



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Rose Maria Saraiva Magalhães Hermida

**Estudo de ancestralidade através de marcadores genéticos
uniparentais**

Rio de Janeiro
2013

Rose Maria Saraiva Magalhães Hermida

Estudo de ancestralidade através de marcadores genéticos uniparentais



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

H554 Hermida, Rose Maria Saraiva Magalhães.
Estudo de ancestralidade através de marcadores genéticos uniparentais / Rose Maria Saraiva Magalhães Hermida. – 2013.
146 f. : il.

Orientador: Elizeu Fagundes de Carvalho.
Coorientadora: Dayse Aparecida da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biociências.

1. DNA mitocondrial - Análise - Teses. 2. População – Aspectos genéticos - Teses. 3. Genética população humana - Teses. 4. Haplotipos - Teses. I. Carvalho, Elizeu Fagundes de. II. Silva, Dayse Aparecida da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 575.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rose Maria Saraiva Magalhães Hermida

Estudo de ancestralidade através de marcadores genéticos uniparentais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de março de 2013.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

À Deus pela proteção e saúde por sempre guiar meus caminhos.

Ao meu pai, meu grande herói por todo amor e carinho. Por ser um exemplo de vida, me levando a seguir em frente sempre, se não fosse por você nada disso teria acontecido. Muito obrigada!

À minha mãe, minha melhor amiga, pelas palavras doces e sinceras e sempre me confortando nos momentos de desespero, amo muito você.

À minha irmã por ser minha grande companheira e pelos conselhos que foram bastante válidos.

Ao meu grande amor, Renato, pelo carinho, respeito e dedicação em todos esses anos de intensa convivência, por estar presente em todos os momentos da minha vida e principalmente por entender meus momentos de ausência e mau humor durante os dois últimos anos. Juntos, somos mais fortes, te amo e sempre vou te amar.

Ao mais novo membro da família, minha linda princesinha dudinha, mesmo sendo tão novinha já tem me dado muita força e mil desculpas pelos meus momentos de ausência e por tantas brincadeiras adiadas...mamãe sente tanto. Meu anjinho te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, por me dar a chance de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação, confiança e pela paciência em corrigir minha dissertação.

À Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva, por toda dedicação e ensinamentos passados.

Ao Prof Dr. Dalmo Azevedo, que mesmo sem me conhecer, sempre se mostrou solícito respondendo prontamente aos meus emails, tirando as minhas dúvidas. Muito obrigada por todas as dicas e pela paciência em me ensinar.

À Fê, a Jú e a Anna, pelos almocinhos, conversas, desabafos e fofocas. Por sempre me ajudarem, me apoiarem e pelo auxílio sempre que necessário.

Especialmente a Anna pela amizade e companheirismo envolvendo a vida acadêmica, profissional e pessoal. Por dividir comigo, desde a época da nossa iniciação, todas as angústias, desesperos, raivas, alegrias e vitórias conquistadas. Obrigada por entender esse meu jeito de ser. Amo vc !!!!

À Andréa e a Fê que sempre disponibilizaram seu tempo para tirar minhas duvidas e me ajudar em resumos, apresentações, experimentos e o que mais fosse necessário.

À Raquel, por estar comigo em todos os momentos e sempre me escutar e me aconselhar. Pela companhia agradável na UERJ, tornando os longos caminhos de ida e de volta bem mais divertidos... uhuh Nova Iguaçu!!!

À Cris, por ter se tornado uma pessoa tão especial na minha vida, pelos “puxões de orelhas” em momentos que se faziam necessários, por me incentivar, me aconselhar, me ajudar. Seu apoio me manteve de pé em vários momentos. Obrigada por tudo amada!

Aos colegas e ex-colegas do LDD, Alexandre, Suellen, Márcia Desidério, Andréa, Monique, Holy, Marcinha, Saulo, Rossana, Sílvia e Celso, especialmente a Paty, João e Esther, por terem sempre um ótimo humor, me fazendo sempre rir.....Fantástico!!!!. Por toda a diversão em festas, comemorações e também no dia-a-dia pela amizade cultivada.

Aos mais novos membros do LDD, Rodrigo, Januzzi, Bruna, Cleyton, em particular ao “Chuck”, que mesmo com pouco tempo de convivência se mostrou disponível em me ajudar, lendo a minha dissertação.

À Prof.^a Dra. Leonor Gusmão que é uma pessoa que tem e sempre terá a minha admiração por tudo que desenvolve no campo da ciência. Mesmo com pouco tempo de convivência, se tornou uma inspiração constante dos meus conhecimentos.

RESUMO

HERMIDA, Rose Maria Saraiva Magalhães. *Estudo de ancestralidade através de marcadores genéticos uniparentais*. 2013.146 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A chegada dos primeiros habitantes há cerca de 15.000 anos e de colonos portugueses e escravos africanos, desde o século 15, em sucessivas migrações na América do Sul, levaram à formação de populações miscigenadas com raízes consideravelmente diversificadas. É notável a heterogeneidade populacional decorrente dessas migrações e do processo de amalgamento de indígenas a partir dos contatos entre os diferentes grupos étnicos, iniciados com a colonização da América pelos europeus. A despeito da elevada miscigenação, ainda se pode encontrar no Brasil populações que, majoritariamente, mantêm a identidade genética dos seus ancestrais mais remotos. O objetivo desse estudo foi caracterizar a ancestralidade da população de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, com fortes traços fenotípicos ameríndios, e da tribo indígena Terena de Mato Grosso do Sul. Para isto, foram estudados marcadores uniparentais paternos ligados à região não recombinante do cromossomo Y e maternos presentes na região controle do DNA mitocondrial (mtDNA). Em relação à herança paterna, foram genotipados 31 indivíduos de Santa Isabel do Rio Negro, sendo que os Terena já haviam sido estudados sob este aspecto. Quanto ao mtDNA, foram estudados 76 indivíduos de ambos os sexos e 51 indivíduos do sexo masculino de Santa Isabel do Rio Negro e dos Terena, respectivamente. A análise de marcadores Y-SNPs possibilitou a caracterização de 55% dos cromossomos Y dos indivíduos de Santa Isabel do Rio Negro como pertencentes ao haplogrupo Q1a3a*, característico de ameríndio. Através do mtDNA, foi verificado que o haplogrupo A é o mais frequente nas duas populações, com percentuais de 34% e 42% em Santa Isabel do Rio Negro e na tribo Terena, respectivamente, observando-se no tocante à ancestralidade materna a não ocorrência de diferenciação genética significativa entre as duas populações. Por outro lado, a análise do cromossomo Y revelou a ocorrência de distância genética significativa entre elas, o que pode ser resultante da diferença entre os tamanhos das amostras populacionais ou refletir diferenças entre rotas migratórias dos ameríndios anteriormente à colonização. Os resultados mostram ainda que os genomas mitocondriais autóctones foram melhor preservados, e que novos haplogrupos do cromossomo Y foram introduzidos recentemente na população ameríndia. É, portanto, possível concluir que a população de Santa Isabel do Rio Negro e a tribo indígena Terena apresentam um significativo grau de conservação da ancestralidade ameríndia, apesar do longo histórico de contato com europeus e africanos, os outros povos formadores da população brasileira.

Palavras-chave: DNA mitocondrial. Cromossomo Y SNPs. Ameríndios. Ancestralidade. Santa Isabel do Rio Negro. Terena.

ABSTRACT

The arrival of the first inhabitants approximately 15.000 years ago and Portuguese settlers and Africans slaves since the 15th century in successive migrations in South America, lead to the formation of a mixed population with considerable diverse background. It is remarkable that population heterogeneity derives from this migrations and from the indigenous amalgamation process after contacts between different ethnic groups, started with America's colonization by Europeans. Despite of the high genetic heterogeneity, populations that majority keep the genetic identity from their most remote ancestors can still be found in Brazil. The purpose of this research was characterizing the ancestry of the population of Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, with strong Amerindian phenotypic features, and of the indigenous tribe Terena, from Mato Grosso do Sul. We studied paternal uniparental markers linked to no-recombinant region of Y chromosome and maternal markers present in the control region of mitochondrial DNA (mtDNA). Thirty one individuals from Santa Isabel do Rio Negro were genotyped for paternal inheritance. Genotype information of paternal markers from the Terena tribe was already available from a previously study. MtDNA markers were studied in 76 individuals from Santa Isabel do Rio Negro, both male and female, and in 51 male individuals from Terena tribe. Analysis of Y-SNPs markers allowed characterization of Q1a3a* haplogroup, typical of Amerindian, in 55% of Y chromosomes from individuals of Santa Isabel do Rio Negro . By mtDNA markers this study established that haplogroup A is the most common in both populations, occurring in 34% of individuals from Santa Isabel do Rio Negro and 42% of individuals from the Terena tribe. This observation suggests that regarding maternal ancestry, there is no occurrence of significant genetic differentiation among the two populations. On the other hand, Y chromosome analysis revealed occurrence of significant genetic distance between this populations, which can be a result of the difference among populations' sample sizes, or can reflect differences between Amerindian's migratory routes previously to colonization. The result also shows that autoctones mitochondrial genomes were better preserved, and new Y chromosome haplogroups were introduced recently in Amerindian population. Therefore, it is, possible to conclude that Santa Isabel do Rio Negro population and Terena indigenous tribe show significant degree of Amerindian ancestry conservation, despite of the long historic contact with European and African, the others people formers the Brazilian population.

Keywords: Mitochondrial DNA. SNPs Y chromosome. Amerindians. Ancestry. Santa Isabel do Rio Negro. Terena.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Modelo esquemático do genoma nuclear e mitocondrial humano.....	20
Figura 2 –	Figura ilustrando os padrões de herança do mtDNA (A) e do cromossomo Y (B). figuras C e D representam, respectivamente, o padrão de transmissão do DNA mitocondrial e cromossomo y em todas as gerações.....	22
Figura 3 –	Mapa do genoma mitocondrial e a expansão da região controle.....	24
Figura 4 –	Rede de haplótipos construída a partir das sequências da região HV1 de diversas populações nativas sul americanas.....	27
Figura 5 –	Representação esquemática da distribuição geográfica dos principais haplogrupos do DNA mitocondrial no decorrer das migrações humanas.....	28
Figura 6 –	Árvore filogenética representando os haplogrupos mitocondriais, os haplogrupos que os originaram e seus sub-haplogrupos, além das mutações que definem cada linhagem.....	30
Figura 7 –	Esquema do cromossomo Y humano, mostrando as suas regiões pseudo-autossômicas (PAR1 e PAR2), sua região heterocromática e sua região eucromática.....	33
Figura 8 –	Árvore do haplogrupo A e suas ramificações.....	37
Figura 9 –	Árvore do haplogrupo B e suas ramificações .	38
Figura 10–	Árvore do haplogrupo C e suas ramificações .	38
Figura 11–	Árvore do haplogrupo D e suas ramificações .	39
Figura 12–	Árvore do haplogrupo E e suas ramificações .	40
Figura 13–	Árvore do haplogrupo F e suas ramificações .	41
Figura 14–	Árvore do haplogrupo G e suas ramificações .	42
Figura 15–	Árvore do haplogrupo H e suas ramificações.	43
Figura 16–	Árvore do haplogrupo I e suas ramificações .	44
Figura 17–	Árvore do haplogrupo J e suas ramificações .	45
Figura 18–	Árvore do haplogrupo K e suas ramificações.	46

Figura 19–	Árvore do haplogrupo L e suas ramificações	47
Figura 20–	Árvore do haplogrupo M e suas ramificações.....	47
Figura 21–	Árvore do haplogrupo N e suas ramificações	48
Figura 22–	Árvore do haplogrupo O e suas ramificações	49
Figura 23–	Arvore do haplogrupo Q e suas ramificações	50
Figura 24–	Árvore do haplogrupo R e suas ramificações.....	51
Figura 25–	Árvore do haplogrupo S e suas ramificações	52
Figura 26–	Árvore do haplogrupo T e suas ramificações	52
Figura 27–	Forma simplificada da árvore filogenética do cromossomo Y	54
Figura 28–	Distribuição global dos haplogrupos do cromossomo Y	55
Figura 29–	Representação da origem asiática dos nativos americanos.....	56
Figura 30–	Mapa do estado do Mato Grosso do Sul.	61
Figura 31–	A tabela apresentada na figura destaca as cidades com maior número de indígenas no ano de 2010.	62
Figura 32–	Representação gráfica (eletroferograma) do resultado da eletroforese capilar dos produtos de amplificação (1ng de DNA controle - 007) com o kit comercial AmpF/STR® Y-Filer™ e analisado no sequenciador automático ABI 3130 amostra controle (DNA 007).....	78
Figura 33–	Esquema geral do processo de minisequenciamento por aplicação do <i>SNaPshot™ Multiplex kit</i>	81
Figura 34–	Produtos de amplificação por PCR da região controle do DNA mitocondrial	85
Figura 35–	Eletroferograma representativo da seqüência Forward da região controle do DNA mitocondrial (orientação 5´-3´) de um indivíduo da população Terena.....	86
Figura 36–	Haplogrupos ameríndios e apenas um haplogrupo africano e suas respectivas frequências determinadas por contagem direta na população Terena.....	91
Figura 37–	Haplogrupos ameríndios e apenas um haplogrupo europeu e suas respectivas frequências determinadas por contagem direta na população de Santa Isabel do Rio Negro.....	96

Figura 38–	Mapa ilustrativo destacando as frequências dos haplogrupos mitocondriais nas populações de Santa Isabel e Terena	97
Figura 39–	Projeção em duas dimensões do MDS das distâncias genéticas (FST) entre as 10 populações analisadas.	101
Figura 40–	Localização geográfica das populações utilizadas para análise da distância genética com relação às amostras do presente estudo- Santa Isabel do Rio Negro e Terena	103
Figura 41–	Projeção em duas dimensões do MDS das distâncias genéticas (FST) entre as 10 populações analisadas.	106
Figura 42–	Produtos de amplificação por PCR da região não recombinante do cromossomo Y.....	109
Figura 43–	Eletroferograma do produto amplificado pelo multiplex Q	111
Figura 44–	Árvore filogenética do cromossomo Y mostrando apenas a linhagem ameríndia.....	112
Figura 45–	Projeção em duas dimensões do MDS das distâncias genéticas (FST) entre as 5 populações analisadas.	114
Figura 46–	Mapa ilustrativo destacando a frequência do haplogrupo ameríndio Q1a3a* na população de Santa Isabel do Rio Negro e Terena.....	115
Figura 47–	Mapa ilustrando a distribuição do padrão geográfico dos quatro haplogrupos (A-D) em ameríndios do sul.	121
Figura 48–	Mapa ilustrativo mostrando a distribuição do cromossomo Y Q1a3a* na América do Sul.	123
Figura 49–	Representação gráfica da frequência de indivíduos que apresentam ancestralidade ameríndia e não ameríndia, que foram discriminadas através dos marcadores Indels, mtDNA e Y-SNPs.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número de amostras analisados por sexo e por região.....	68
Tabela 2 –	Composição do QIAGEN® Multiplex PCR kit.....	69
Tabela 3 –	Iniciadores utilizados na amplificação da região controle do mtDNA ..	70
Tabela 4 –	Condições de PCR para a amplificação da região controle.....	70
Tabela 5 –	Fluoróforos utilizados e indicação da cor atribuída a sua análise.....	74
Tabela 6 –	Inicidores na reação de sequenciamento da Região controle do mtDNA.....	74
Tabela 7 –	Programa para a reação de sequenciamento através de <i>Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 kit</i>	75
Tabela 8 –	Condições de PCR para a amplificação dos 17 marcadores Y-STRs.....	78
Tabela 9 –	Iniciadores utilizados na amplificação de Y-SNPs, distribuídos no multiplex	80
Tabela 10 –	Condições de PCR para a amplificação dos multiplexes	80
Tabela 11 –	SBE iniciadores utilizados na reação de minisequenciamento dos Y-SNPs.....	82
Tabela 12 -	ddNTPs e respectivos <i>fluoróforos</i> da cor atribuída na sua análise.....	82
Tabela 13 -	Relação dos SNPs do cromossomo Y aplicados neste estudo, indicando sua alteração nucleotídica no caso de mutação e respectiva detecção.....	83
Tabela 14 -	Programa de PCR para a minisequenciamento através de <i>SnaPshot kit</i>	83
Tabela 15 -	Polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial e os seus respectivos haplogrupos, verificados na população Terena.....	89
Tabela 16 -	Polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial e os seus respectivos haplogrupos, verificados na população de Santa Isabel do Rio Negro.	92
Tabela 17 -	Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) entre as populações de Santa Isabel do Rio Negro e Terena	98

Tabela 18 - Matriz de distâncias genéticas (F_{ST}) para haplogrupos do DNAmT entre pares de populações. Abaixo da diagonal estão os valores de P e acima estão dispostos os correspondentes valores de F_{ST}	99
Tabela 19 - Matriz de significância das distâncias genéticas (F_{ST}). Distâncias significativas são marcadas com sinal “+” e distâncias com sinal “-” não são significativas.....	100
Tabela 20 - Matriz de distância genética (Fst) para haplogrupos do mtDNA entre pares de populações ameríndias. Abaixo da diagonal estão os valores de P e acima da diagonal estão os correspondentes valores de Fst.....	104
Tabela 21 - Matriz de significância das distâncias genéticas (F_{ST}). Distâncias significativas são marcadas com sinal “+” e distâncias com sinal “-” não são significativas.....	105
Tabela 22 - Haplótipos do cromossomo Y dos 49 indivíduos da população de Santa Isabel do Rio Negro. A ordem dos haplótipos Y-STRs são- DYS456, DYS389 I, DYS390, DYS389 II, DYS458, DYS19, DYS385, DYS393, DYS391, DYS439, YS635, DYS392, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448.....	108
Tabela 23 - Matriz de distância genética (Fst) para haplótipos do cromossomo Y entre pares de populações. Abaixo da diagonal estão os valores de P e acima da diagonal estão os valores de F_{st} . As distâncias genéticas significativas estão mostradas com sinal “+” na tabela 24.	114
Tabela 24 - Matriz de significância das distâncias genéticas (F_{ST}). Distâncias significativas são marcadas com sinal “+”	115

