0,8743	1,8929	1,9755	0,9692
5087	0,6324	2,0000	0,8248	1,5024	1,2620	0,6349	0,7306	1,1680	0,9464	2,0251	0,6726
5088	2,3878	2,0000	1,2700	1,5024	2,5240	1,2698	0,7306	2,3359	0,9464	2,0251	0,9896
5089	1,2649	2,0000	1,2700	1,5024	2,5240	0,6349	1,5843	2,3359	1,0600	1,0126	0,9685
5090	2,3878	2,0000	1,6496	1,5024	1,2620	1,2698	1,4611	2,3359	1,8929	0,9878	0,9918
5091	1,2649	2,0000	1,6496	2,9904	1,6562	1,2698	3,1686	-	0,9464	2,0251	0,9938
5094	1,2649	2,0000	1,2700	2,0000	0,8281	1,2698	1,5843	0,8743	2,0000	1,9755	0,9737
5095	1,2649	2,0000	1,6496	1,4952	2,0000	1,2698	1,4611	2,3359	1,8929	1,9755	0,9951
5097	0,6324	1,0000	2,5400	2,9904	2,5240	2,0000	1,4611	0,8743	0,9464	1,9755	0,9830
5100	4,7755	2,0000	0,8248	1,5024	1,6562	2,3529	2,0000	1,7486	0,9464	1,9755	0,9967

APÊNDICE C. PROBABILIDADE DE PATERNIDADE (W) PARA TRIOS MÃE-FILHO-SUPOSTO PAI, SENDO O SUPOSTO PAI NÃO CORRESPONDENTE AO PAI BIOLÓGICO E NÃO EXCLUÍDO.

ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W
4711	4981	0,9793	4728	4877	0,9838	4763	5059	0,9867
4711	5010	0,9901	4728	4910	0,9870	4764	4725	0,8368
4711	5031	0,9951	4728	4969	0,9872	4764	4769	0,7195
4711	5069	0,9976	4728	4975	0,9248	4764	4773	0,9112
4714	4769	0,4765	4728	4981	0,9486	4764	4779	0,9970
4714	4906	0,8793	4728	4986	0,9379	4764	4981	0,7195
4714	5010	0,6882	4728	5010	0,9486	4764	5078	0,9714
4714	5024	0,9464	4728	5024	0,9584	4764	5094	0,9535
4714	5032	0,8153	4728	5028	0,9692	4766	4776	0,9738
4714	5053	0,9668	4728	5029	0,9623	4766	4981	0,9601
4714	5069	0,9573	4728	5031	0,9781	4766	5097	0,9932
4717	4711	0,9867	4728	5032	0,9211	4769	4714	0,9808
4717	4769	0,9406	4728	5034	0,9594	4769	4725	0,6148
4717	5010	0,9406	4728	5036	0,9973	4769	4906	0,9274
4717	5032	0,9694	4728	5038	0,9917	4769	4986	0,8646
4717	5055	0,9922	4728	5045	0,9751	4769	5010	0,6148
4717	5087	0,9694	4728	5058	0,9870	4769	5024	0,9274
4717	5089	0,9867	4728	5059	0,9368	4769	5032	0,7615
4723	4725	0,8446	4728	5065	0,9696	4769	5053	0,9623
4723	4771	0,9322	4728	5079	0,9506	4769	5062	0,9623
4723	4776	0,9157	4728	5080	0,9674	4769	5072	0,9274
4723	4851	0,9821	4728	5084	0,9871	4769	5094	0,8646
4723	4862	0,9322	4728	5087	0,9492	4771	4714	0,9463
4723	4978	0,9888	4728	5094	0,9202	4771	4723	0,9821
4723	4986	0,9148	4728	5100	0,9863	4771	4725	0,8781
4723	5010	0,8446	4731	4725	0,6088	4771	4731	0,9724
4723	5024	0,8716	4731	4763	0,8611	4771	4769	0,7482
4723	5031	0,9293	4731	4764	0,9515	4771	4774	0,9796
4723	5032	0,7746	4731	4769	0,7102	4771	4776	0,9351
4723	5059	0,8730	4731	4773	0,7561	4771	4800	0,9791
4723	5087	0,8462	4731	4776	0,6088	4771	4851	0,9957
4723	5094	0,7724	4731	4778	0,9254	4771	4862	0,9829
4723	5100	0,9809	4731	4862	0,6631	4771	4877	0,9596
4725	4764	0,9961	4731	4877	0,9256	4771	4906	0,9596
