

Estudo populacional de 6 STRs (TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820, D13S317 e D16S539) na região Centro de Portugal

Licínio Manco, Pedro Arede, Isabel Silva, Manuela Alvarez, Augusto Abade

Departamento de Antropologia
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra
lmanco@antrop.uc.pt

Resumo As frequências alélicas de 6 STRs autossômicos (TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820, D13S317 e D16S539), correntemente utilizados em estudos forenses, foram estimadas numa amostra de indivíduos não aparentados naturais da região Centro de Portugal (N=70-104). Não se verificaram desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para os marcadores estudados. Os resultados foram comparados com os obtidos em estudos realizados noutras regiões do país (Norte, Centro e Sul de Portugal, Madeira e Açores) e em diversas populações Europeias não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas para a maioria dos *loci*, o que mostra, por um lado, semelhança genética da região Centro de Portugal com estas populações e, por outro, a consistência dos resultados encontrados.

Palavras-chave Genética populacional; polimorfismos de DNA; STRs; Região Centro de Portugal.

Abstract Allele frequencies for six autosomal STRs (TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820, D13S317 and D16S539), currently used for genetic identity testing, were determined in a sample of healthy unrelated individuals from Central Portugal (N=70-104). All systems showed conformity with Hardy-Weinberg expectations. Comparison of allele frequencies between Central Portugal and population samples from other Portuguese regions (North, Center and South of Portugal, Madeira and Azores) and several European populations showed no significant differences for most loci which reveal genetic similarity as also robustness on results.

Key words Population genetics; DNA polymorphisms; STRs; Central Portugal.

Introdução

Microsatélites ou *Short Tandem Repeats* (STRs) são sequências repetitivas de DNA com unidades que variam de 2 a 6 pares de bases,

muito abundantes e aleatoriamente distribuídas no genoma humano. Os microssatélites são altamente polimórficos e, como tal, largamente utilizados como marcadores em áreas tão importantes como o mapeamento genético, a genética de populações e a investigação forense, sendo disponibilizados em *kits* comerciais *multiplex* destinados a testes de paternidade e à identificação individual. Em genética populacional, a informação facultada pelo estudo de STRs tem vindo a permitir elucidar muitos aspectos do processo evolutivo humano (Jorde *et al.*, 1997) e a definir a estrutura genética das populações humanas (Rosenberg *et al.*, 2002).

Diversos estudos de genética populacional utilizando microssatélites têm vindo a ser realizados em amostras da população Portuguesa, nomeadamente na região Norte de Portugal (Alves *et al.*, 2001; Amorim *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2005), Madeira (Fernandes *et al.*, 2002) e Açores (Velosa *et al.*, 2002). Todavia, na região Centro e Sul do país os estudos disponíveis utilizando STRs autossómicos são escassos (Fernandes e Brehm, 2002). No sentido de contribuir para minorar esta falta, foram utilizados 6 STRs (TH01, TPOX, CSF1PO, D13S317, D7S820 e D16S539), correntemente incluídos em *kits* comerciais destinados a estudos forenses, com o objectivo principal de estimar frequências alélicas numa amostra populacional da região Centro de Portugal. Os resultados foram comparados com os obtidos em estudos realizados noutras regiões do país e em diversas populações Europeias.

Material e Métodos

Foi estudada uma amostra populacional (N=70-104) de indivíduos não aparentados naturais da região Centro de Portugal (distritos localizados entre os rios Douro e Tejo). Todas as amostras foram colhidas após consentimento informado.

O DNA genómico foi extraído a partir de sangue total pelo método Chelex (Walsh *et al.*, 1991). As regiões do genoma que incluem os marcadores em estudo foram amplificadas por PCR *multiplex* utilizando os *primers* descritos para os *kits* GenePrint STR Multiplex System (Promega) (*loci* TH01, TPOX e CSF1PO) e GenePrint® SilverSTR® III System (Promega) (*loci* D7S820, D13S317 e D16S539), marcados com Cy5. Os produtos da amplificação foram submetidos a electroforese em gel de poliacrilamida 8% no sequenciador automático ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech).