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A	Adenina
AC	Ache
AIMs	Maracdores Informativos de Ancestralidade
AL	Alagoas
AMOVA	Análise de variância molecular
AN	Angola
ATP	Trifosfato de Adenosina
AY	Ayoreo
C	Citosina
CH	China
COI	Citocromo oxidase subunidade I
COII	Citocromo oxidase subunidade II
Cytb	Citocromo b
ddATP	Didesoxiadenosina trifosfato
ddCTP	Didesoxicitidina trifostato
ddGTP	Didesoxiguanosina trifosfato
ddTTP	Didesoxitimidina trifosfato
DNA-	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
dR110	Fluoróforo azul
dR6G	Fluoróforo verde
dROX	Fluoróforo vermelho
dRTAMRA	Fluoróforo amarelo
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EMPOP	<i>European MtDNA Population Database</i>
EXO I	Exonuclease I
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i>
F _{ST}	Índice de fixação usado como medida de diferenciação genética entre subpopulações
Funai	Fundação Nacional do Índio

g	Unidade de centrifugação
G	Guanina
GA	Gavião
GU	Guarani
HVSI	Hipervariável I
HVSII	Hipervariável II
HVSIII	Hipervariável III
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INDEL	Inserções e deleções
KA	Kaingang
KV	Quilovolts
LDD	Laboratório de Diagnósticos por DNA
M	molar
MDS	Escalonamento Multidimensional
Mg	miligrama
mL	mililitro
mtDNA	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
nm	nanômetro
NRY	Porção não recombinante do cromossomo Y
O	outros
p/v	peso por volume
PA	Pará
p	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
POP	<i>Performance Optimizer Polymer</i>
PT	Portugal
QU	Quechua
RC	Região Controle do DNA mitocondrial
rCRS	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i>
RFU	Unidade Relativa de Fluorescência
RS	Rio Grande do Sul

SAP	Fosfatase Alcalina de camarão
SBE	Extensão de base única
SC	Santa Catarina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SI	Santa Isabel
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	São Paulo
STR	Repetições curtas em tandem
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TE	Terena
TLH	Tampão de lise de hemácias
U	Unidade de enzima
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
XA	Xavante
ZO	Zoró
YCC	Y- Chromosome Consortium
Y-SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único no cromossomo Y
Y-STR	Repetições curtas em tandem no cromossomo Y
Yp	Braço pequeno do cromossomo Y
Yq	Braço longo do cromossomo Y
%	Porcentagem
° C	Grau Celsius
®	marca registrada
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	OBJETIVOS	66
1.1	Objetivo geral	66
1.2	Objetivos específicos	66
2	MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1	Amostras biológicas	67
2.2	Extração de DNA	69
2.3	Determinação da concentração de DNA	69
2.4	Metodologia utilizada para análise do mtDNA	69
2.4.1	<u>Amplificação da região controle do DNA mitocondrial</u>	70
2.4.2	<u>Purificação do produto amplificado da PCR pelo complexo <i>ExoSAPIT</i></u>	71
2.4.3	<u>Sequenciamento da região controle do mtDNA</u>	71
2.4.4	<u>Purificação dos produtos da reação de sequenciamento em resina Sephadex G-50</u>	73
2.5	Eletroforese capilar	74
2.5.1	<u>Preparação das amostras</u>	74
2.5.2	<u>Eletroforese capilar e detecção</u>	74
2.5.3	<u>Análise das sequências e determinação dos haplogrupos</u>	75
2.5.4	<u>Análises estatísticas</u>	75
2.5.5	<u>Análise de distâncias genéticas utilizando haplogrupos do DNA mitocondrial</u>	76
2.6	Metodologia utilizada no estudo do cromossomo Y	77
2.6.1	<u>Marcadores do tipo microssatélites do cromossomo Y (Y-STR)</u>	77
2.6.2	<u>Análise de Y-SNPs</u>	79
2.6.2.1	Reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação dos Y- SNPs.....	79
2.6.2.2	Reação de minisequenciamento por SNaPshot.....	80
2.6.2.3	Purificação do produto da reação de minisequenciamento pela enzima <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (SAP).....	83
2.6.2.4	Eletroforese capilar e detecção dos produtos SBE.....	84
2.6.2.5	Caracterização do haplogrupo e análises estatísticas.....	84

3	RESULTADOS	85
3.1	Polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial	85
3.1.1	<u>Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose 2%</u>	85
3.1.2	<u>Sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial</u>	86
3.1.3	<u>População Terena</u>	88
3.1.3.1	Proporção dos haplogrupos do mtDNA na população Terena.....	91
3.1.4	<u>População de Santa Isabel do Rio Negro</u>	92
3.1.4.1	Proporção dos haplogrupos do mtDNA na população de Santa Isabel do Rio Negro.....	96
3.1.5	<u>Análises estatísticas</u>	97
3.1.5.1	Amova nas amostras populacionais de Santa Isabel do Rio Negro e Terena.....	97
3.1.5.2	Distâncias genéticas entre as populações alvo deste estudo e populações urbanas brasileiras e mundiais de interesse	98
3.1.5.3	Distâncias genéticas entre as populações alvo desse estudo e populações ameríndias.....	102
3.2	Polimorfismos do cromossomo Y	107
3.2.1	<u>STRs</u>	107
3.2.2	<u>SNPs</u>	108
3.2.2.1	Análise dos produtos de amplificação em gel de acrilamida 12%.....	109
3.2.2.2	Minisequenciamento da porção não recombinante do cromossomo Y	110
3.3	Distâncias genéticas entre a população de Santa Isabel do Rio Negro e populações mundiais de interesse	113
4	DISCUSSÃO	116
4.1	Contribuição uniparental feminina	118
4.1.1	<u>Distâncias genéticas entre as populações alvo deste estudo e populações urbanas brasileiras e mundiais de interesse</u>	119
4.1.2	<u>Amova nas amostras populacionais de Santa Isabel do Rio Negro e Terena e distância genética entre estas duas populações e populações ameríndia</u>	119
4.2	Contribuição uniparental masculina	122
4.2.1	<u>Distâncias genéticas entre a população de Santa Isabel do Rio Negro e populações mundiais de interesse</u>	123

4.3	Comparação entre a contribuição parental masculina e feminina.	124
4.4	Comparação com outros marcadores utilizados para esta população.....	125
5	CONCLUSÃO.....	127
	REFERÊNCIAS.....	128

INTRODUÇÃO

Quem somos? De onde viemos? Essas indagações expressam o desejo de entender as origens da humanidade e a ciência vem tentando responder tais questões. A arqueologia e a paleontologia eram as disciplinas tradicionalmente eleitas para investigar o passado humano, particularmente daqueles grupos que não tinham na escrita um instrumento de registro histórico. Esse cenário mudou, com o advento da genética e da biologia molecular, pois essas áreas ampliaram profundamente o conhecimento, propiciando uma verdadeira revolução tecnológica que resultou no desenvolvimento de metodologias valiosas para o desvendamento de informações registradas no DNA das populações humanas.

A diversidade e diferenciação genética nas populações são moldadas por fatores genéticos (mutação, fluxo gênico, deriva genética e seleção natural) e eventos demográficos (migração, expansões e gargalos populacionais) (Baralesque *et al.*, 2007). Um gradiente de perda de diversidade genética nas populações humanas é observado à medida que elas se distanciam da África (Wang *et al.*, 2007). O conhecimento da diversidade genética e dos níveis de diferenciação entre as populações é fundamental para o entendimento do modo como os movimentos migratórios das populações humanas ao longo da história, se relacionam com as características genéticas atuais. Para isto, nos dias atuais podem ser utilizadas ferramentas biológicas muito informativas que permitem uma análise populacional extremamente confiável.

O DNA humano armazena toda a história de um indivíduo, sua ancestralidade, informações sobre os seus caracteres físicos como cor de pele, estatura, cor dos olhos ou propensão às doenças genéticas. Por meio da análise de polimorfismos do DNA é possível recuperar informações sobre a história das populações humanas, pois permanecem como registros moleculares das rotas migratórias seguidas durante a expansão mundial das populações humanas. À medida que a espécie humana foi se espalhando pelos continentes por meio de migrações, fugas ou guerras, muitas alterações do genoma, como por exemplo, na forma de mutações, acrescentaram novos polimorfismos aos já existentes.

Desde a década de 80, os polimorfismos de DNA presente nos autossomos, no cromossomo Y e no DNA mitocondrial foram utilizados no Brasil em estudos relacionados à origem do homem no Novo Mundo e à origem e formação da população brasileira, visando analisar o perfil genético de diferentes indivíduos que formaram esta população (Pena *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1999; Bortolini *et al.*, 1997; 1999; 2003; Wang *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2008a, 2008b). O Brasil possui uma grande mestiçagem populacional e essa heterogeneidade é observada em cada estado ou região separadamente, cada qual com sua contribuição étnica particular (Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Tarazona- Santos *et al.*, 2001; Marrero *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006; Feio-dos-Santos *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2008; Palencia *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2011; Santos, 2012; Manta *et al.*, 2012; 2013).

Apesar da intensa mistura étnica na formação da população brasileira, grupos isolados ainda podem ser encontrados, como é o caso de comunidades de origem africana, remanescentes de quilombos, e comunidades indígenas, nos quais se apresentam mais conservadas e concentradas características genéticas e culturais de suas populações ancestrais (IBGE 2010).

As populações indígenas brasileiras ficaram isoladas das demais populações do mundo por cerca de 10 mil anos e aproximadamente há cerca de 500 anos, eles tiveram o primeiro contato com os portugueses que teve como consequência a redução de 96% da população indígena (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; IBGE, 2010). Mesmo assim alguns grupos sobreviveram em relativo isolamento, devido ao contato com a população urbana, sofreram um rápido processo de aculturação que fez com que a perda genética e cultural se tornasse inevitável (Funai, 2009).

Com relação aos estudos realizados em populações ameríndias brasileiras destacam-se aqueles realizados com análise do mtDNA e do cromossomo Y (Santos *et al.*, 1996b; Bortolini *et al.*, 1997; Bonatto *et al.*, 1997a, 1997b; Bortolini *et al.*, 2002, Marrero *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2008a, 2008b). Esses trabalhos indicaram baixa diversidade genética, com elevada diferenciação interpopulacional e, em alguns casos, presença de material genético não indígena devido a fluxo gênico com europeus e africanos.

O GENOMA HUMANO

O patrimônio genético dos seres humanos é constituído por aproximadamente 3,2 bilhões de pares de base (pb) e está organizado em um genoma nuclear complexo, que possui a quase totalidade da informação genética, em um total que se aproxima de 30.000 genes, e em um genoma mitocondrial, mais simples, com 16.569 pb apenas 37 genes, localizado na matriz das mitocôndrias (Strachan & Read, 2010).

O genoma nuclear está distribuído em unidades denominadas cromossomos, constituídos por 22 pares autossômicos e 1 par sexual. Nas mulheres, o par sexual é representado por dois distintos cromossomos X, enquanto que nos homens este ocorre uma única vez, juntamente com o cromossomo Y (Figura 1A). Além disso, todos os indivíduos herdam por herança materna um DNA circular presente nas mitocôndrias (DNA mitocondrial) (Brisighelli *et al.*,2006) (Figura 1B).

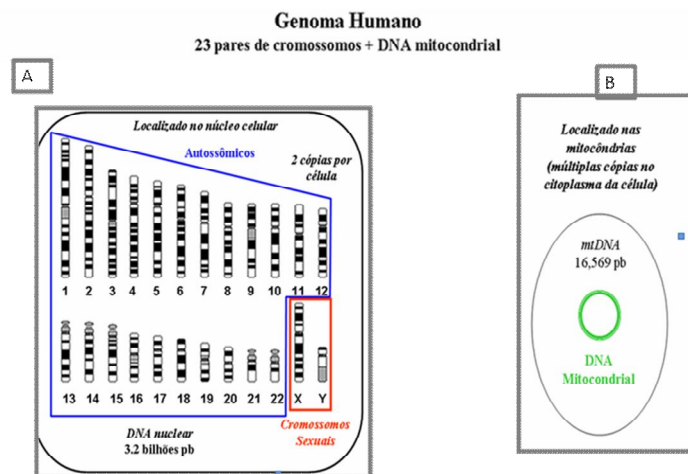


Figura 1 - Modelo esquemático do genoma nuclear e mitocondrial humano.

(A) O genoma humano é diplóide e contém aproximadamente 3,2 bilhões de pares de bases organizados em 23 pares de cromossomos (22 pares de cromossomos autossômicos e 1 par de cromossomos sexuais X e Y) localizados no compartimento nuclear. (B) O DNA mitocondrial está presente em aproximadamente 100 cópias por célula. Este é um DNA circular, fita dupla e pequeno, composto por 16.569 pares de bases que está localizado na matriz mitocondrial dentro do compartimento do citoplasma celular. Adaptado de Butler, 2005.

Os estudos a respeito da estrutura do DNA humano revelaram variação entre indivíduos normais, denominadas de polimorfismos (Fowler *et al.*, 1988; Arcot *et al.*, 1996).

Os polimorfismos podem ser representado por mudanças únicas de nucleotídeos (por exemplo, substituições) como os SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único) (Collins *et al.*, 1998), variações no comprimento de repetições *in tandem* (VNTRs- número variável de repetições *in tandem* e STRs- Repetições curtas *in tandem*) (Edwards *et al.*, 1991) e a inserção ou deleção de sequências de DNA, os Indels. (Pereira *et al.*, 2009a).

MARCADORES GENÉTICOS UNIPARENTAIS

Os marcadores genéticos de herança uniparental são aqueles herdados de apenas um dos pais pelos filhos e estão situados em duas regiões distintas- no genoma nuclear (especificamente no cromossomo Y) e no mitocondrial. O conjunto de dados de *loci* analisados em conjunto (haplótipo) pode caracterizar o indivíduo e, o conjunto desses haplótipos, também pode caracterizar populações através de seus haplogrupos.

A região específica do cromossomo Y e o DNA mitocondrial devido a sua natureza haplóide não sofrem recombinação. A importância de escapar da recombinação é que os haplótipos geralmente são passados intactos de uma geração para outra, sendo modificados apenas por mutações, ao invés do rearranjo mais complexo que outros cromossomos sofrem e com isso preservam um registro da sua história (Jobling & Tyler-Smith, 2003). Dessa forma podemos identificar háplotipos e também associá-los a uma determinada linhagem, população ou grupo étnico. Esses dois marcadores se complementam, fornecendo informações sobre as contribuições materna e paterna (Cavalli-Sforza, 1998) e são conhecidamente correlacionados com a origem étnica da população (Bianchi *et al.*, 1998).

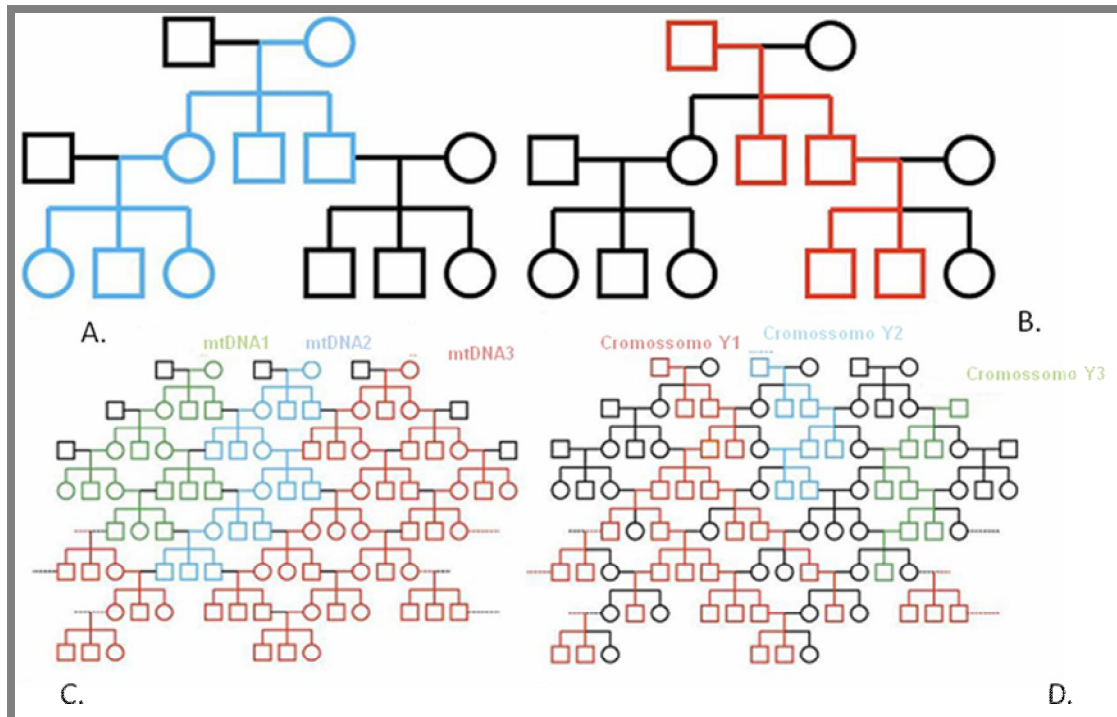


Figura 2-Figura ilustrando os padrões de herança do mtDNA (A) e do cromossomo Y (B). As figuras C e D representam, respectivamente, o padrão de transmissão do DNA mitocondrial e cromossomo Y em todas as gerações. Quadrados representam indivíduos do sexo masculino e os círculos representam indivíduos do sexo feminino. Adaptado de www.biologos.org.

DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

As mitocôndrias são organelas encontradas no citoplasma celular. Seu número varia significativamente de acordo com o tipo de célula e função biológica que exerce, podendo chegar a mais de 5000 cópias dessa organela em uma célula (Butler, 2005) cujas funções são- gerar suprimento energético para a célula, respiração celular, produzir calor e mediar a apoptose (Finsterer, 2004).

Acredita-se que há cerca de 1,5 bilhões de anos um procarionte (a mitocôndria) iniciou uma relação de simbiose com um organismo eucariote, Vale ressaltar que durante a evolução destas organelas vários genes foram perdidos e outros foram transferidos para o genoma nuclear (Burger *et al.*, 2003).

O mtDNA é uma dupla fita circular de 16.569 pares de bases (pb) descoberta por Nass & Nass (1963) e que teve sua sequência descrita pela primeira vez por

Anderson e colaboradores em 1981. Por convenção, as posições dos nucleotídeos do mtDNA humano são numeradas de 1 a 16.569, Essa sequência foi reanalisada e revisada sendo modificada e denominada *Cambridge Reference Sequence* (CRS) (Andrews *et al.*, 1999).

A molécula é composta por uma cadeia pesada (H ou *heavy*) rica em guaninas e uma cadeia leve (L ou *light*) rica em citosinas, no qual estão contidos 37 genes que estão envolvidos na produção de energia e no seu armazenamento na forma de ATP. Deste total, dois codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S), 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam subunidades do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Anderson *et al.*, 1981; Wittas & Zaw, 2004).

A maior porção do mtDNA é codificante, com exceção da região controle (RC) ou alça D (Displacement loop – D loop) (Pakendorf & Stoneking, 2005). contendo 1.125 pares de base (pb) que está localizada entre as posições 16.024 à 16.569 e 1 à 576 (Figura 3). Nessa região são observados os segmentos mais variáveis do genoma mitocondrial, tornando-a extremamente importante para estudos genéticos.

Na RC são verificadas regiões hipervariáveis altamente polimórficas (Bonatto & Salzano, 1997a). A região hipervariável I (HVI) está localizada entre as posições 16.024 e 16.383, a região hipervariável II (HVII) localiza-se entre as posições 57 e 372 e a região hipervariável III (HVIII) compreende as posições de 438 a 574. Dentre elas, a menos polimórfica é a HVS-III (Lutz *et al.*, 1997; Lutz *et al.*, 2000).

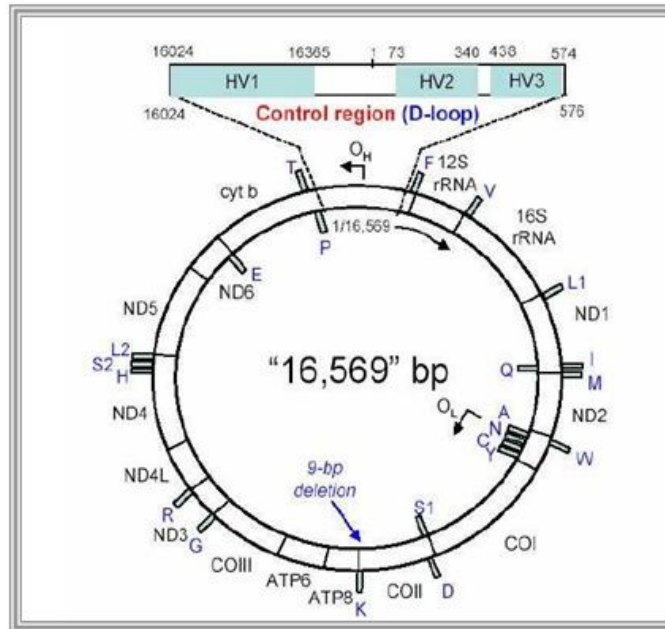


Figura 3- Mapa do genoma mitocondrial e a expansão da região controle (Adaptado de Butler, 2005). O diagrama da região controle mostra a localização da região hipervariável 1 (HV1), 2 (HV2) e 3 (HV3); o sistema de numeração dos nucleotídeos se refere a *seqüência de referência de Cambridge* (Anderson *et al.*, 1981).

O mtDNA E O ESTUDO DE POPULAÇÕES

Características diversas tornam a molécula do mtDNA uma importante ferramenta em estudos antropológicos, evolutivos e forenses (incluindo tecidos antigos e arqueológicos)- o grande número de cópias por célula, a herança materna exclusiva, a ausência de recombinação e a alta taxa de mutação (Pakendorf & Stoneking, 2005). Enquanto apenas duas cópias de cada cromossomo autossômico são encontradas na maioria das células somáticas, o número de moléculas de mtDNA pode variar de centenas a milhares, possibilitando a análise de amostras biológicas muito antigas e/ou degradadas. Além disso, a estrutura circular é resistente à digestão enzimática (Nilsson *et al.*, 2008; Robin & Wong, 1988; Alvarez *et al.*, 2001), assim, em grandes desastres (incêndios, explosões, queda de avião, etc.), quando é mais difícil identificar os corpos, analisa-se o mtDNA (Anjos *et al.*, 2004; Chong *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2008), que é extraído dos restos mortais e a seqüência de interesse é comparada com seqüências obtidas de irmãos ou ascendentes maternos.

A herança exclusivamente materna do mtDNA em mamíferos vem há algum tempo sendo questionada (Gyllensten *et al.*, 1991) mas, mesmo com a descoberta feita por Schwartz & Vissing (2003) de um paciente com distúrbios metabólicos que o impediam de praticar exercícios, cujos músculos possuíam dez vezes mais mitocôndrias paternas do que maternas, a inexistência de novas ocorrências desse fenômeno indica que essa descoberta é uma exceção, provavelmente devido a uma falha incomum no sistema celular de reconhecimento e eliminação do mtDNA paterno (Pakendorf & Stoneking, 2005).

Outra questão amplamente discutida em relação ao mtDNA é a ausência de recombinação. A transmissão dos genes mitocondriais ocorre na forma de blocos, denominados haplótipos (Ceppellini *et al.*, 1967). No final dos anos 90, surgiram estudos evidenciando casos de recombinação em mtDNAs de mamíferos (Awadalla *et al.*, 1999;; Eyre-Walker *et al.*, 1999; Hagelberg *et al.*, 1999; Kivisild *et al.*, 2000), entretanto estudos subsequentes não conseguiram demonstrar essa atividade (Ingman *et al.*, 2000; Elson *et al.*, 2001; Piganeau & Eyre-Walker, 2004). Apesar das mitocôndrias dos mamíferos possuírem uma recombinase funcional (Thyagarajan *et al.*, 1996) ainda não está claro por qual via essa recombinação seria possível (Eyre-Walker & Awadalla, 2001). Estudos e discussões relacionados a esse tema ainda são necessários, entretanto, até o momento não há nenhuma evidência concreta de recombinação no mtDNA humano (Schwartz & Vissing, 2003).

Por último, a taxa de mutação do mtDNA, especialmente da região controle, é significativamente maior do que a encontrada em genes nucleares (Brown *et al.*, 1979; Pakendorf & Stoneking, 2005) o que possibilita seu emprego na discriminação, até mesmo, de populações recentes (Torroni *et al.*, 1994b). Essa alta taxa evolutiva se deve ao fato de a mitocôndria ser uma grande geradora de radicais livres, proporcionando um ambiente favorável à mutações no DNA. Outra possível causa seria a ausência de histonas, proteínas que exercem um papel protetor no DNA nuclear (Yakes & Van Houten, 1997). Além disso, a enzima DNA polimerase mitocondrial possui baixa atividade corretora quando comparada à DNA polimerase nuclear (Kunkel & Loeb, 1981).

Os conjuntos de variações nas sequências do mtDNA observados em distintos haplótipos evoluem como resultado da acumulação de mutações nas matrilineagens herdadas ao longo das gerações. A partir desta inferência, foi possível construir uma árvore filogenética que reflete as relações entre as diferentes

filogenias em escala global. Um grupo de haplótipos forma um clado genético definido, denominado de haplogrupo (Figura 4). Haplogrupos reúnem grupos de haplótipos que são caracterizados por determinadas mutações e que tendem a mostrar especificidade regional (Pakendorf & Stoneking, 2005). Em 2008, a fim de possibilitar uma melhor compreensão das variações do mtDNA, foi gerada uma árvore atualizada de variação do mtDNA considerando todos os dados de sequências disponíveis no NCBI GenBank([www. ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) (Oven & Kayser, 2008).

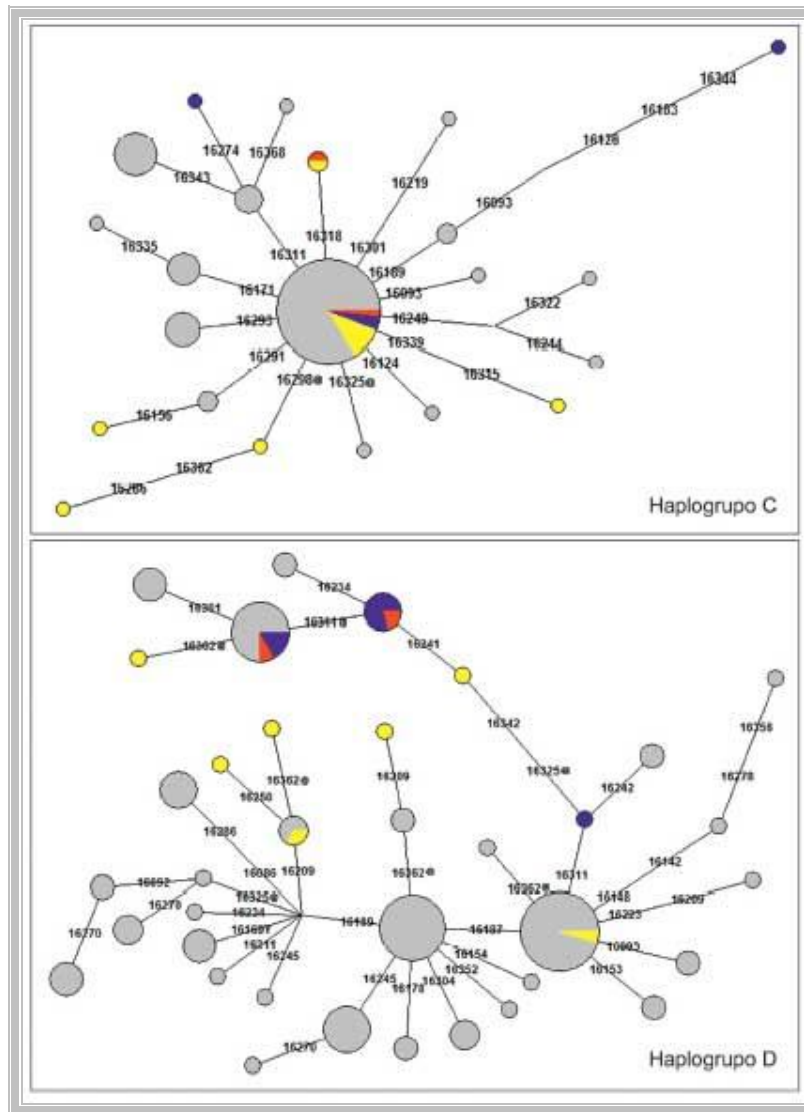


Figura 4-Rede de haplótipos construída a partir das seqüências da região HV1 de diversas populações nativas sul americanas (Para ver a construção dessa rede na região HV2, acessar García-Bour *et al.* 2004).

HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS E POPULAÇÕES HUMANAS

Desde a década de 1980, o continente Africano vem sendo apontado como provável fonte do mtDNA humano atual, apoiado pelo fato de que Africanos possuem a maior variabilidade já encontrada nesse genoma (Greenberg *et al.*, 1983; Cann *et al.*, 1987; Ingaman *et al.*, 2000; Kivisild *et al.*, 2006; Behar *et al.*, 2008).

O haplogrupo L e seus sub-haplogrupos L0, L1, L2 e L3 são derivados apenas no continente africano (Watson *et al.*, 1997; Salas *et al.*, 2002). No nordeste do continente africano, duas linhagens mitocondriais denominadas M e N divergiram a partir do haplogrupo L3. Estes dois haplogrupos foram os únicos a deixar o continente africano em direção a Eurásia. Na Europa, o haplogrupo N deu origem aos haplogrupos H, U, X, I, J, K, T, V, W. Na Ásia, as linhagens M e N deram origem a diversos haplogrupos, A, B, C, D, F, G, Y e Z. Os haplogrupos A, B, C e D são característicos de populações americanas nativas (Oven & Kayser, 2008). O haplogrupo X também foi encontrado nas Américas, principalmente na América do Norte e Central, no entanto é praticamente ausente na América do Sul (Dornelles *et al.*, 2005) (Figura 5).

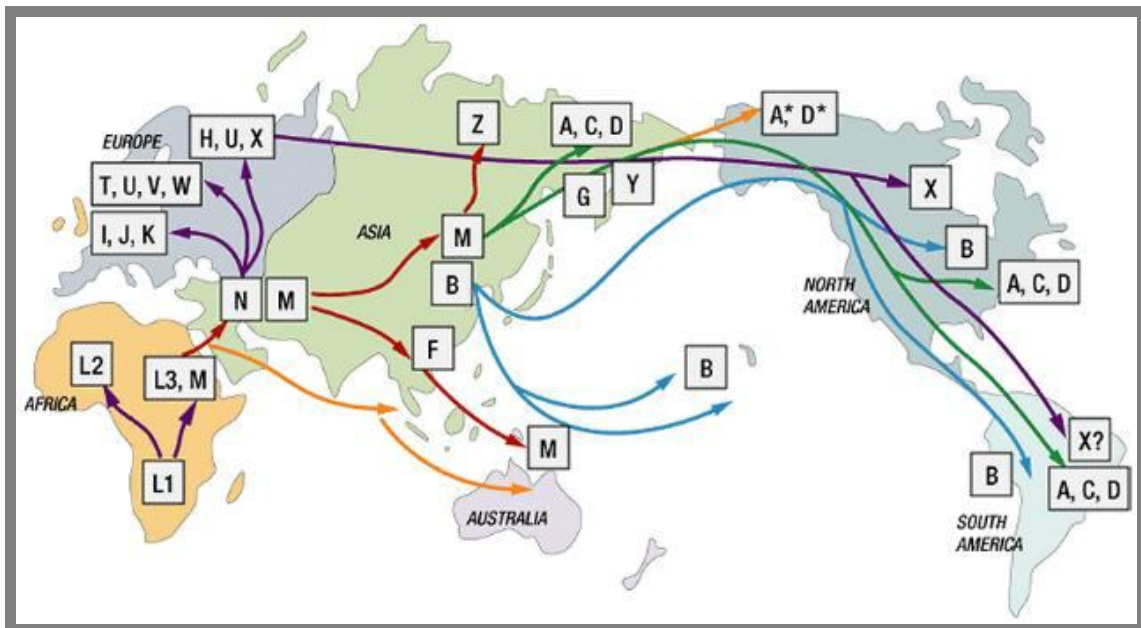


Figura 5- Representação esquemática da distribuição geográfica dos principais haplogrupos do DNA mitocondrial no decorrer das migrações humanas. Os haplogrupos são designados por uma letra. Adaptado de familytree.com.

HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS NA ÁFRICA

Os sub-haplogrupos do grupo L correspondem as primeiras linhagens mitocondriais humanas, com o sub-haplogrupo L0a, anteriormente chamado de L1a, sendo considerado o mais antigo (Salas *et al.*, 2002; Mishmar *et al.*, 2003). O haplogrupo L é praticamente exclusivo de populações africanas, sendo encontrado fora desse continente apenas em populações com histórico de fluxo gênico com populações africanas (Chen *et al.*, 1995). Os sub-haplogrupos L0, L1b, L1e e L2 são os mais frequentes na África Subsaariana, que é atualmente considerado o local de origem de todas as seqüências mitocondriais, já que possui a maior diversidade de seqüências (Chen *et al.*, 1995; 2000; Watson *et al.*, 1997; Jorde *et al.*, 1998). O sub-haplogrupo L3 é encontrado com alta frequência no leste africano.

HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS NA ÁSIA

Todas as linhagens mitocondriais asiáticas podem ser divididas em dois macro-haplogrupos- M e N (Wallace, 1995). Esses dois macro-haplogrupos originaram uma série de linhagens mitocondriais (Mishmar *et al.*, 2003). O grupo formado pelas linhagens descendentes do haplogrupo M são haplogrupos C, D, G e Z (Torroni *et al.*, 1992; 1993b; 1994b; Schurr *et al.*, 1999), com frequências variando de 25% a 45% no Sudeste Asiático. Os haplogrupos C, D, e G são frequentes em populações do Tibete, Coreia e Chineses Han, com os haplogrupos C e D se estendendo até a Sibéria (Schurr & Wallace, 2002).

Os haplogrupos A, B, F são linhagens descendentes do haplogrupo N e são frequentes no sul do continente com frequências atingindo 32% em população vietnamita e sendo praticamente ausente na Sibéria, o haplogrupo A é praticamente ausente no sul e possui distribuição semelhante a dos haplogrupos C e D mencionados acima (Schurr & Wallace, 2002). O haplogrupo B possui uma distribuição peculiar no continente asiático, sendo frequentemente encontrado nas partes central e sul do continente e com frequências de quase 100% em ilhas do Oceano Pacífico (Hertzberg *et al.*, 1989; Stoneking *et al.*, 1990; Ballinger *et al.*,

1992). Esse haplogrupo também foi identificado em populações da Sibéria, ainda que em baixa frequência (Golubenlo *et al.*, 2001; Tarskaia *et al.*, 2006).

HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS PRÉ-COLOMBIANO

Desde a década de 1990, é aceito que os mtDNAs nativos americanos são descendentes de quatro haplogrupos de origem asiática, denominados inicialmente de A, B, C e D e atualmente designados por A2, B2, C1 e D1 (Torrioni *et al.*, 1992; 1993a; Horai *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1996b; Achilli *et al.*, 2008). Um quinto haplogrupo denominado de X2a (Achilli *et al.*, 2008), é encontrado principalmente na América do Norte e Central e quase ausente na América do Sul (Dornelles *et al.*, 2005). Essa ausência pode ser explicada por um efeito fundador durante a migração do Norte para América Central e do Sul. Outra explicação é que haplogrupo X atingiu a América do Sul, mas em pequenas frequências e, eventualmente, se tornou extinto durante um tempo (Dornelles *et al.*, 2005) (Figura 6).

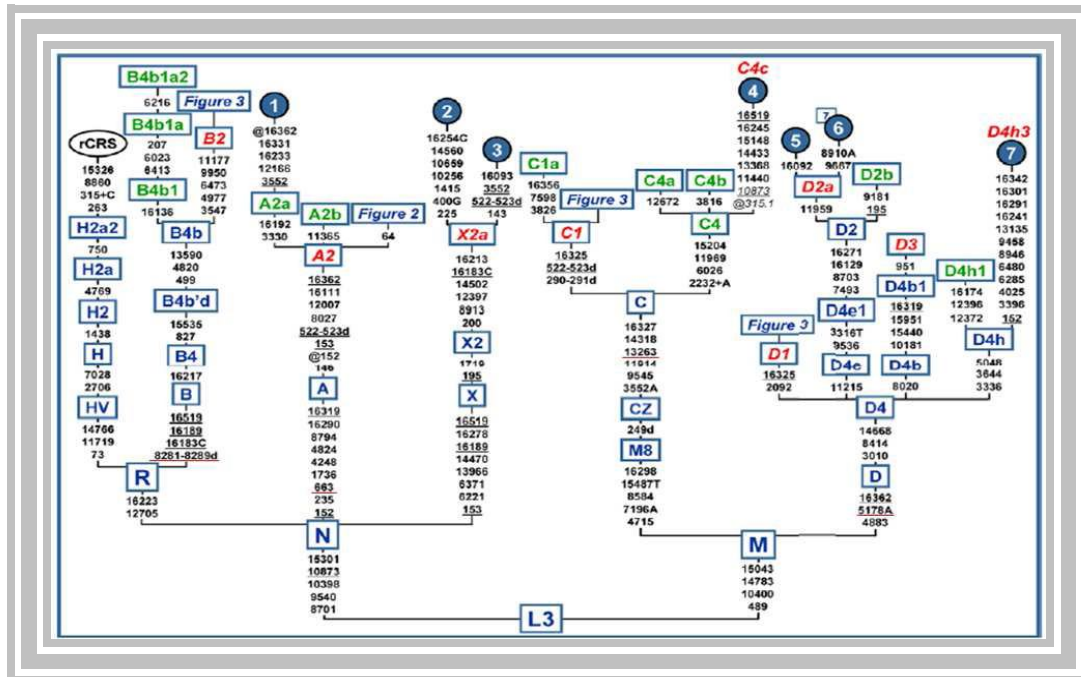


Figura 6 - Árvore filogenética representando os haplogrupos mitocondriais, os haplogrupos que os originaram e seus sub-haplogrupos, além das mutações que definem cada linhagem. Figura extraída de Achilli *et al.*, 2008.

O haplogrupo A é altamente frequente na Meso-América e no noroeste da América do Sul, seguido dos haplogrupos B e C. Em direção ao sul do continente, ocorre uma diminuição da frequência do haplogrupo A e há um aumento nas frequências dos haplogrupos C e D. O haplogrupo B tem uma maior frequência em populações andinas (Fuselli *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores consideram como explicação para a alta frequência deste haplogrupo na região Andina a existência de um caminho alternativo para as Américas, que também explica as pequenas frequências deste haplogrupo no norte e no sul da América do Sul (ORourke & Raff, 2010).

HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS NA EUROPA

Os haplogrupos H, I, J, T, U, V, W e X englobam mais de 98% das sequências de mtDNA do continente europeu, sendo todos derivados do haplogrupo N (Torrioni *et al.*, 1996; 1998; Mishmar *et al.*, 2003). Enquanto os haplogrupos T, V e W, identificados por Torrioni *et al.* (1996), foram achados apenas no continente europeu, assim como os haplogrupos previamente identificados H, I, J e K, os haplogrupos U e X, também foram observados pelos autores em populações da África e da América do Norte, respectivamente (Scozzari *et al.*, 1997; Torrioni *et al.*, 1993a; Forster *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998).

O haplogrupo H é o mais frequente no continente europeu. Ocorre com frequências de 40 a 60% no norte e no oeste europeu, enquanto que no sul da Espanha, Itália central e Leste europeu são verificadas frequências menores, entre 20 e 40% (Torrioni *et al.*, 1998). Este haplogrupo é também comum em populações caucasóides do Oriente Médio e norte da África sendo também observado no norte da Índia e entre os siberianos (Torrioni *et al.*, 1998). Os haplogrupos J, K, T e U também são observados em populações européias. Apesar de menos comuns, os haplogrupos I, V, W e X, foram encontrados em dois terços das populações do continente europeu (Torrioni *et al.*, 1996).

CROMOSSOMO Y

O Cromossomo Y humano é produto da divergência do seu homólogo, o cromossomo X, num processo que se iniciou há aproximadamente, 240-320 milhões de anos (Ma) (Jobling *et al.* 2004). Esse cromossomo possui aproximadamente 60 Mega bases (Mb), representando 2% do genoma humano. Na região heterocromática localizada no braço longo (Yq), são verificadas sequências de DNA altamente repetitivo, as quais abrangem mais da metade do cromossomo Y, na região eucromática apenas um pequeno número de genes codificam proteínas (Figura 6) (Li *et al.*, 2006).

O gene exclusivo do sexo masculino, o gene SRY está localizado na região da eucromatina. Este gene controla o desenvolvimento sexual masculino, desencadeando acontecimentos que promovem a formação de testículos masculinos a partir de tecidos embrionários indiferenciados (Wetton *et al.*,2005).

Constitutivamente haplóide, o cromossomo Y é transmitido diretamente de pai para filho e, ao contrário de qualquer outro cromossomo, ao longo de quase toda a sua extensão não ocorre a recombinação meiótica (Jobling, 2001), que se verifica apenas nas duas extremidades do cromossomo, conhecidas como regiões pseudoautosômica (PAR) as quais recombina com as regiões homólogas do cromossomo X. Tais regiões são denominadas de- *PAR1 (Pseudo-Autosomal Region 1)*, localizada na extremidade do braço curto (Yp) tem aproximadamente 2,6 Mb de tamanho, e *PAR2 (Pseudo-Autosomal Region 2)* localizada na extremidade do braço longo (Yq), tem 0,32 Mb de comprimento (Rozen *et al.* 2003; Skaletsky *et al.* 2003) (Figura 7).

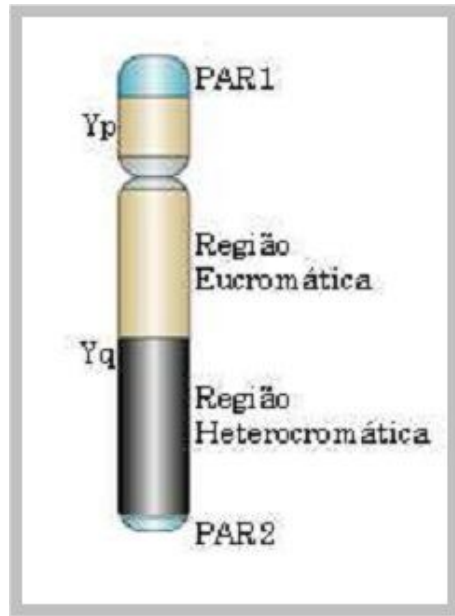


Figura 7 - Esquema do cromossomo Y humano, mostrando as suas regiões pseudo-autossômicas (PAR1 e PAR2), sua região heterocromática e sua região eucromática. Adaptado de Lahn *et al.*, (2001).

Cerca de 95% do cromossomo Y não é homóloga ao cromossomo X e, conseqüentemente, o fenômeno de recombinação gênica não ocorre na maior parte do cromossomo, região denominada de *NR*Y (*Non Recombinant Portion of the Y Chromosome*) ou região específica do macho, MSY (Quintana-Murci *et al.*, 2001; Skaletsky *et al.*, 2003). Em decorrência da ausência de recombinação e do modo de transmissão, indivíduos relacionados por herança paterna apresentam idênticos cromossomos Y. Exceção deve ser feita às regiões PAR 1 e 2 ou quando ocorrem eventos mutacionais na região NRY.

Polimorfismos diversos verificados na região NRY apresentam distintas taxas de mutação, o que possibilita a realização de estudos múltiplos acerca da história de uma população, em particular, na dependência da seleção do tipo de marcador genético a ser considerado, através de relógios moleculares ajustados pelas mutações genéticas (Jobling & Tyler-Smith, 1995). Nesse sentido, as alterações na região macho-específica do Y podem revelar não somente a genealogia paterna mas também as relações evolutivas entre diferentes grupos de indivíduos (Hammer, 1995).

O CROMOSSOMO Y E O ESTUDO DAS POPULAÇÕES HUMANAS

O cromossomo Y possui características que o tornam uma importante ferramenta para o estudo das populações humanas, forense e de genética médica- herança exclusivamente paterna, a baixa taxa da mutação e a não recombinação da região NRY, na qual podemos utilizar muitos marcadores repetitivos (STR) e de sequência (SNP).

Na população como um todo, o tamanho efetivo populacional do cromossomo Y é 1/4 dos autossomos, 1/3 dos cromossomos X e similar ao do DNA mitocondrial. Assumindo que todos os cromossomos sofram os mesmo processos mutacionais, é esperada uma menor diversidade na sequência do cromossomo Y do que em qualquer outra do genoma nuclear, o que é de fato observado (Thomson *et al.*, 2000; Hammer, 1995). Também é esperado que ele seja mais suscetível à deriva genética, o que envolve mudanças aleatórias na frequência dos seus haplótipos de uma geração para outra. A deriva gênica acelera a diferenciação entre grupos de cromossomos Y em populações diferentes, dessa forma quanto maior for a distância geográfica maior será a diferenciação genética (Underhill *et al.*, 1997; Jobling & Tyler-Smith, 2003).

O fato da região NRY não ter homologia com nenhuma outra região do genoma faz com que seus genes sejam transmitidos de pai para filho em blocos, na forma de haplótipos, alterados apenas por mutações e não por outros mecanismos mais complexos, como ocorre com os demais cromossomos (Jobling & Tyler-Smith, 2003) Com isso, por possibilitar a aquisição de relevante informação filogenética, o cromossomo Y apresenta um tipo de herança que se reveste de especial importância em estudos genealógicos e antropológicos (Jobling *et al.*, 1997; Schultes *et al.*, 1998; Jobling & Tyler-Smith, 2003).

Assim como existem controvérsias em relação a não recombinação do DNA mitocondrial (Eyre-Walker & Awadalla, 2001), estas também ocorrem em relação ao cromossomo Y. Ainda que o cromossomo Y, com exceção da região pseudoautossômica, seja isento de recombinação, Skaletsky e colaboradores em 2003, descobriram que o cromossomo Y humano é capaz de "recombinar" com ele mesmo, usando seqüências de pares de bases palíndromes. Tal "recombinação" é chamada de conversão gênica (Skaletsky *et al.*., 2003). Entretanto se considerar

apenas a definição convencional de recombinação como alterações decorrentes do *crossing-over* ocorrendo entre dois cromossomos homólogos, pode-se excluir a conversão gênica dessa discussão (Jobling & Tyler-Smith, 2003).

OS POLIMORFISMOS PRESENTES NO CROMOSSOMO Y

Vários tipos de polimorfismos ocorrem no cromossomo Y- rearranjos estruturais como inserções, deleções, duplicações e inversões, SNPs e polimorfismos de tamanho de sequências repetitivas como minissatélites e microsatélites ou STRs (Jobling & Tyler-Smith, 1995; 2003).

Os marcadores do tipo STR, também chamados de microsatélites ou repetições consecutivas curtas, são abundantes no genoma, caracterizadas por unidades básicas, com até seis pares de base (pb) de tamanho, que se repetem *in tandem*. No genoma humano, ocorrem, em média, a cada 10.000 nucleotídeos e estima-se que compreendam cerca de 3% do genoma, estando localizados em regiões intergênicas, em íntrons ou em regiões flangeadoras. (Arcot *et al.*, 1996; Schlötterer, 1998; Hummel, 2003; Butler, 2005). Estes marcadores multialélicos apresentam alta taxa de mutação ($\sim 2 \times 10^{-3}$ /geração) (Gusmão *et al.* 2005), proporcionando situações em que dois alelos com mesmo número de unidades básicas ou repetições, não sejam idênticos por descendência. Ao conjunto de alelos de diferentes loci STR, no mesmo cromossomo, transmitidos em blocos denomina-se de haplótipo, marcador muito utilizado para investigação de linhagens paternas, já que um único haplótipo será encontrado no avô, no pai, no filho e em todos os seus ascendentes e descendentes masculinos (Budwale e Brown, 2001; Schumm *et al.*, 1997)

Haplótipos relacionados por descendência compartilham um ancestral comum, constituindo um haplogrupo. Os haplogrupos são linhagens que podem ser definidas por SNPs (YCC, 2002). Os SNPs são decorrentes de alterações em apenas uma única base na seqüência de nucleotídeos correspondem a cerca de 90% das variantes de seqüência do DNA humano (Collins *et al.*, 1998; Neisen, 2000), caracterizando-se, portanto, como marcadores bialélicos- o alelo ancestral e o alelo derivado.

Os SNPs, com taxa de mutação na ordem de 10^{-7} a 10^{-9} , são marcadores genéticos adequados para a investigação de linhagens paternas e para a prospecção da história da evolução humana, uma vez que estudos a cerca da ancestralidade de uma população, de eventos antigos, requerem a seleção de polimorfismos com baixa taxa de mutação (Onofri *et al.*, 2006). O primeiro SNP descrito nesse cromossomo foi uma substituição A>G no *locus* DYS271 (Seielstad *et al.*, 1994), cujo alelo derivado G apresenta uma distribuição geográfica restrita ao continente africano.

A origem africana do homem moderno sugerida por estudos de mtDNA (Vigilant *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1983; Cann *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1995; Behar *et al.*, 2008) é corroborada por estudos com o cromossomo Y, que também mostraram uma diversidade significativamente maior em populações africanas em comparação com outras já estudadas. (Underhill *et al.*, 2000, 2001; Hammer *et al.*, 2001; Ke *et al.*, 2001). Dessa forma, assim como ocorre com o mtDNA, estudos com o cromossomo Y também demonstram que a primeira separação se deu entre africanos e não africanos, entretanto a estimativa feita pelo cromossomo Y é de uma separação mais recente do que o estimado por mtDNA (Hammer, 1995; Underhill *et al.*, 1997; Hammer *et al.*, 1998; Seielstad *et al.*, 1999).

HAPLOGRUPOS DO CROMOSSOMO Y

A análise de haplogrupos do Y definidos por polimorfismos binários tem se tornado a metodologia padrão para estudar a origem das populações modernas. Em 2002, O Y Chromosome Consortium (YCC) unificou a nomenclatura dos haplogrupos do Y e publicou uma árvore filogenética com 153 haplogrupos definidos por 243 marcadores binários (YCC, 2002). Em 2008, Karafet e colaboradores, incorporam novos marcadores e a árvore passou por uma remodelagem para representar 311 haplogrupos definidos agora por 599 sendo que a nomenclatura também foi atualizada (Karafet *et al.*, 2008). De acordo com esta classificação mais atualizada, os principais haplogrupos do cromossomo Y são nomeados hierarquicamente de A a T.

As linhagens mais antigas da filogenia do cromossomo Y retratam-se nos dois principais haplogrupos A e B. Conhecido como cromossomo Y de Adão, o haplogrupo A é o mais antigo e apresenta as seguintes mutações- M91/P97. Ramifica-se em 12 haplogrupos dos quais três são paragrupos¹ (Figura 8) e o haplogrupo B, caracterizado pelas mutações M60/M181/P85/P90, é considerado o segundo mais antigo (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 9).

O haplogrupo B encontra-se quase exclusivamente na África sendo o primeiro a dispersar pelo continente onde aparece em baixas freqüências, na ordem dos 6-7% (Underhill *et al.*, 2000; Semino *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2007). Observa-se que a variabilidade do cromossomo Y moderno procedeu, recentemente, do continente africano. A dispersão mundial do cromossomo Y moderno tem, assim, sido interpretada segundo a hipótese *Out of Africa* encontrando apoio de diversos autores (Calafell *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 2001; Underhill *et al.*, 2001, Yu *et al.*, 2002).

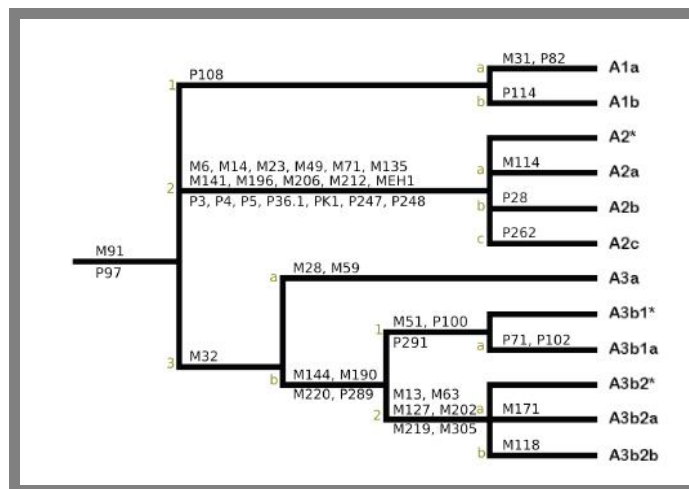


Figura 8- Árvore do haplogrupo A e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

¹ Haplogrupos que pertencem a um haplogrupo mas não a uma de suas ramificações, são denominados paragrupos, ou haplogrupos não derivados, sendo distinguidos dos haplogrupos por um asterisco (YCC, 2002). Por exemplo, linhagens definidas como A2*(figura)estão dentro do haplogrupo A2 porém não pertencem aos haplogrupos A2a, A2b e A2c, que são ramificações de A2.