4725	4769	0,9699	4731	4969	0,8873	4771	4978	0,9777
4725	4776	0,9533	4731	4981	0,7102	4771	4986	0,9343
4725	4877	0,9862	4731	5010	0,7102	4771	5010	0,7302
4725	4910	0,9945	4731	5024	0,6631	4771	5017	0,9896
4725	4981	0,9699	4731	5028	0,9692	4771	5024	0,9145
4725	4994	0,9753	4731	5032	0,6078	4771	5029	0,9601
4728	4725	0,9486	4731	5058	0,9403	4771	5032	0,8440
4728	4731	0,9901	4731	5065	0,8873	4771	5049	0,9470
4728	4763	0,9589	4731	5079	0,7974	4771	5053	0,9591
4728	4764	0,9376	4731	5084	0,9692	4771	5059	0,9482
4728	4769	0,8839	4731	5094	0,6631	4771	5062	0,9794
4728	4771	0,9674	4731	5100	0,9894	4771	5065	0,9728
4728	4773	0,9059	4763	4801	0,9947	4771	5070	0,9909
4728	4776	0,9736	4763	4981	0,9832	4771	5076	0,9948
4728	4778	0,9748	4763	4985	0,9987	4771	5079	0,9596
4728	4862	0,9790	4763	5034	0,9933	4771	5087	0,7326

ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W
4771	5094	0,9343	4778	5087	0,8877	4877	4776	0,8849
4773	4769	0,5925	4779	4725	0,9717	4877	4910	0,9902
4773	4981	0,5925	4779	4764	0,9848	4877	4960	0,9951
4773	5060	0,9894	4779	4769	0,9449	4877	5010	0,7936
4773	5078	0,9790	4779	4773	0,9112	4877	5069	0,9750
4773	5091	0,9947	4779	4906	0,9583	4906	4769	0,8334
4774	4725	0,6315	4779	4981	0,8902	4906	4986	0,9271
4774	4766	0,9648	4779	5062	0,9501	4906	5053	0,9807
4774	4769	0,4615	4779	5078	0,9714	4906	5062	0,9621
4774	4776	0,6315	4779	5094	0,9775	4910	4725	0,8821
4774	4862	0,8727	4800	4769	0,9465	4910	4763	0,9044
4774	4877	0,9320	4800	5010	0,9465	4910	4764	0,9677
4774	4906	0,8727	4800	5032	0,9179	4910	4769	0,7890
4774	5079	0,9320	4800	5049	0,9703	4910	4773	0,8255
4775	4769	0,9612	4800	5100	0,9970	4910	4776	0,8821
4775	4773	0,9691	4801	4711	0,9903	4910	4862	0,9044
4775	4778	0,9793	4801	4981	0,9442	4910	4877	0,9836
4775	4981	0,9836	4801	5010	0,8640	4910	4981	0,7890
4775	5010	0,9575	4801	5032	0,9270	4910	5028	0,9843
4775	5032	0,9345	4801	5089	0,9903	4910	5079	0,9498
4775	5083	0,9677	4851	4714	0,8981	4910	5094	0,9044
4775	5097	0,9965	4851	4725	0,3553	4957	4981	0,9076
4776	4714	0,9472	4851	4731	0,9463	4957	5010	0,9540
4776	4725	0,8463	4851	4769	0,2160	4957	5032	0,9765
4776	4769	0,7815	4851	4776	0,3553	4957	5069	0,9911
4776	4771	0,9333	4851	4862	0,6879	4957	5083	0,9928
4776	4801	0,9889	4851	4877	0,8151	4960	4723	0,9809
4776	4906	0,9008	4851	4906	0,6879	4960	4731	0,9852
4776	4973	0,9886	4851	5010	0,2160	4960	4769	0,8731
4776	5010	0,8966	4851	5017	0,8981	4960	4776	0,9242
4776	5024	0,9158	4851	5024	0,6879	4960	4986	0,9822
4776	5032	0,9455	4851	5032	0,3553	4960	5010	0,9434
4776	5059	0,9778	4851	5062	0,8151	4960	5069	0,9907
4776	5069	0,9775	4851	5065	0,8981	4969	4725	0,8203
4776	5079	0,9478	4851	5079	0,8151	4969	4763	0,9481
4776	5088	0,9781	4851	5094	0,6879	4969	4764	0,9481