O tamanho dos fragmentos foi determinado automaticamente utilizando o programa ALFwin Fragment Analyser 1.00.

Parâmetros estatísticos que incluíram valores de frequências alélicas e de heterozigotia observada e esperada, bem como o valor exacto de P (nível de significância = 0,05) para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Guo e Thompson, 1992) e a diferenciação entre populações (Raymond e Rousset, 1995), foram calculados recorrendo ao *software* Arlequin, vs 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>).

Resultados e Discussão

Os valores das frequências alélicas obtidos na região Centro de Portugal, bem como os valores de heterozigotia esperada e observada, encontram-se discriminados na Tabela 1. Não se verificaram desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para os marcadores em estudo.

Tabela 1. Frequências alélicas e outros parâmetros estatísticos estimados na amostra populacional da região Centro de Portugal para os 6 marcadores polimórficos autosómicos estudados.

Alelos	TH01 (N=104)	TPOX (N=97)	CSF1PO (N=91)	D7S820 (N=70)	D13S317 (N=72)	D16S539 (N=74)
6	0,163	0,005				
7	0,173			0,029		
8	0,130	0,552	0,005	0,179	0,132	0,027
9	0,231	0,046	0,017	0,164	0,069	0,115
9.3	0,293					
10	0,010	0,072	0,352	0,271	0,049	0,081
11		0,294	0,253	0,207	0,361	0,338
12		0,031	0,302	0,136	0,243	0,203
13			0,066	0,014	0,111	0,216
14			0,005		0,035	0,020
p	0,083	0,066	0,119	0,244	0,200	0,573
Ho	0,779	0,567	0,637	0,786	0,778	0,784
He	0,791	0,611	0,720	0,813	0,778	0,782

N: n° de indivíduos; p : equilíbrio de Hardy-Weinberg, teste exacto; **Ho**: heterozigotia observada; **He**: heterozigotia esperada.

O perfil genético (distribuição de alelos, valores de frequências alélicas e valores de heterozigotia) obtido para a amostra da região Centro de Portugal é semelhante ao obtido noutros estudos populacionais em diferentes regiões do país. Os valores de heterozigotia (H_e) variam entre 61,1%, para o *locus* TPOX, e 81,3%, para o marcador D7S820, valores semelhantes aos obtidos em diferentes regiões do continente português (Gusmão *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2001; Fernandes e Brehm, 2002; Pinheiro *et al.*, 2005).

O teste exacto de diferenciação com base nas frequências alélicas revelou não haver diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas obtidas na região Centro de Portugal e noutras amostras da população Portuguesa, nomeadamente da região Norte (Alves *et al.*, 2001; Amorim *et al.*, 2001; Fernandes e Brehm, 2002; Pinheiro *et al.*, 2005), Centro (Fernandes e Brehm, 2002), Sul (Fernandes e Brehm, 2002), Madeira (Fernandes *et al.*, 2002) e Açores (Vélosa *et al.*, 2002), com excepção do marcador TPOX relativamente à amostra populacional da Madeira e a uma amostra populacional da região Norte (Fernandes e Brehm, 2002) ($P < 0,05$) (Tabela 2). As frequências alélicas obtidas para os 6 *loci* foram também comparadas com as de outras populações Europeias, nomeadamente de Espanha – País Basco (Pérez-Miranda *et al.*, 2005) e Andaluzia (Pérez-Miranda e Herrera, 2005), Grécia (Kovatsi *et al.*, 2005), Polónia (Czarny *et al.*, 2005) e Itália (Garofano *et al.*, 1998), tendo sido obtidas diferenças estatisticamente significativas para diversos marcadores ($P < 0,05$). Todavia, após aplicação da correcção de Bonferroni (SISA), o nível de significância baixou para 0,0083 e foram apenas observados valores significativos para os *loci*: TPOX, na comparação com a população da Madeira ($P = 0,001 \pm 0,001$); D16S539, na comparação com as populações do País Basco – província de Navarra ($P = 0,0000 \pm 0,0000$), da Andaluzia ($P = 0,0036 \pm 0,001$) e da Polónia ($P = 0,0001 \pm 0,0001$); D13S317, na comparação com País Basco – província de Guipúzcoa ($P = 0,0049 \pm 0,0032$), e CSF1PO, na comparação com Andaluzia ($P = 0,000 \pm 0,000$) (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação das frequências alélicas obtidas na amostra populacional estudada na região Centro de Portugal com frequências alélicas de outras populações Portuguesas e Europeias (teste exacto P de diferenciação).