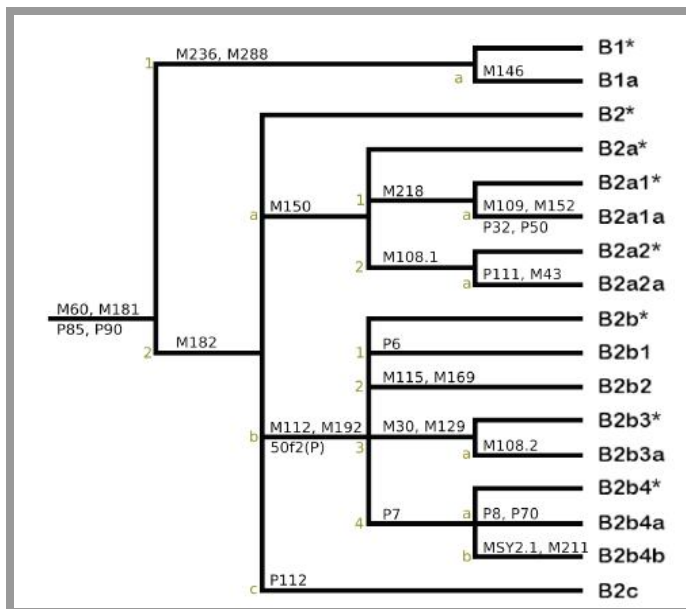


Figura 9- Árvore do haplogrupo B e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo C é definido pelas mutações RPS4Y₇₁₁, M216, P184, P255, e P260 e linhagens pertencentes a esse haplogrupo são encontradas entre populações do continente asiático, na Oceania, entre ameríndios (Hammer *et al.*, 2001; Zegura *et al.*, 2004), Nova Guiné e na Austrália (Hudjashov *et al.* 2007). Ramifica em 18 haplogrupos caracterizadas por 29 marcadores, mais o paragrupo C* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 10).

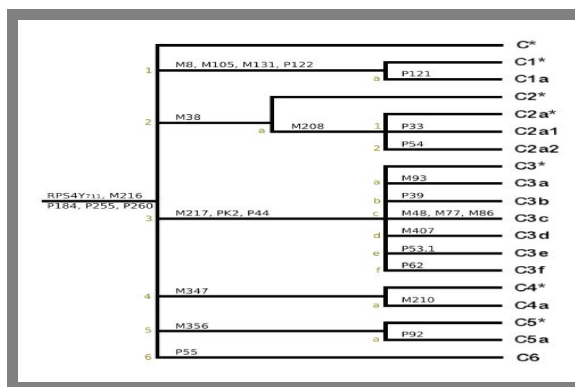


Figura 10- Árvore do haplogrupo C e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo D, uma linhagem antiga encontrada exclusivamente na Ásia, é definido pelas mutações M174 e JST021355, sendo mais frequente na Ásia Central e no Japão, (Su *et al.*, 2000; Karafet *et al.*, 2001; Hammer *et al.*, 2006; Karafet *et al.*, 2008). Possui 14 haplogrupos caracterizados por 21 marcadores internos, mais o paragrupo D* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 11).

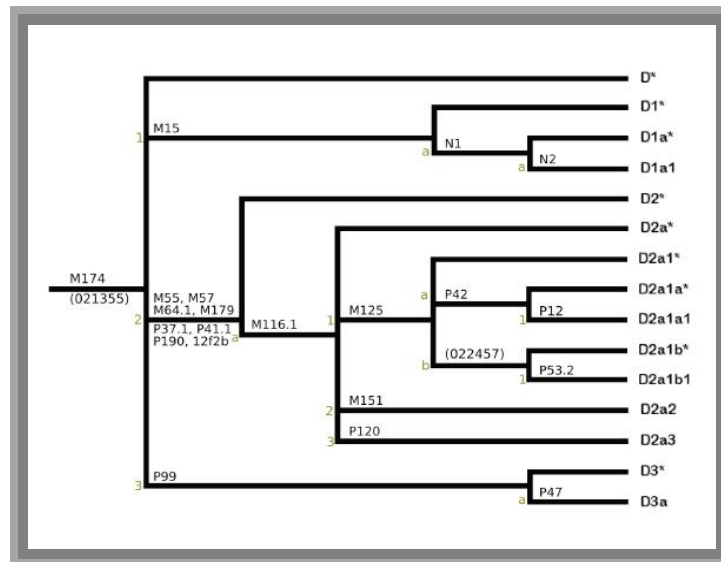


Figura 11- Árvore do haplogrupo D e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo E é caracterizado pelas mutações SRY4064, M96, P29, P150, P152, P154, P155, P156, P162, P168, P169, P170, P171, P172, P173, P174, P175, e P176 apresentando elevadas frequências na África, moderadas no Oriente Médio e no Sul da Europa e ocorrendo raramente nas regiões Central e Sul da Ásia (Hammer *et al.*, 1998; Underhill *et al.*, 2001; Cruciani *et al.*, 2002; Jobling & Tyler-Smith, 2003). É o grupo que possui a maior diversidade, ramificando-se em 55 haplogrupos caracterizados por 83 marcadores, mais o paragrupo E* (Karafet *et al.*, 2008). A mutação M2, que define o haplogrupo E1b1a, é amplamente distribuída na África subsaariana, o que tem sido atribuído à expansão bantu (Underhill *et al.*, 2001; Cruciani *et al.*, 2002). (Figura 12).

O haplogrupo F, caracterizado pelas mutações P14, M89, M213, P133, P134, P135, P136, P138, P139, P140, 0141, P142, P145, P146, P148, P149, P151, P157, P158, P159, P160, P161, P163, P166 e P187, é observado no subcontinente Indiano em frequências moderadas e baixas (Kivisild *et al.*, 2003; Sengupta *et al.*, 2006). São ramificações do haplogrupo F os haplogrupos F1, F2, F3 e F4, bem como os haplogrupos de G a T (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 13).

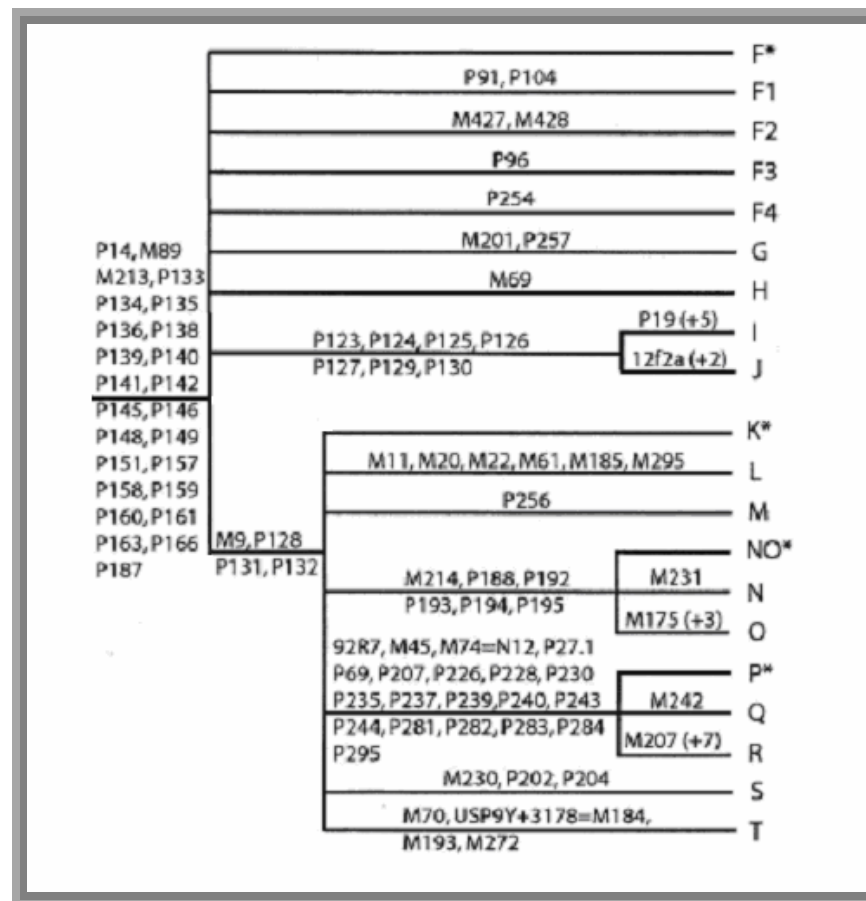


Figura 13 - Árvore do haplogrupo F e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo G, definido pelas mutações M201 e P257. Sua presença foi registrada em populações do Oriente Médio, no Mediterrâneo e nas Montanhas do Cáucaso (Jobling & Tyler-Smith, 2003; Behar *et al.*, 2004; Cinnioglu *et al.*, 2004; Sengupta *et al.*, 2006). Ramifica-se em 10 haplogrupos caracterizados por 13 mutações (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 14).

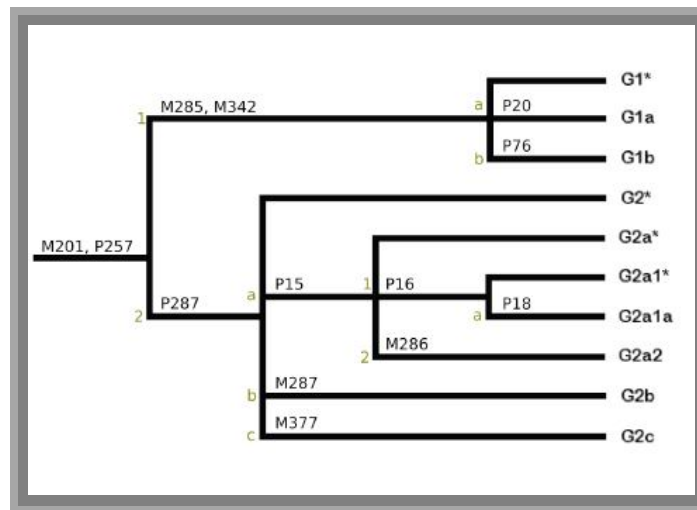


Figura 14- Árvore do haplogrupo G e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo H, definido pela mutação M69 (Karafet *et al.*, 2008) é observado com frequência estimada entre 15,8% e 21% na Índia (Sengupta *et al.*, 2006; Kivisild *et al.*, 2003), sendo ainda encontrado no Paquistão (6,3%) e no Leste da Ásia (0,57%) (Sengupta *et al.*, 2006). Em ciganos da Europa sua frequência é também elevada chegando a 17% em ciganos portugueses (Gusmão *et al.*, 2008) e 44,8% em ciganos da Bulgária (Gresham *et al.*, 2001). O haplogrupo H se ramifica em nove haplogrupos caracterizados por 11 marcadores internos, mais o paragrupo H* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 15).

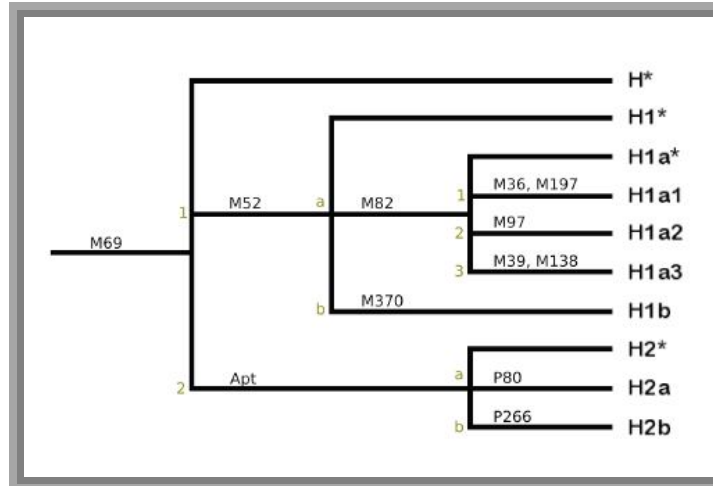


Figura 15- Árvore do haplogrupo H e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo I é caracterizado pelas mutações P19, P38, P212, M170, M258 e U179. É um dos haplogrupos do Y predominantes na Europa (Jobling & Tyler-Smith, 2003), sendo quase ausente em outros locais, o que leva a crer que surgiu na Europa (Semino *et al.*, 2000; Rootsi *et al.*, 2004). Ramifica-se em 15 haplogrupos caracterizados por 29 marcadores internos, mais o paragrupo I* (Figura 16) (Karafet *et al.*, 2008).

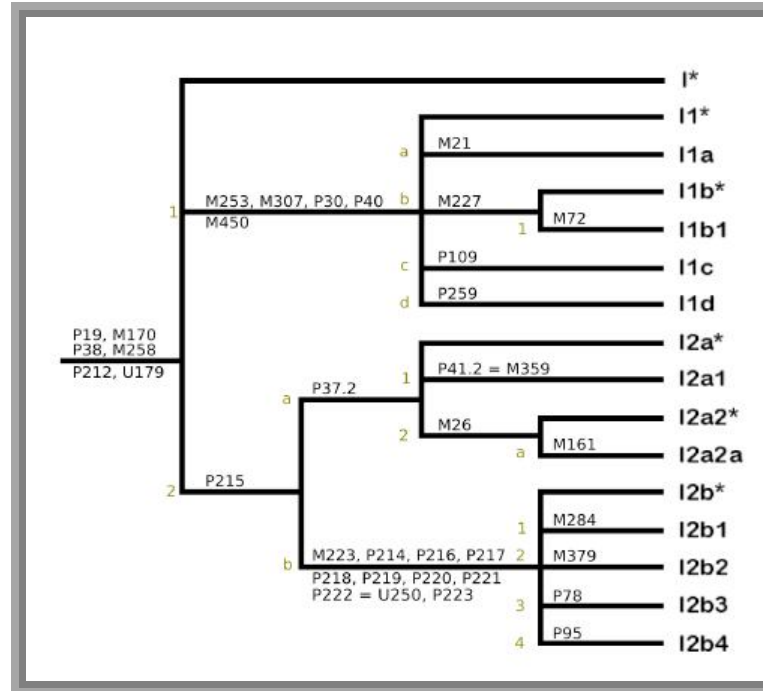


Figura 16- Árvore do haplogrupo I e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo J é definido pelas mutações 12f2a, M304 e P209 (Karafet *et al.*, 2008) distribui-se pelo Oriente Médio, Norte da África, Europa, Ásia Central, Paquistão e Índia (Hammer *et al.*, 2001; Underhill *et al.*, 2001). O haplogrupo J mais comum na Europa é o J2-M172 enquanto que o haplogrupo J1-M267 predomina do Oriente Médio, Norte da África e Etiópia (Semino *et al.*, 2004). Ramifica-se em 34 haplogrupos caracterizados por 39 marcadores, mais o paragrupo J* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 17).

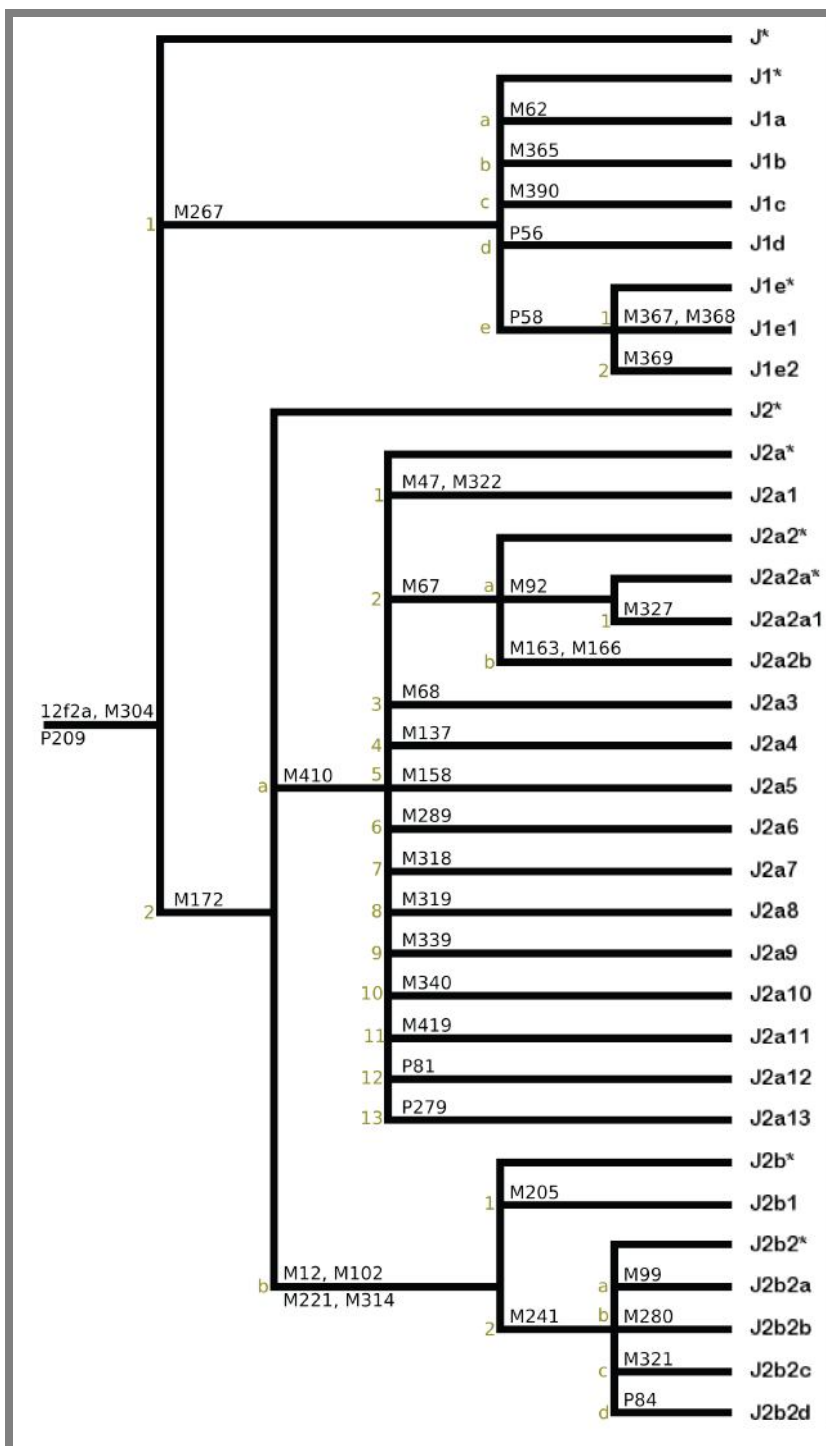


Figura 17- Árvore do haplogrupo J e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo K é caracterizado pelas mutações, P128, P131 e P132 e pelas mutações que definem as linhagens L, M, NO, P, S e T. (Karafet *et al.*, 2008). Cinco mutações internas definem quatro linhagens dentro deste haplogrupo (K1, K2, K3, K4) além do paragrupo K* (Karafet *et al.*, 2008). O haplogrupo K1 é encontrado na Índia, Paquistão e os haplogrupos K2, K3, K4 são encontrados na Oceania, Indonésia e Austrália (Underhill *et al.*, 2001; Karafet *et al.*, 2008) (Figura 18).