4776	5089	0,9928	4860	4769	0,5212	4969	4769	0,8203
4776	5094	0,9158	4860	4773	0,8133	4969	4773	0,9481
4778	4763	0,9366	4860	4981	0,5212	4969	4775	0,9552
4778	4764	0,8794	4860	5029	0,9721	4969	4776	0,9013
4778	4769	0,8864	4860	5078	0,9721	4969	4862	0,9411
4778	4773	0,9366	4862	4766	0,9876	4969	4877	0,9411
4778	4774	0,9853	4862	4771	0,9863	4969	4910	0,9846
4778	4800	0,9849	4862	4776	0,9475	4969	4973	0,9846
4778	4978	0,9853	4862	4851	0,9652	4969	4981	0,8203
4778	4981	0,7869	4862	4981	0,8103	4969	5010	0,6317
4778	5010	0,8864	4862	4985	0,9912	4969	5024	0,9321
4778	5032	0,9398	4862	5034	0,9716	4969	5032	0,7743
4778	5034	0,9373	4862	5070	0,9845	4969	5036	0,9600
4778	5045	0,9836	4862	5080	0,9716	4969	5054	0,9846
4778	5049	0,9851	4877	4725	0,8849	4969	5058	0,9910
4778	5055	0,9693	4877	4769	0,6132	4969	5060	0,9846

ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W
4969	5079	0,9734	4985	5034	0,9915	5017	5065	0,9217
4969	5089	0,8890	4986	4714	0,9602	5017	5069	0,9742
4969	5090	0,9697	4986	4723	0,9772	5017	5072	0,9868
4969	5094	0,9481	4986	4731	0,9824	5017	5079	0,9343
4969	5095	0,9942	4986	4769	0,8640	5017	5082	0,9956
4973	4714	0,9801	4986	4771	0,9004	5017	5083	0,9613
4973	4717	0,9902	4986	4776	0,9184	5017	5089	0,9835
4973	4769	0,8922	4986	4800	0,9923	5017	5094	0,9793
4973	4775	0,9797	4986	4851	0,9827	5023	4725	0,8226
4973	4776	0,8581	4986	4862	0,9343	5023	4981	0,5231
4973	4906	0,9851	4986	4906	0,9414	5023	5010	0,6986
4973	5010	0,7566	4986	4960	0,9925	5023	5024	0,9488
4973	5024	0,9247	4986	5010	0,8526	5023	5032	0,8226
4973	5032	0,8615	4986	5017	0,9591	5023	5072	0,9737
4973	5049	0,9732	4986	5024	0,9360	5023	5080	0,8977
4973	5053	0,9924	4986	5032	0,7853	5023	5083	0,9737
4973	5087	0,8629	4986	5049	0,8981	5023	5094	0,9488
4975	4725	0,8245	4986	5053	0,9847	5024	4725	0,7763
4975	4769	0,7014	4986	5062	0,9698	5024	4981	0,4509
4975	4773	0,9038	4986	5065	0,8981	5024	5010	0,6344
4975	4981	0,7014	4986	5070	0,9643	5024	5032	0,7763
4975	5010	0,4687	4986	5076	0,9895	5024	5080	0,8679
4975	5032	0,6383	4994	4725	0,8340	5024	5094	0,9328
4975	5078	0,9741	4994	4764	0,9085	5025	4711	0,9865
4975	5088	0,9338	4994	4769	0,7153	5025	4723	0,9477
4975	5089	0,8759	4994	4776	0,8340	5025	4725	0,7562
4975	5091	0,9912	4994	4981	0,7153	5025	4771	0,8193
4978	4769	0,4719	4994	5010	0,7153	5025	4776	0,5312
4978	4774	0,9004	4994	5031	0,8358	5025	4994	0,9007
4978	4776	0,6412	5010	4769	0,9502	5025	5010	0,8301
4978	4851	0,9004	5010	4776	0,9671	5025	5024	0,9254
4978	4862	0,6933	5010	4960	0,9951	5025	5032	0,9072
4978	4906	0,6933	5010	4981	0,9563	5025	5059	0,9346
4978	5010	0,4719	5010	5031	0,9894	5025	5072	0,9516
4978	5017	0,9004	5010	5051	0,9924	5025	5082	0,9932
4978	5029	0,9662	5010	5069	0,9919	5025	5083	0,9874