	D7S820	D13S317	D16S539	TH01	TPOX	CSF1PO	Ref
Norte de Portugal	0,915±0,012	0,873±0,009	0,115±0,018	0,644±0,023	0,204±0,037	0,860±0,008	Pinheiro <i>et al.</i> , 2005
Norte de Portugal	0,807±0,028	0,982±0,003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Amorim <i>et al.</i> , 2001
Norte de Portugal	n.d.	n.d.	n.d.	0,642±0,040	0,321±0,028	0,622±0,622	Alves <i>et al.</i> , 2001
Norte de Portugal				0,492±0,029	0,032±0,016		Fernandes e Brehm, 2002
Sul de Portugal	n.d.	n.d.	n.d.	0,297±0,032	0,142±0,027	n.d.	Fernandes e Brehm, 2002
Centro de Portugal	n.d.	n.d.	n.d.	0,475±0,040	0,126±0,022	n.d.	Fernandes e Brehm, 2002
Madeira	0,792±0,015	0,187±0,02	0,191±0,026	0,481±0,042	0,001±0,001	0,182±0,032	Fernandes <i>et al.</i> , 2002
Açores	0,394±0,027	0,795±0,018	0,647±0,019	0,203±0,034	0,111±0,016	0,187±0,024	Velosa <i>et al.</i> , 2002
Espanha (P.B.–Gui)	0,032±0,006	0,005±0,003	0,035±0,009	0,036±0,017	0,009±0,002	0,437±0,039	Pérez-Miranda <i>et al.</i> , 2005
Espanha (P.B.–Nav)	0,104±0,014	0,109±0,015	0,000±0,000	0,016±0,003	0,806±0,019	0,239±0,029	Pérez-Miranda <i>et al.</i> , 2005
Espanha (Andalucía)	0,546±0,016	0,050±0,008	0,004±0,001	0,029±0,011	0,241±0,024	0,000±0,000	Pérez-Miranda e Herrera, 2005
Grécia	0,503±0,025	0,787±0,017	0,061±0,010	0,061±0,013	0,093±0,019	0,022±0,006	Kovatsi <i>et al.</i> , 2005
Itália	0,451±0,033	0,573±0,045	0,287±0,023	0,069±0,031	0,069±0,027	0,353±0,044	Garofano <i>et al.</i> , 1998
Polónia	0,800±0,023	0,964±0,011	0,000±0,000	0,059±0,014	0,324±0,043	0,194±0,028	Czamy <i>et al.</i> , 2005

P.B.–Gui: País Basco – Guipúzcoa; P.B.–Nav: País Basco–Navarra; n.d.: valores não disponíveis.

Conclusão

Neste trabalho foi apresentado um estudo de diversidade genética na região Centro de Portugal com base em 6 marcadores autossómicos do tipo STR correntemente utilizados em estudos forenses. As frequências alélicas de 4 destes *loci* (CSF1PO, D7S820, D13S317 e D16S539) são aqui reportadas pela primeira vez numa amostra populacional da região Centro de Portugal, contribuindo assim para atenuar a falta de dados populacionais disponíveis na literatura respeitantes a esta região do país. Os resultados foram comparados com os obtidos noutros estudos realizados em Portugal e noutras populações Europeias não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas para a maioria dos *loci*, o que mostra, por um lado, semelhança genética da região Centro de Portugal com essas populações e, por outro, consistência nos resultados obtidos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado em parte pelo Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Agradecemos ao Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra, EPE, as facilidades concedidas na utilização do sequenciador ALFexpress.