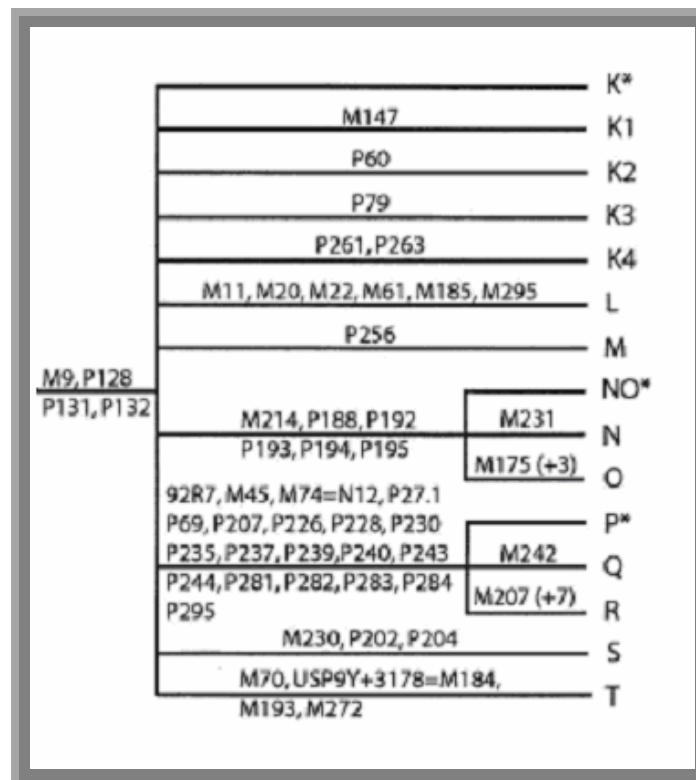


Figura 18- Árvore do haplogrupo K e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo L é definido pelas mutações M11, M20, M22, M61, M185 e M295. A maioria das linhagens é encontrada no subcontinente Indiano e ocorrem também no Oriente Médio, Ásia Central, Norte da África e ao longo da costa do Mediterrâneo, na Europa (Kivisild *et al.*, 2003; Behar *et al.*, 2004; Cinnioglu *et al.*, 2004; Sengupta *et al.*, 2006; Karafet *et al.*, 2008). Apresenta seis haplogrupos caracterizados por sete marcadores internos, mais o paragrupo L* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 19).

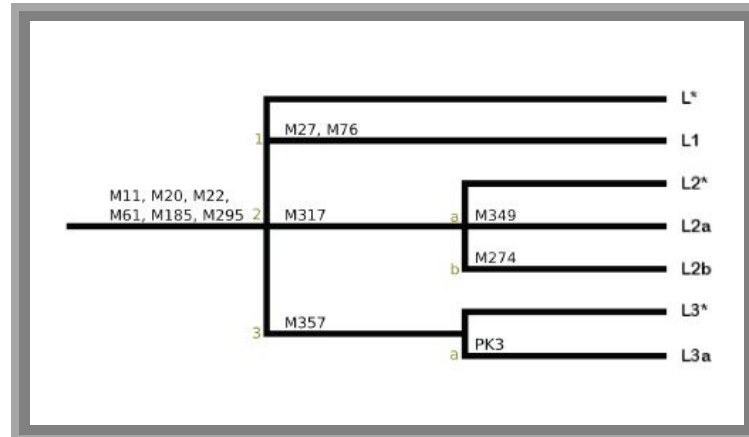


Figura 19- Árvore do haplogrupo L e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo M é definido pela mutação P256 (Karafet *et al.*, 2008). A distribuição geográfica do haplogrupo M é restrita à Oceania e ao Leste da Indonésia, a maioria das linhagens masculinas em Papua, Nova Guiné, e Melanésia pertence ao haplogrupo M (Su *et al.*, 2000; Kayser *et al.*, 2006; Scheinfeldt *et al.*, 2006). As ramificações do haplogrupo M são definidas por 19 mutações internas, mais o paragrupo M* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 20).

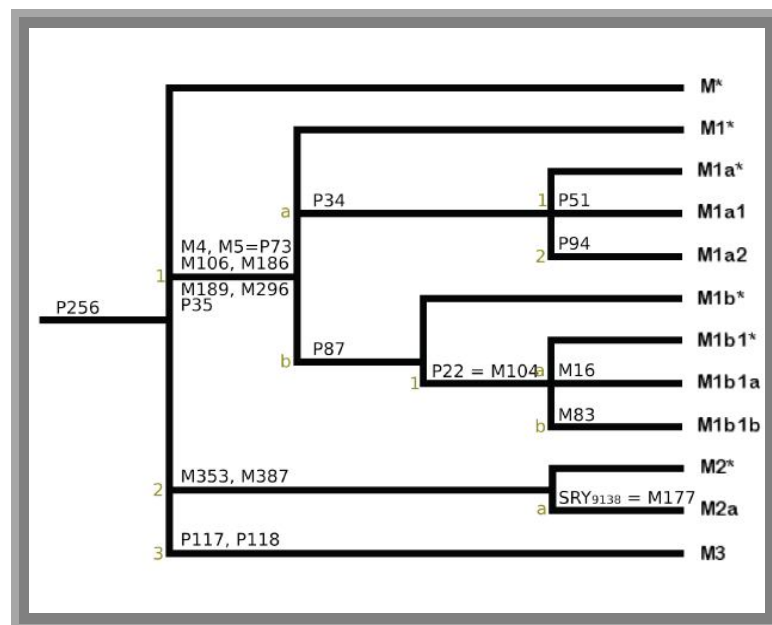


Figura 20- Árvore do haplogrupo M e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo N é o mais comum nas populações da Finlândia e de Nativos Siberianos, sendo definido pela mutação M231 (Cinnioglu *et al.*, 2004). Linhagens N são encontradas no Norte da Eurásia, estando ausentes ou em baixas frequências em outras regiões (Karafet *et al.*, 2001; Rootsi *et al.*, 2007). É formado pelo parágrafo N* e por nove ramificações definidas por 10 mutações internas (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 21).

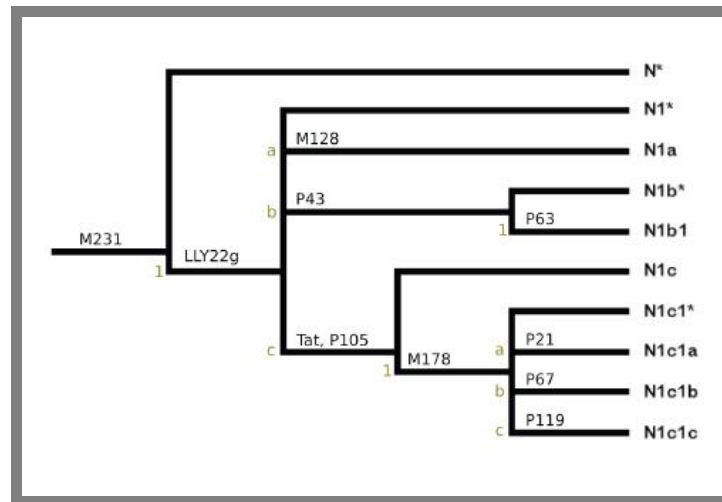


Figura 21- Árvore do haplogrupo N e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O Haplogrupo O é observado em 80% da população do oeste asiático, sendo restrito a estas populações. A linhagem O1 é encontrada originalmente em populações nativas de Taiwan, sendo também encontrada na Micronésia, Melanésia e Polinésia. A linhagem O2 é altamente frequente em populações Japonesas e coreanas (<http://www.roperld.com/ybiallyelichaplogroups.htm>).

Este haplogrupo definido pelas mutações M175, P186, P191 e P196 (Karafet *et al.*, 2008), predomina no Leste da Ásia, ocorrendo também, com menor frequência, na Ásia Central (Su *et al.*, 1999; Karafet *et al.*, 2001; Underhill *et al.*, 2001). O haplogrupo O contém 29 haplogrupos definidos por 44 mutações internas, mais o parágrafo O* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 22).

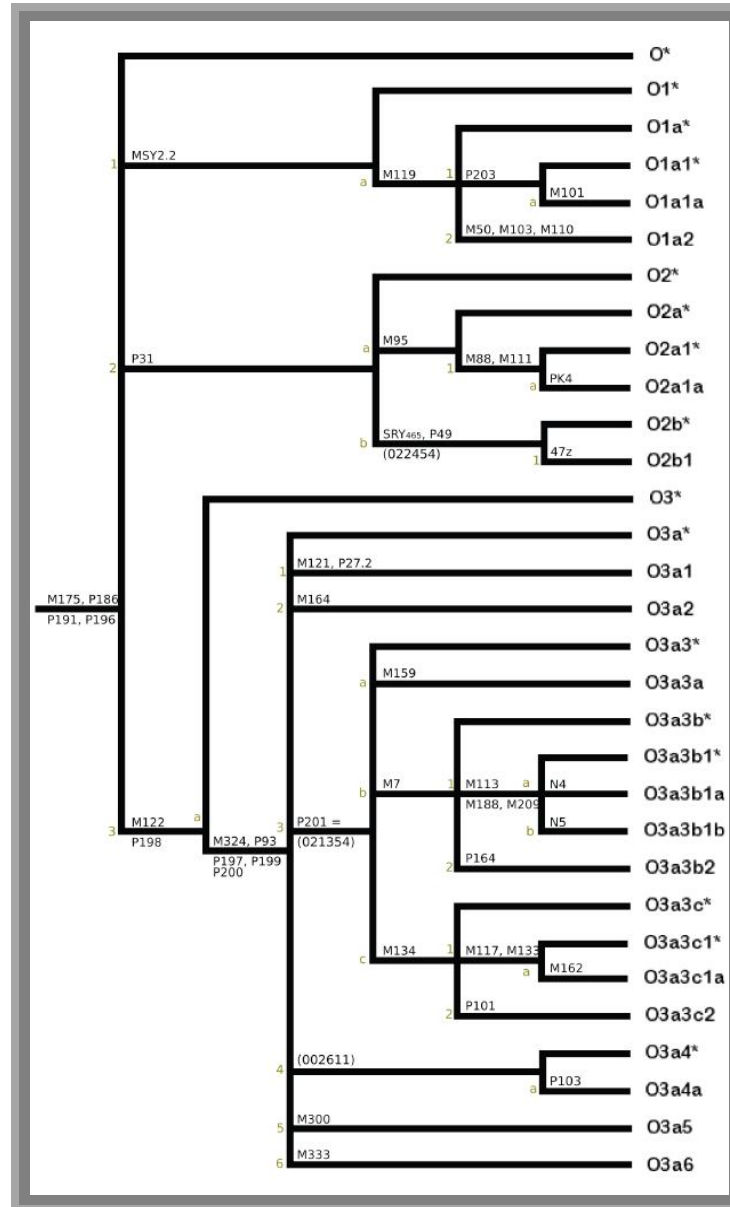


Figura 22- Árvore do haplogrupo O e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo P, caracterizado pelas mutações 92R7, M45, M74, P27.1, P69, P207, P226, P228, P230, P235, P237, P239, P240, P243, P244, P281, P282, P283, P284 e P295, derivam os haplogrupos Q e R, linhagens com amplas distribuições geográficas (Karafet *et al.*, 2001).

O haplogrupo Q, definido pela mutação M242 (Karafet *et al.*, 2008), é encontrado amplamente distribuído no Norte da Eurásia, ocorrendo ainda com frequências elevadas em populações da Sibéria. É também verificado na Europa, Leste da Ásia e no Oriente Médio, contudo nestas regiões a sua frequência é baixa

(Karafet *et al.*, 2002; Karafet *et al.*, 2008). O Q1a3a-M3 é a principal linhagem verificada entre os ameríndios, sendo a sua ocorrência quase totalmente restrita às Américas (Jobling & Tyler-Smith, 2003; Zegura *et al.*, 2004). O parágrafo Q* é observado com frequência baixa, na Índia e no Paquistão (Karafet *et al.*, 2008). Apresenta-se em 13 haplogrupos caracterizados por 17 mutações internas, mais o parágrafo Q* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 23).

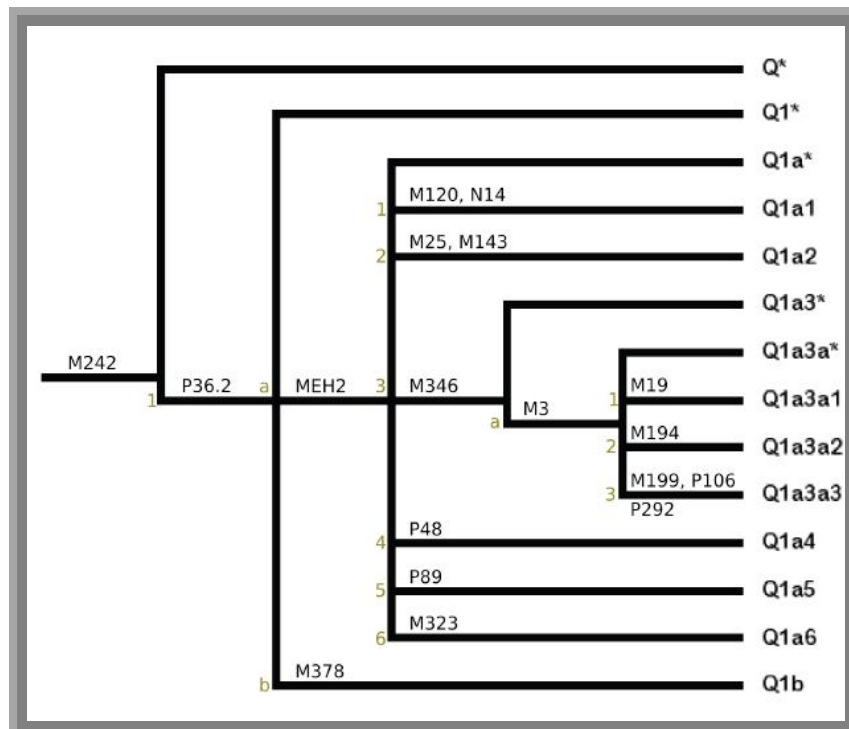


Figura 23- Arvore do haplogrupo Q e suas ramificações (Fonte- Karafet *et al.*, 2008)

O haplogrupo R, definido pelas mutações M207, M306, P224, P227, P229, P232, P280 e P285 (Karafet *et al.*, 2008), divide-se em 28 haplogrupos definidos por 42 mutações (Figura 24). Apresenta duas linhagens principais- R1a, provavelmente originada nas estepes da Eurásia, no norte dos mares Negro e Cáspio, e o R1b, haplogrupo europeu mais comum, apresentando o Haplótipo Modal Atlântico (HG1). O haplogrupo R1 é verificado em cerca de 50% dos cromossomos Y da Europa (Semino *et al.*, 2000). É encontrado com baixas frequências na África, Oriente Médio, Austrália, Ásia Central, Paquistão, Índia e América (Underhill *et al.*, 2000). Em Portugal, o haplogrupo R1b1b2-M269 é o mais frequente, correspondendo a

57,7% da população (Beleza *et al.*, 2006), sendo também, com frequência de 51,2% o haplogrupo mais frequente no Brasil (Silva *et al.*, 2006).