4978	5031	0,8101	5010	5087	0,9894	5025	5094	0,9254
4978	5032	0,3610	5017	4714	0,9873	5028	4725	0,3298
4978	5049	0,9004	5017	4723	0,9477	5028	4731	0,9403
4978	5062	0,8188	5017	4725	0,9219	5028	4763	0,6631
4978	5065	0,9004	5017	4769	0,7087	5028	4764	0,6631
4978	5076	0,9731	5017	4771	0,9163	5028	4769	0,1974
4978	5087	0,7814	5017	4776	0,8117	5028	4773	0,4960
4981	5010	0,9614	5017	4906	0,9511	5028	4776	0,3298
4981	5031	0,9901	5017	4973	0,9886	5028	4778	0,7974
4981	5051	0,9895	5017	4994	0,9346	5028	4862	0,6631
4981	5087	0,9901	5017	5010	0,8551	5028	4877	0,7974
4985	4769	0,9500	5017	5024	0,9793	5028	4969	0,8873
4985	4773	0,9600	5017	5025	0,9864	5028	4981	0,1974
4985	4775	0,9897	5017	5032	0,9219	5028	5010	0,1974
4985	4975	0,9838	5017	5059	0,9163	5028	5024	0,6631
4985	4981	0,9787	5017	5062	0,9416	5028	5032	0,3298

ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W
5028	5058	0,9403	5034	5010	0,8184	5049	4910	0,9884
5028	5065	0,8873	5034	5032	0,9001	5049	4960	0,9975
5028	5079	0,7974	5034	5045	0,9863	5049	5010	0,8656
5028	5084	0,9692	5034	5051	0,9474	5049	5024	0,9422
5028	5094	0,6631	5034	5055	0,9863	5049	5032	0,8029
5029	4766	0,9904	5034	5083	0,9730	5049	5053	0,9307
5029	4769	0,8368	5034	5087	0,9474	5049	5059	0,8380
5029	4776	0,9112	5036	4725	0,9613	5049	5069	0,9849
5030	4714	0,9660	5036	4731	0,9835	5049	5079	0,8704
5030	4723	0,9477	5036	4764	0,9801	5049	5094	0,8907
5030	4769	0,9336	5036	4769	0,9256	5050	4769	0,3955
5030	4771	0,9821	5036	4776	0,9009	5050	4771	0,8896
5030	4773	0,9638	5036	4877	0,9864	5050	4773	0,7235
5030	4775	0,9956	5036	4910	0,9891	5050	4775	0,9128
5030	4776	0,9559	5036	4981	0,9256	5050	4776	0,7603
5030	4778	0,9757	5036	5010	0,9256	5050	4981	0,6133
5030	4906	0,9498	5036	5031	0,9618	5050	4986	0,9270
5030	4957	0,9939	5036	5100	0,9879	5050	5030	0,9951
5030	4969	0,9621	5038	4725	0,7892	5050	5060	0,9767
5030	4973	0,9939	5038	4728	0,9870	5050	5080	0,8896
5030	4981	0,9417	5038	4763	0,8256	5050	5095	0,9767
5030	4986	0,9729	5038	4771	0,9045	5051	4763	0,9653
5030	5010	0,9276	5038	4776	0,8822	5051	4778	0,9584
5030	5017	0,9691	5038	4862	0,9045	5051	4981	0,7766
5030	5024	0,9702	5038	4981	0,7892	5051	5010	0,8802
5030	5032	0,9624	5038	5010	0,7892	5051	5032	0,9363
5030	5049	0,9890	5038	5031	0,9470	5051	5034	0,9653
5030	5050	0,9963	5038	5032	0,7030	5051	5045	0,9787
5030	5053	0,9870	5038	5034	0,9045	5051	5059	0,9833
5030	5054	0,9960	5038	5036	0,9917	5053	4714	0,9606
5030	5058	0,9807	5038	5059	0,8256	5053	4717	0,9615
5030	5060	0,9902	5038	5080	0,9045	5053	4731	0,9141
5030	5062	0,9400	5038	5087	0,8822	5053	4769	0,6065
5030	5065	0,9569	5045	4763	0,9797	5053	4774	0,9161
5030	5069	0,9775	5045	4769	0,8873	5053	4775	0,9351
5030	5070	0,9913	5045	4773	0,9087	5053	4776	0,7550