Bibliografia

- Alves, C.; Gusmão, L.; Pereira, L.; Amorim, A. 2001. STR data (CD4, CSF1PO, F13A01, FES/FPS, MBPB, TH01, TPOX) from North Portugal. *Forensic Science International*, 123: 76-77.
- Amorim, A.; Gusmão, L.; Alves, C. 2001. STR data (AmpF/STR Profiler Plus) from North Portugal. *Forensic Science International*, 115: 119-121.
- Czarny, J.; Grzybowski, T.; Derenko, M. V.; Malyarchuk, B. A.; Sliwka, D. M. 2005. Genetic variation of 15 STR loci (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, and D19S433) in populations of north and central Poland. *Forensic Science International*, 147: 97-100.

- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Fernandes, A. T.; Brehm, A. F. 2002. Population data of five STRs in three regions from Portugal. *Forensic Science International*, 129: 72-74.
- Fernandes, A.T.; Brehm, A.; Alves, C.; Gusmão, L.; Amorim, A. 2002. Genetic profile of the Madeira Archipelago population using the new PowerPlex16 System Kit. *Forensic Science International*, 125: 281-283.
- Garofano, L.; Pizzamiglio, M.; Vecchio, C.; Lago, G.; Floris, T.; D'Errico, G.; Brembilla, G.; Romano, A.; Budowle, B. 1998. Italian population data on thirteen short tandem repeat loci: HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMVWFA31, HUMFIBRA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, D3S1358. *Forensic Science International*, 12: 53-60.
- Guo, S. W.; Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- Gusmão, L.; Sánchez-Diz, P.; Alves, C.; Lareu, M. V.; Carracedo, A.; Amorim, A. 2000. Genetic diversity of nine STRs in two northwest Iberian populations: Galicia and northern Portugal. *International Journal of Legal Medicine*, 114: 109-113.
- Jorde, L. B.; Rogers, A. R.; Bamshad, M.; Watkins, W. S.; Krakowiak, P.; Sung, S.; Kere, J.; Harpending, H. C. 1997. Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 3100-3103.
- Kovatsi, L.; Parsons, T. J.; Just, R. S.; Irwin, J. A. 2005. Genetic variation for 15 autosomal STR loci (PowerPlex 16) in a population sample from northern Greece. *Forensic Science International*, 159: 61-63.
- Pérez-Miranda, A. M.; Herrera, R. J. 2005. Genetic data on 13 STR loci in the Andalusian (South Spain) population. *Legal Medicine*, 7: 201-203.
- Pérez-Miranda, A. M.; Alfonso-Sánchez, M. A.; Kalantar, A.; García-Obregón, S.; de Pancorbo, M. M.; Peña, J. A.; Herrera, R. J. 2005. Microsatellite data support subpopulation structuring among Basques. *Journal of Human Genetics*, 50: 403-414.
- Pinheiro, M. F.; Cainé, L.; Pontes, L.; Abrantes, D.; Lima, G.; Pereira, M. J.; Rezende, P. 2005. Allele frequencies of sixteen STRs in the population of Northern Portugal. *Forensic Science International*, 148: 221-223.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283.

- Rosenberg, N. A.; Pritchard, J. K.; Weber, J. L.; Cann, H. M.; Kidd, K. K.; Zhivotovsky, L. A.; Feldman, M. W. 2002. Genetic structure of human populations. *Science*, 298: 2381-2385.
- Velosa, R. G.; Fernandes, A. T.; Brehm, A. 2002. Genetic profile of the Açores Archipelago population using the new PowerPlex 16 System Kit. *Forensic Science International*, 129: 68-71.
- Walsh, P. S.; Metzger, D. A.; Higuchi, R. 1991. CHELEX1 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10: 506-513.

Artigo recebido a 28 de Março de 2008 e aceite a 21 de Julho de 2008.