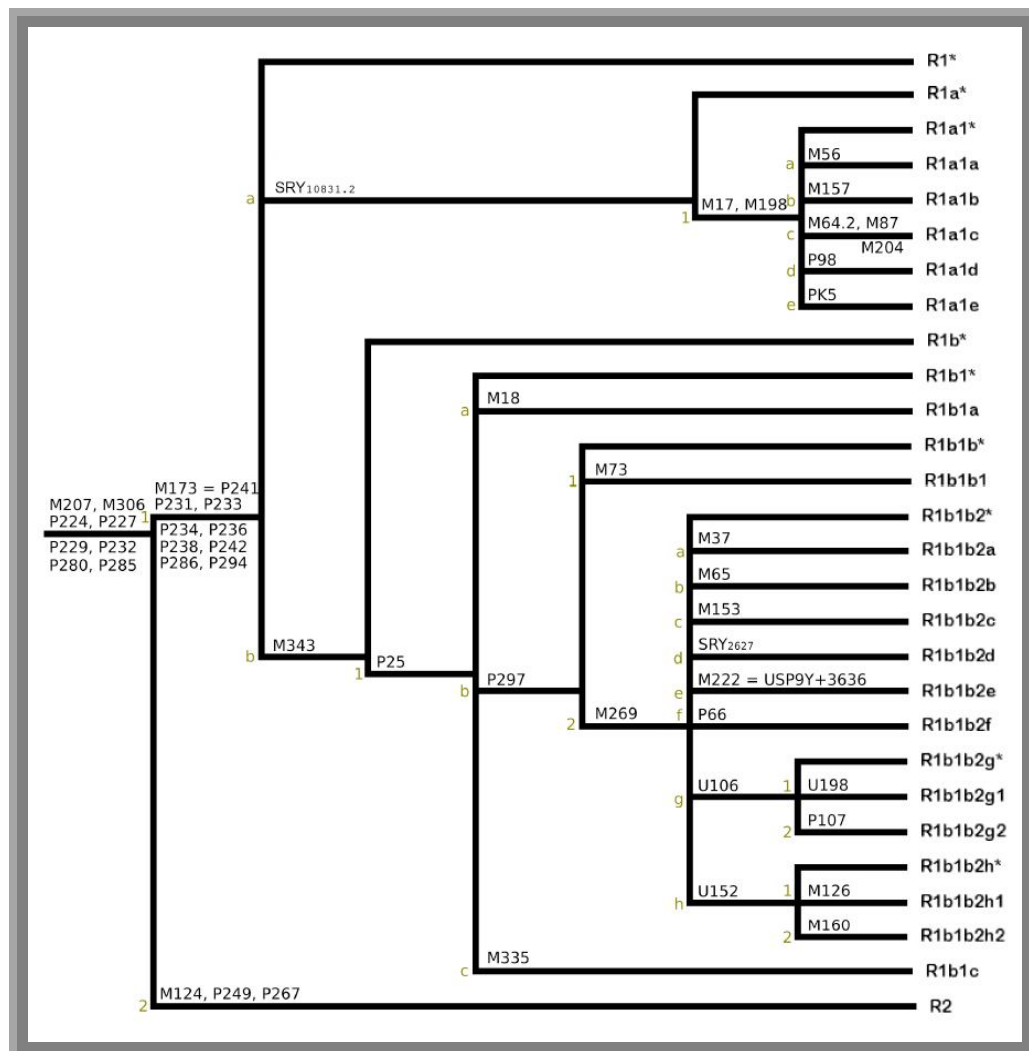


Figura 24-Árvore do haplogrupo R e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010)

O haplogrupo S é identificado pelas mutações M230, P202 e P204 (Karafet *et al.*, 2008). Linhagens pertencentes ao haplogrupo S são encontradas principalmente na Oceania e Polinésia (Kayser *et al.*, 2006; Scheinfeldt *et al.*, 2006). Apresenta cinco haplogrupos, definidos por oito mutações, e o paragrupo S* (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 25).

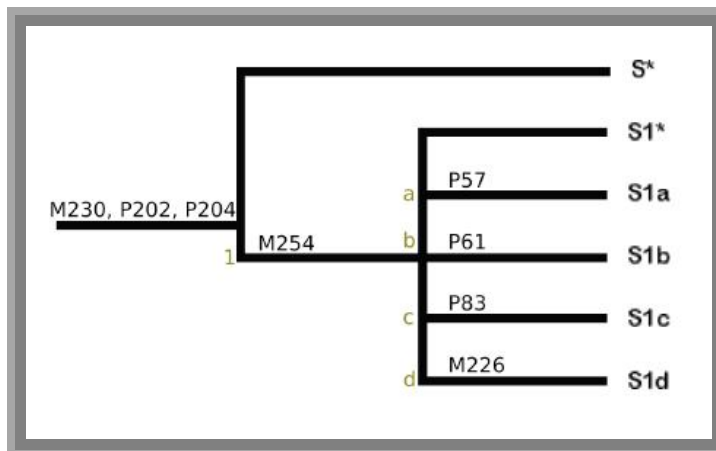


Figura 25- Árvore do haplogrupo S e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010).

O haplogrupo T, anteriormente denominado de K2-M70, é definido pelas mutações M70, M193, M272 e USP9Y+3178, apresenta frequência baixa no Oriente Médio, África e Oeste da Eurásia, sendo mais freqüente no Oriente Médio e Nordeste da África, onde ocorre com freqüência média de 6,8% (King *et al.*, 2007). No haplogrupo T estão inclusos o paragrupo T* e dois haplogrupos marcados por duas mutações internas (Karafet *et al.*, 2008) (Figura 26).

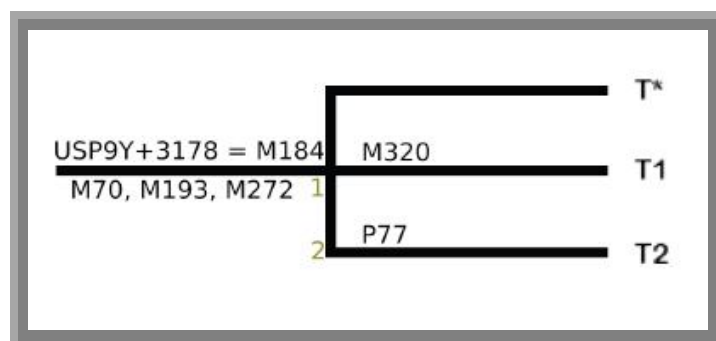


Figura 26- Árvore do haplogrupo T e suas ramificações (Modificado de Azevedo, 2010)

Vários tipos de evidências sugerem que o pool gênico da população européia atual surgiu de grupos caçadores-coletores do período paleolítico há 46.000-35.000 anos e de agricultores do Neolítico há 12.000-4000 anos, vindos do leste da região do Oriente Médio, atualmente, Israel, Cisjordânia e Líbano, partes da Jordânia, Iraque, Egito e sudeste da Turquia (Semino *et al.*, 2000).

Dois haplogrupos I* e R*, caracterizados pelas mutações M170 e M173, respectivamente, estariam presentes na Europa desde a época do Paleolítico (Semino *et al*, 2000, Cruciani *et al*, 2002). O haplogrupo R e alguns derivados são verificados em mais de 50% dos cromossomos europeus, sendo o haplogrupo R1b1b2 (M269) o mais freqüente em povos Ibéricos, incluindo Bascos (Cinnioglu *et al*, 2004), onde apresenta frequências maiores que 57% (Beleza *et al.*, 2006). A figura 27 representa a árvore filogenética do cromossomo Y, onde a extremidade dos ramos destaca os haplogrupos que são classificados de A-T e a figura 28 ilustra a distribuição dos haplogrupos do cromossomo Y pelo mundo.

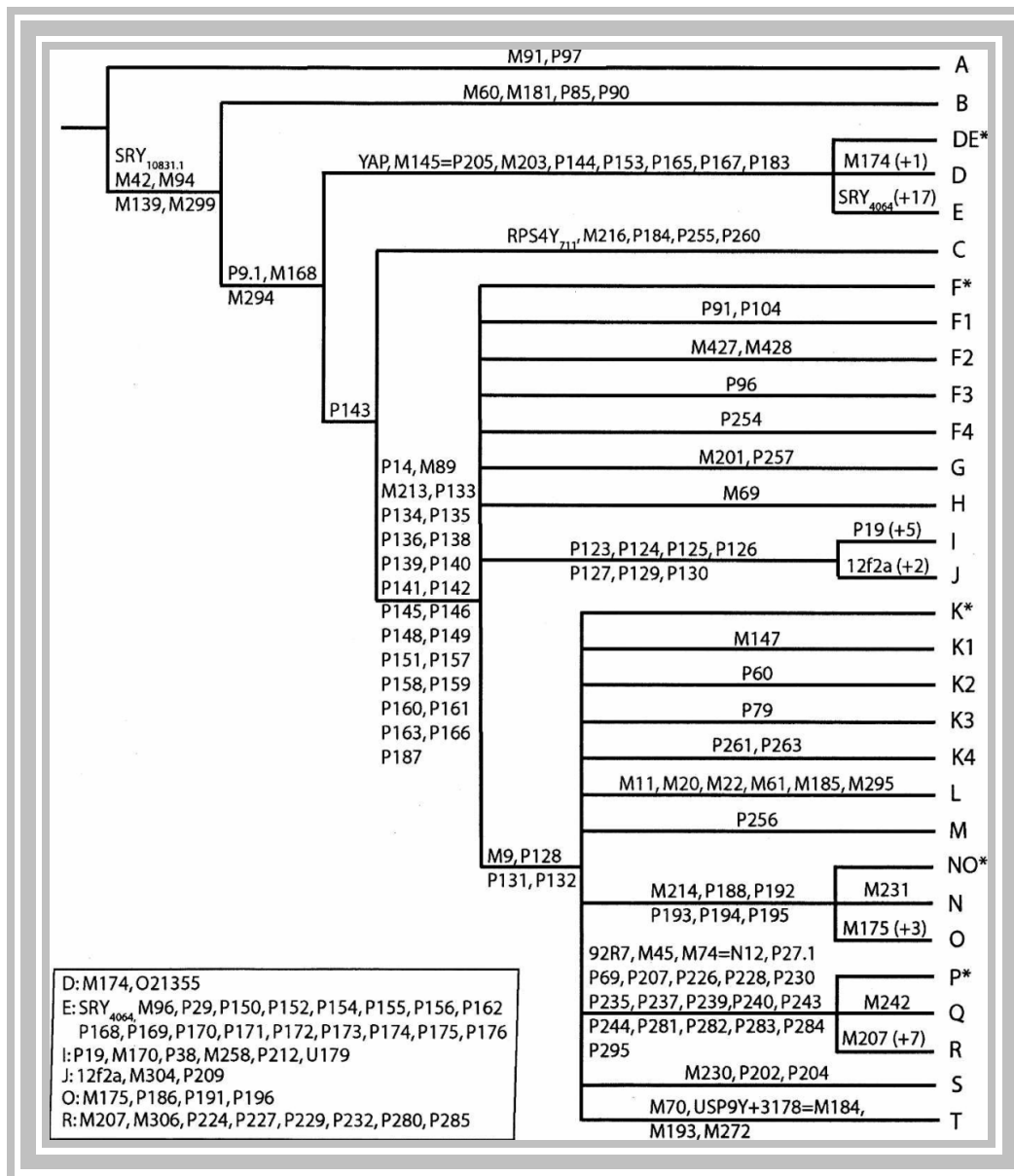


Figura 27- Forma simplificada da árvore filogenética do cromossomo Y (Karafet *et al.*, 2008)

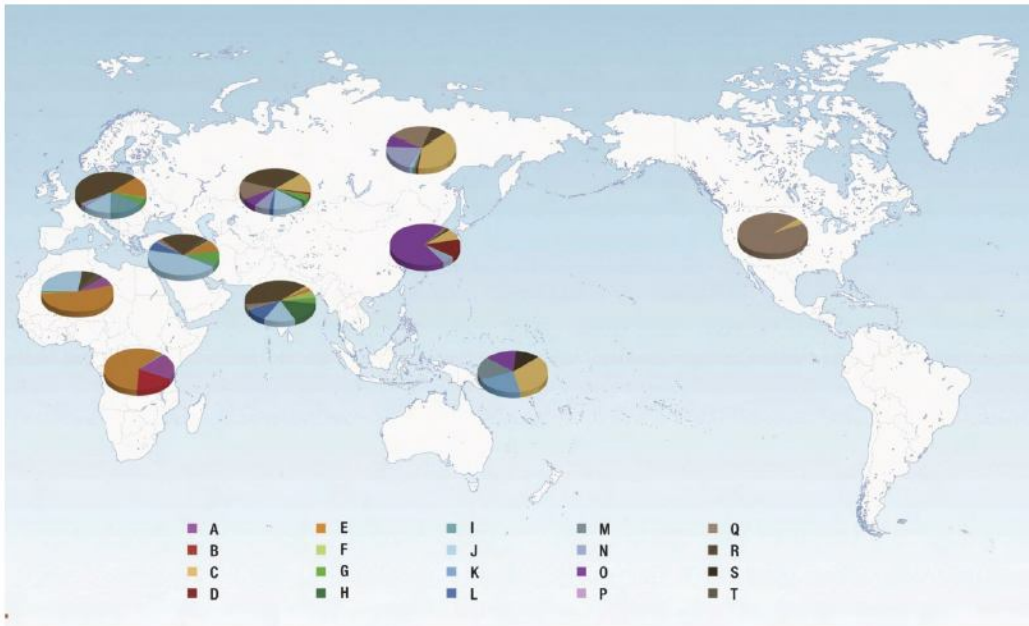


Figura 28-Distribuição global dos haplogrupos do cromossomo Y (Karafet *et al.*, 2008)

POVOAMENTO DA AMÉRICA

A América foi o último continente a ser colonizado pelos humanos, e ferramentas de arqueologia, paleontologia, linguística e genética têm sido empregadas na tentativa de elucidar a origem da população nativa americana (Greenberg *et al.*, 1986; Bianchi *et al.*, 1998; Cavalli-Sforza, 1998). Talvez o único ponto onde exista consenso entre os cientistas é que o homem moderno chegou a América vindo do continente asiático, através da Beríngia, durante a última grande glaciação (Cavalli-Sforza, 1997; Bianchi *et al.*, 1998; Schurr, 2004).

A Beríngia foi uma ponte que surgiu entre a Sibéria e a América do Norte, onde hoje está situado o estreito de Bering (Figura 29), quando a última glaciação, que ocorreu entre 13.000 e 40.000 anos, reduziu o nível dos oceanos devido à concentração das águas do planeta nas calotas polares (Hopkins, 1959; Hulten, 1972; Hoffecker *et al.*, 1993).

Diversas hipóteses tentam explicar como ocorreu esse povoamento. Até pouco tempo, a hipótese mais aceita era a chamada “Clovis-First”, segundo a qual, a

primeira população humana a entrar no continente americano chegou há cerca de 12.900 anos, logo após a última grande glaciação, e povoou rapidamente o continente. Os sítios arqueológicos encontrados em Clóvis, no México, eram os mais antigos sítios paleoíndios descobertos e confirmados. Por isso, arqueologistas acreditavam que esses sítios demarcavam a primeira ocupação das Américas. Entretanto, a descoberta de uma série de sítios mais antigos na América do Norte colocou essa hipótese em questionamento (Schurr, 2004).

Os registros históricos mais recentes da ocupação humana no Brasil encontram-se no sítio arqueológico Alice Boer, localizado no centro-sul do país (Guidon, 1987).



Figura 29- Representação da origem asiática dos nativos americanos. Os ancestrais teriam chegado às Américas através do que é hoje o estreito de Bering. Fonte-www3.nationalgeographic.com/geographic/atlas.html.

Alguns autores acreditam que antes de entrar nas Américas, uma única população fundadora permaneceu, por cerca de 15.000 anos, isolada, provavelmente na Beríngia (Perego *et al.*, 2010), tempo suficiente para o surgimento de mutações específicas não encontradas nos seus ancestrais asiáticos, tendo após esse período povoado rapidamente o continente americano. (Bonatto & Salzano, 1997; Tamm *et al.*, 2007). Essa hipótese é reforçada pela ampla distribuição de um alelo específico do locus D9S1120 de populações nativas americanas e pela ausência desse marcador nos outros continentes, com exceção de duas populações localizadas no oeste da Beríngia (Schroeder *et al.*, 2007).

Greenberg *et al.* (1986), ao agrupar as línguas Americanas nativas em três grandes grupos- ameríndios, nadene e esquimós-aleuta, sugeriram, apoiados por estudos odontológicos e genéticos, que esse grupos, partindo da Ásia, teriam chegado ao continente americano em três ondas migratórias distintas. Os primeiros a chegar teriam sido os ameríndios, em seguida os nadene e, por fim, os esquimós-aleutas. Os dois últimos grupos teriam permanecido perto do Ártico, enquanto o primeiro ocupou todo o continente.

A teoria mais aceita sugere que as populações nativas americanas atuais teriam origem de grupos asiáticos que colonizaram o noroeste da Sibéria, incluindo partes da Beríngia, e que ficando isolados nessa região quando da última era glacial, foram modificados geneticamente por efeitos de deriva gênica. Durante esse tempo, os haplótipos de origem asiática foram modificados ou perdidos, originando novos haplótipos e ao mesmo tempo novos haplótipos frequentemente predominantes devido à elevada ocorrência de efeito fundador (Tamm *et al.*, 2007; Achilli *et al.*, 2008; Bourgeois *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2009; Perego *et al.*, 2009; 2010).

Esta teoria foi refutada quando em 2012, um grupo de pesquisadores liderados por Reich destacou a existência de três ondas migratórias. O estudo foi bastante detalhado, utilizando-se de 364.470 marcadores genéticos em 52 populações de Nativos Americanos e 17 siberianas. O trabalho retorna à hipótese proposta por pesquisadores norte-americanos em 1986 (Greenberg *et al.*, 1986), como já descrito anteriormente, a de que seriam três ondas migratórias que deram origem à população do continente. Uma a partir da região de Bering, a principal, que teria originado a grande maioria dos ameríndios; e duas outras secundárias, que originaram respectivamente os esquimós-aleutas e os nadene. Uma outra questão que foi destacada é que o povoamento das Américas teria sido facilitado por uma rota costeira ao longo do Pacífico, com divisões populacionais e pouco fluxo após a divergência; porém, os falantes Chibchas da América Central teriam recebido material genético tanto da América do Norte quanto do Sul (Reich *et al.*, 2012).