5030	5080	0,9630	5045	4778	0,9732	5053	4800	0,9141
5030	5083	0,9818	5045	4981	0,9502	5053	4851	0,9151
5030	5090	0,9807	5045	5010	0,8776	5053	4862	0,8435
5030	5095	0,9927	5045	5031	0,9716	5053	4906	0,9250
5030	5097	0,9939	5045	5032	0,8193	5053	4973	0,9343
5031	5010	0,9641	5045	5034	0,9797	5053	4978	0,9161
5031	5087	0,9908	5045	5051	0,9898	5053	4986	0,7527
5032	4763	0,9622	5045	5059	0,9684	5053	5010	0,6065
5032	4764	0,9622	5049	4714	0,9641	5053	5017	0,9610
5032	4769	0,8704	5049	4725	0,8656	5053	5024	0,8589
5032	4773	0,9271	5049	4769	0,7264	5053	5029	0,8452
5032	4981	0,7606	5049	4771	0,9118	5053	5032	0,7550
5032	5010	0,8704	5049	4776	0,9280	5053	5038	0,9562
5032	5089	0,9843	5049	4862	0,9422	5053	5049	0,9801
5034	4778	0,9634	5049	4877	0,9550	5053	5062	0,9250
5034	4981	0,8184	5049	4906	0,8704	5053	5065	0,9610

ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W
5053	5076	0,9773	5058	5088	0,9782	5062	4714	0,9745
5053	5087	0,7574	5058	5089	0,9780	5062	4725	0,9240
5054	4769	0,3337	5058	5090	0,9848	5062	4764	0,9191
5054	4773	0,6670	5058	5094	0,9804	5062	4769	0,9240
5054	4775	0,8890	5058	5095	0,9942	5062	4773	0,9583
5054	4776	0,5004	5059	4711	0,9908	5062	4779	0,9965
5054	4969	0,9413	5059	4714	0,9513	5062	4800	0,9903
5054	4973	0,9697	5059	4723	0,8771	5062	4860	0,9975
5054	4981	0,3337	5059	4725	0,8217	5062	4906	0,9810
5054	5010	0,3337	5059	4763	0,9094	5062	4981	0,8519
5054	5024	0,8002	5059	4764	0,9322	5062	4986	0,9600
5054	5032	0,5004	5059	4769	0,7840	5062	5010	0,8203
5054	5058	0,9697	5059	4771	0,7711	5062	5024	0,9475
5054	5090	0,9697	5059	4773	0,8730	5062	5029	0,9899
5054	5095	0,9697	5059	4776	0,6274	5062	5032	0,9013
5055	4717	0,9927	5059	4778	0,9526	5062	5045	0,9722
5055	4769	0,9190	5059	4906	0,8301	5062	5053	0,9807
5055	4775	0,9891	5059	4969	0,8644	5062	5078	0,9946
5055	5010	0,8100	5059	4981	0,7746	5062	5087	0,8222
5055	5032	0,8950	5059	4994	0,9309	5062	5094	0,9600
5055	5049	0,9855	5059	5010	0,8789	5065	4723	0,9653
5055	5087	0,8950	5059	5017	0,8771	5065	4725	0,5781
5055	5089	0,9715	5059	5023	0,9651	5065	4769	0,3610
5058	4725	0,9620	5059	5024	0,9486	5065	4771	0,8744
5058	4728	0,9801	5059	5025	0,9890	5065	4774	0,9476
5058	4763	0,9737	5059	5028	0,9623	5065	4776	0,7326
5058	4764	0,9804	5059	5032	0,9356	5065	4851	0,9777
5058	4766	0,9800	5059	5058	0,9273	5065	4862	0,9164
5058	4769	0,9620	5059	5062	0,9072	5065	4877	0,8188
5058	4773	0,9902	5059	5065	0,9309	5065	4906	0,8188
5058	4775	0,9774	5059	5072	0,9669	5065	4978	0,9777
5058	4776	0,9487	5059	5078	0,9325	5065	5010	0,5781
5058	4779	0,9952	5059	5079	0,8707	5065	5017	0,9476
5058	4862	0,9700	5059	5080	0,8135	5065	5029	0,9004
5058	4877	0,9700	5059	5082	0,9913	5065	5032	0,7326
5058	4910	0,9846	5059	5083	0,9831	5065	5049	0,9004
5058	4969	0,9911	5059	5084	0,9808	5065	5059	0,7768
5058	4973	0,9846	5059	5094	0,9486	5065	5062	0,9004
5058	4975	0,9951	5059	5095	0,9273	5065	5076	0,9731
5058	4981	0,9620	5060	4766	0,9921	5065	5079	0,8188
5058	5010	0,9048	5060	4769	0,7872	5065	5087	0,7326
5058	5023	0,9893	5060	4771	0,9785	5069	4723	0,9477
5058	5024	0,9741	5060	4773	0,8750	5069	4771	0,9668
5058	5032	0,9500	5060	4774	0,9648	5069	4776	0,8793
5058	5034	0,9740	5060	4775	0,9719	5069	4957	0,9939
5058	5036	0,9798	5060	4776	0,9472	5069	4973	0,9822
5058	5038	0,9801	5060	4862	0,9691	5069	4986	0,9235
5058	5054	0,9846	5060	4906	0,9401	5069	5010	0,8117
5058	5060	0,9972	5060	4975	0,9655	5069	5024	0,9163
5058	5072	0,9788	5060	4981	0,8093	5069	5032	0,8961
5058	5079	0,9867	5060	5034	0,9714	5069	5070	0,9913
5058	5087	0,9059	5060	5080	0,9557	5069	5083	0,9662

ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W
5069	5097	0,9886	5076	5050	0,9834	5080	5038	0,9870
5070	4725	0,6339	5076	5053	0,9620	5080	5087	0,7030
5070	4771	0,9327	5076	5054	0,9569	5082	4714	0,9660
5070	4776	0,7760	5076	5058	0,9501	5082	4725	0,8717
5070	4851	0,9823	5076	5060	0,9567	5082	4763	0,9278
5070	4862	0,9327	5076	5062	0,9268	5082	4764	0,8639
5070	5059	0,8738	5076	5065	0,9501	5082	4769	0,7725
5072	4725	0,7550	5076	5090	0,9174	5082	4773	0,8654
5072	4731	0,9403	5076	5095	0,9673	5082	4776	0,8717
5072	4763	0,8182	5078	4714	0,9953	5082	4778	0,9141
5072	4764	0,9249	5078	4725	0,9906	5082	4906	0,9351
5072	4769	0,6064	5078	4764	0,9950	5082	4969	0,9809
5072	4773	0,8604	5078	4769	0,9906	5082	4973	0,9854
5072	4776	0,5295	5078	4773	0,9843	5082	4975	0,8915
5072	4778	0,9000	5078	4779	0,9986	5082	4981	0,6164
5072	4862	0,6631	5078	4800	0,9903	5082	4994	0,9574
5072	4877	0,7974	5078	4906	0,9929	5082	5010	0,7725
5072	4969	0,9474	5078	4981	0,9802	5082	5017	0,9598
5072	4981	0,6064	5078	4986	0,9943	5082	5024	0,9306
5072	4994	0,8402	5078	5010	0,9752	5082	5028	0,9768
5072	5010	0,6064	5078	5023	0,9978	5082	5032	0,8717
5072	5023	0,9580	5078	5024	0,9901	5082	5034	0,8668
5072	5024	0,9249	5078	5032	0,9614	5082	5058	0,9807
5072	5028	0,9863	5078	5053	0,9965	5082	5062	0,9226
5072	5032	0,7550	5078	5060	0,9955	5082	5065	0,9783
5072	5058	0,9730	5078	5062	0,9915	5082	5079	0,9819
5072	5065	0,9474	5078	5072	0,9980	5082	5084	0,9768
5072	5078	0,9750	5078	5089	0,9735	5082	5088	0,9720
5072	5079	0,9000	5078	5094	0,9925	5082	5089	0,9717
5072	5084	0,9863	5078	5100	0,9927	5082	5094	0,9306
5072	5094	0,9249	5079	4725	0,7268	5082	5095	0,9807
5072	5095	0,9546	5079	4769	0,3542	5083	4711	0,9903
5076	4714	0,9049	5079	4771	0,8711	5083	4764	0,9548
5076	4731	0,9433	5079	4776	0,7268	5083	4769	0,8408
5076	4769	0,6129	5079	4851	0,9770	5083	4773	0,9548
5076	4773	0,7600	5079	4862	0,9141	5083	4981	0,9276
5076	4775	0,9367	5079	4877	0,8977	5083	5010	0,9276
5076	4776	0,7600	5079	4906	0,8144	5083	5032	0,9624
5076	4778	0,8263	5079	5017	0,9461	5084	4725	0,4991
5076	4800	0,9568	5079	5059	0,8711	5084	4728	0,9700
5076	4851	0,9172	5079	5062	0,8977	5084	4731	0,9692
5076	4862	0,8470	5079	5070	0,9643	5084	4763	0,7994
5076	4906	0,8636	5079	5094	0,9141	5084	4764	0,6631
5076	4969	0,9049	5080	4728	0,9743	5084	4769	0,4991
5076	4981	0,4418	5080	4766	0,9742	5084	4773	0,7994
5076	4986	0,9268	5080	4771	0,9265	5084	4776	0,6658
5076	5010	0,3729	5080	4776	0,7591	5084	4778	0,9410
5076	5017	0,9620	5080	4862	0,9265	5084	4862	0,8885
5076	5024	0,8263	5080	4981	0,6117	5084	4877	0,8885
5076	5030	0,9870	5080	5010	0,3718	5084	4969	0,9696
5076	5032	0,5432	5080	5032	0,5420	5084	4981	0,4991
5076	5049	0,9049	5080	5034	0,9265	5084	4986	0,6631

ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W	ID M-F	ID SP	W
5084	5010	0,4991	5089	5088	0,9840	5095	4776	0,9275
5084	5024	0,7974	5090	4769	0,9107	5095	4975	0,9703
5084	5028	0,9692	5090	4776	0,9401	5095	4981	0,8648
5084	5029	0,8898	5090	4981	0,9611	5095	4986	0,8396
5084	5032	0,6658	5090	5010	0,9611	5095	4994	0,9549
5084	5034	0,8014	5090	5051	0,9848	5095	5028	0,9882
5084	5045	0,9417	5091	4725	0,9512	5095	5030	0,9882
5084	5058	0,9692	5091	4769	0,8894	5095	5034	0,9628
5084	5065	0,9696	5091	4773	0,9699	5095	5050	0,9882
5084	5079	0,8885	5091	4801	0,9843	5095	5060	0,9951
5084	5087	0,5022	5091	4860	0,9907	5095	5079	0,9808
5084	5094	0,6631	5091	4975	0,9878	5095	5094	0,9267
5087	4769	0,5035	5091	4981	0,9512	5097	4725	0,7545
5087	4773	0,8022	5091	5010	0,8799	5097	4763	0,9748
5087	4775	0,9419	5091	5029	0,9638	5097	4771	0,9248
5087	4776	0,6697	5091	5032	0,9361	5097	4776	0,7545
5087	4969	0,9701	5091	5045	0,9798	5097	4862	0,9248
5087	4973	0,9697	5091	5060	0,9897	5097	4981	0,8288
5087	4975	0,8915	5091	5078	0,9907	5097	5010	0,6451
5087	4981	0,5035	5091	5080	0,9900	5097	5024	0,8220
5087	5010	0,5035	5091	5083	0,9391	5097	5032	0,7843
5087	5024	0,8002	5091	5087	0,9361	5097	5036	0,9736
5087	5032	0,6697	5091	5088	0,9737	5097	5051	0,9785
5087	5034	0,8042	5091	5089	0,9487	5097	5059	0,9748
5087	5054	0,9846	5094	4725	0,9493	5097	5080	0,9248
5087	5058	0,9697	5094	4981	0,8158	5097	5094	0,9248
5087	5090	0,9848	5094	5010	0,7785	5100	4711	0,9926
5087	5095	0,9697	5094	5024	0,9328	5100	4763	0,9434
5088	4725	0,8565	5094	5032	0,8755	5100	4764	0,9931
5088	4776	0,8565	5094	5045	0,9642	5100	4769	0,9475
5088	4981	0,7491	5094	5080	0,9725	5100	4773	0,9580
5088	5010	0,7491	5095	4725	0,8648	5100	4778	0,9709
5088	5031	0,9227	5095	4763	0,9624	5100	4981	0,9475
5089	4725	0,7934	5095	4764	0,9267	5100	5010	0,9475
5089	4801	0,9840	5095	4769	0,8648	5100	5032	0,9195
5089	5010	0,6575	5095	4773	0,9624			
5089	5032	0,7934	5095	4775	0,9808			