POPULAÇÃO BRASILEIRA

O Brasil é dividido geopoliticamente em 5 regiões- Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Apesar da história oficial do Brasil ter iniciado em 1500 com a colonização portuguesa, os ameríndios já habitavam o território brasileiro a pelo menos 12 mil anos. O número de ameríndios foi reduzido ao longo da história do país, tendo sido recentemente estimada em 896,9 mil indivíduos (IBGE, 2010).

Durante o período de 1500 a 1808 houve a chegada de aproximadamente 500.000 portugueses, sendo a sua maioria homens (Salzano e Freie- Maia, 1967). O tráfico de escravos africanos ocorreu desde a metade do século XVI até 1855, período em que, 4 milhões foram trazidos para o Brasil (IBGE, 2000). Eles eram oriundos de diferentes regiões da África subsaariana, predominantemente de regiões onde hoje estão localizados Angola, Congo e Moçambique (Curtin, 1969). Dessa maneira, verifica-se que os primeiros brasileiros foram gerados por homens europeus e mulheres indígenas e africanas. Tal padrão de mistura perdurou, sem interferência de outros povos, por mais de 300 anos, constituindo-se como a base genética da população brasileira. Estima-se que entre 1500 à 1960 chegaram ao Brasil cerca de 5 milhões de europeus. Os primeiros imigrantes europeus não portugueses chegaram ao Brasil juntamente com a família real portuguesa, em 1808 (Callegari-Jacques & Salzano, 1999).

Com o término do tráfico de escravos, tal imigração intensificou-se no final do século XIX e manteve-se relativamente alta até meados do século XX, quando também tem início a imigração de asiáticos. Portanto a gênese da população brasileira ocorreu a partir de colonizadores europeus, representados exclusivamente pelos portugueses, escravos africanos e indígenas, em um processo de miscigenação que já se estende por meio milênio. A distribuição não homogênea desses componentes em país de grande extensão territorial se relaciona diretamente com a composição genética atual da população do Brasil (IBGE, 2010), sendo esta reconhecida como uma das mais heterogêneas do mundo (Carvalho-Silva, 2001).

Face ao seu grande crescimento populacional nos séculos anteriores à ocupação dos europeus, indígenas que viviam na região da Amazônia deslocaram-se para o sul, expulsando e exterminando outras populações indígenas, ocupando,

assim, regiões anteriormente habitadas pelos mesmos (IBGE, 2000). Como consequência, os nativos americanos têm grande influência sobre a composição étnica e cultural de todas as populações sul-americanas. No entanto, sua contribuição genética ainda não é totalmente conhecida.

No Brasil, existem grupos populacionais, de indígenas e de afrodescendentes isolados ou semi-isolados que preservam, em graus variados, aspectos culturais e genéticos de seus antepassados. Tais comunidades constituem importantes fontes de informação relativa aos grupos étnicos fundadores da população brasileira. Os Terena, comunidade indígena do estado do Mato Grosso do Sul, e uma comunidade urbana da região de Santa Isabel do Rio Negro, no estado do Amazonas, cujas amostras populacionais foram estudadas no desenvolvimento deste trabalho são, em teoria, exemplos de comunidades com representação relativamente elevada dos nossos ancestrais nativos americanos.

TERENA- MATO GROSSO DO SUL

Os Terena fazem parte do grupo Chané-Guaná que habitava a região do Chaco Paraguai. Vinculados à família linguística Aruak, suas relações com os não-indígenas ocorreram a partir de incursões espanholas ao interior da América Meridional, nos primeiros dois séculos que se seguiram à chegada dos europeus no “Novo Mundo”. As disputas territoriais entre colonizadores de Portugal e Espanha nas Américas implicaram em conflitos com vários povos indígenas que viviam no Chaco, porém isso não impediu o estabelecimento de relações diversas de alianças e de guerras com esses colonizadores.

A presença dos índios Chané-Guaná, incluindo os Terena, na margem oriental do rio Paraguai entre a segunda metade do século XVIII ao século XIX se vinculava a uma série de fatores, entre os quais, destacam-se dois- a colonização luso-espanhola no Chaco paraguai e a proximidade com outros grupos étnicos, com as quais mantinham relações. Ao cruzarem o rio Paraguai, o objetivo dos Terena era se expandir para o leste do continente brasileiro, se estabelecer no que é hoje o sul do Mato Grosso, próximo ao rio Miranda e Aquidauana, onde vivenciaram

problemas semelhantes aos do seu antigo território- a existência de outros grupos indígenas na região e, sobretudo a colonização europeia que ali também se desenvolvia (Schuch, 1995).

O pouco contato que os Terena mantinham com os não-índios era uma relação de troca dos seus bens e produtos, situação que perdurou até a guerra do Paraguai (1864-1870), um importante marco para a modificação da organização de várias sociedades indígenas, inclusive a os Terena. Os Terena viram-se obrigados a deixar sua aldeia para se protegerem dos ataques paraguaios (Vargas, 2003).

Ao término da guerra, os Terena, que se aliaram ao exército brasileiro, restabeleceram as relações de amizade mantidas com as autoridades brasileiras e por meio delas reivindicaram direito de permanecer nas terras que ocupavam, conseguiram a legalização das terras, que constituem suas principais reservas e onde se encontram até hoje.

O Estado de Mato Grosso do Sul, localizado na região Centro-Oeste do Brasil, concentra a 2º maior população indígena do país, reunida em 75 aldeias e distribuída com oito etnias, sendo elas por ordem de predominância: Guarani, Kaiowá, Terena, Kadiwéu, Kinikinau, Guató, Ofaié e Atikun, compreendendo 68.862 indígenas, distribuídos em 29 municípios (Siasi/Funasa-MS, 2010) (Figura 30).

Os Terena constituem a segunda maior população indígena do estado do MS, com aproximadamente por 20 mil indivíduos que vivem majoritariamente nos municípios de Aquidauana, Anastácio, Dois Irmãos do Buriti, Sidrolândia, Miranda e Nioaque.

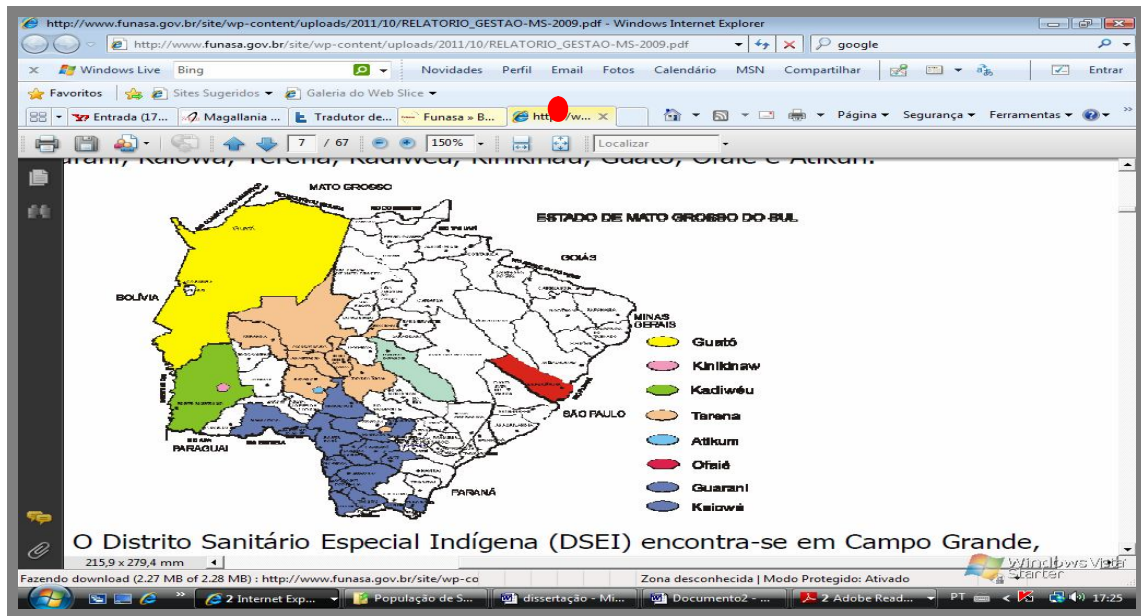


Figura 30- Mapa do estado do Mato Grosso do Sul. Destacando as diferentes etnias indígenas presentes nesse estado.

POPULAÇÃO DE SANTA ISABEL DO RIO NEGRO, AMAZONAS

Segundo o censo demográfico do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) realizado em 2010, a região Norte do Brasil permanece abrigando a maior quantidade de indígenas (305.873), seguido do Nordeste (208.691) e Centro-Oeste (130.494). Na comparação entre os três últimos Censos, houve crescimento na quantidade de índios nestas regiões.

Em 2010, a população total residente em Santa Isabel é de 17.702 habitantes. A extensão do município de Santa Isabel do Rio Negro é de 62.846 km² (IBGE). (Figura 31).

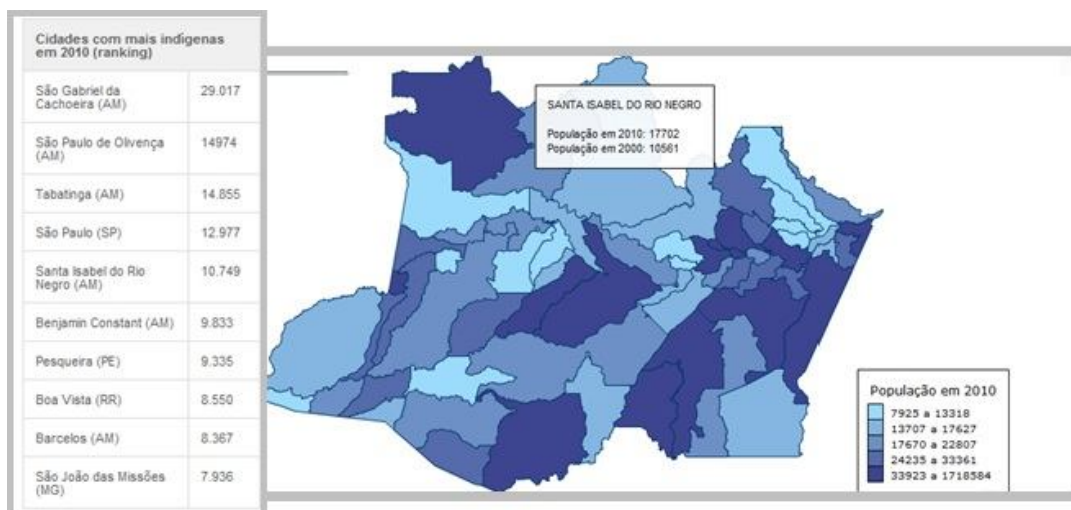


Figura 31-A tabela apresentada na figura destaca as cidades com maior número de indígenas no ano de 2010. Santa Isabel do Rio Negro (AM) está em 5º lugar com 10.749 indígenas. O mapa demarca a região de Santa Isabel e enfatiza a ocorrência do aumento populacional neste mesmo ano em comparação com o ano de 2000 (IBGE, 2010).

A Amazônia compreende uma extensa área de terras baixas com cerca de 6,6 milhões de km², coberta prevalentemente de florestas tropicais, compartilhada por nove (9) países- parte do Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e os territórios da Guiana Francesa, Guiana e Suriname. O processo de ocupação da Amazônia pode ter iniciado há 10 - 11 mil anos, com a chegada de paleoindíós caçadores-coletores, vindos do norte e do oeste do continente (Roosevelt, 1994). A partir do final do século XV, uma segunda onda de ocupação ocorreu com a chegada dos europeus, representados principalmente por portugueses, espanhóis, franceses e holandeses. Mais tarde chegaram os africanos, trazidos compulsoriamente como mão-de-obra escrava.

O processo de miscigenação entre os europeus e nativos indígenas iniciou logo após a chegada dos primeiros colonizadores. Os primeiros imigrantes portugueses eram representados principalmente por soldados, marinheiros, deportados e comerciantes de Pau-brasil (Ribeiro, 1995). Portanto homens. Registros históricos indicam que este foi um dos motivos, que levou ao processo de miscigenação entre homens europeus e mulheres indígenas. A coroa portuguesa tolerou estes relacionamentos, desde o início da colonização, mas passou a estimular este tipo de casamento oficialmente, como estratégia de ocupação do território, após a liberação do Alvará de Lei emitido em 4 de abril de 1755 pelo

Marquês de Pombal. Na segunda metade do século XVIII, com a chegada de escravos africanos, o processo de miscigenação também se estende às mulheres africanas.

O certo é que três grupos étnicos (ameríndios, europeus e africanos), muito diferentes do ponto de vista biológico e cultural, passaram a conviver em uma área restrita. Em resposta as demandas ambientais e sociais, todos estes grupos passaram a interagir de tal forma que, hoje, as atuais populações humanas da Amazônia (as populações tri-híbridas ou cablocas – termo usualmente empregado na região para definir as populações mestiças) são formadas pela mistura destes principais grupos étnicos.

COLONIZAÇÃO NO RIO NEGRO

Após a expulsão dos jesuítas da Amazônia, em 1661, o povoamento do Rio Negro se tornou mais tranquilo com a chegada de religiosos de outras congregações a partir de 1695 que, com a finalidade de catequizar os índios, fundaram vários povoados ao longo do rio (Funai). Com isso, a região do Rio Negro é integrada por uma complexa rede de relações interétnicas, que inclui brancos e diferentes povos indígenas, formada por laços de parentesco, religiosos, econômicos e políticos que ultrapassam as fronteiras com a Colômbia e a Venezuela.

As migrações indígenas para os centros urbanos regionais, como São Gabriel da Cachoeira, Santa Isabel do Rio Negro, Barcelos, Novo Airão e Manaus, constituem uma alternativa às condições de vida nas aldeias.

Desde fins do século XVII até meados do XVIII, o processo de ocupação do Rio Negro é marcado pela transferência forçada de populações indígenas para perto dos centros coloniais, como Belém e São Luís. O decréscimo do contingente populacional indígena decorreu não só por causa da escravização, mas também das epidemias trazidas pelos brancos. A prática de captura de índios no alto Rio Negro para explorar a sua força de trabalho nos seringais contou com a colaboração dos missionários capuchinhos, carmelitas e franciscanos (Meira, 1991).

O Médio Rio Negro localiza-se à jusante da cidade de São Gabriel da Cachoeira, passando pela cidade de Santa Isabel do Rio Negro, abrangendo os dois

municípios de mesmo nome, até as bocas dos rios Jurubaxi e Padauri, na margem esquerda e direita do rio Negro, respectivamente (IBGE).

Quase a totalidade da população é indígena e está distribuída em 299 povoados, incluindo a cidade de Santa Isabel do Rio Negro, sede do município de mesmo nome. Um contingente expressivo desta população é oriundo do Alto Rio Negro (rios Içana, Uaupés e Xié). Essa migração ocorreu porque essa população teria fugido dos comerciantes brancos (colombianos e brasileiros) e dos missionários; por causa de disputas territoriais entre os povos Aruak e Tukano (Oliveira, 1995). Os grupos étnicos majoritários são os Tukano, Baré e Baniwa. Os Maku constituem uma parcela mínima da população indígena só existindo um único grupo linguístico no Médio Rio Negro, os Dâw.

Dentro das fronteiras do município de Santa Isabel, além da sede municipal, existem nove aldeias Yanomami e, outras 42 comunidades e vários sítios, são unidades que reúnem um pequeno número de famílias que acessam aos serviços de educação, religião e saúde nas comunidades. Os habitantes das comunidades e sítios se afiliam às seguintes etnias- Baré, Baniwa, Tariana pertencem a família lingüística Aruak, já os Tucano, Piratapuaia, Desana, Arapaço e Tuyuca pertencem à família lingüística Tukano Oriental (Dias *et al.*, 2008).

Existem comunidades onde toda a população é indígena, sejam os moradores identificados com uma ou várias etnias e outras onde a população indígena convive com não indígenas, às vezes desenvolvendo laços de parentesco entre si. A maioria dos moradores das comunidades possui parente vivendo na sede do município, e algumas famílias inteiras alternam temporadas na comunidade e na cidade. Muitos moradores deixaram o município em busca de melhores condições em outras regiões, especialmente em Manaus (40%) pela oferta de emprego e serviços sociais e São Gabriel da Cachoeira (28%) pela procura de serviço militar (Dias *et al.*, 2008).

Entre os vários grupos indígenas residentes da sede municipal de Santa Isabel do Rio Negro, verifica-se uma forte presença dos Tukano e Baniwa, boa parte da qual é oriunda das comunidades indígenas do alto Rio Negro, principalmente das calhas dos Rios Uaupés e Içana. No entanto, a maioria da população residente na sede do município, cerca de 60% identifica-se como Baré, grupo indígena localizado ao longo do médio e alto Rio Negro (Dias *et al.*, 2008).

Este trabalho visa contribuir para o conhecimento sobre a diversidade das populações nativas da América do Sul, investigando a ancestralidade genética. Para essa finalidade foi utilizada uma amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro, no estado do Amazonas, cuja população apresenta maior número de auto declarado indígena (161.680) com base no quesito cor ou raça e os Terena, nativos americanos que vivem no estado do Mato Grosso do Sul que se encontra em segundo lugar (73.295) no Brasil (IBGE, 2010). Para verificar a verdadeira influência étnica, foi realizada através da análise das linhagens paternas e maternas, a ancestralidade dessas populações.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento a respeito da ancestralidade ameríndia na população brasileira, através da análise de marcadores uniparentais presentes na porção não recombinante do cromossomo Y e na região controle do DNA mitocondrial. Com essa finalidade, amostras populacionais da tribo Terena e do município de Santa Isabel do Rio Negro, este que apresenta um grande número de descendentes de ameríndios residindo em sua área urbana, foram genotipados.

1.2 Objetivos específicos

1. Identificar os polimorfismos presentes na região controle do DNA mitocondrial nas amostras populacionais de Santa Isabel do Rio Negro e Terena .
2. Identificar os polimorfismos presentes na porção não recombinante do cromossomo Y na população de Santa Isabel do Rio Negro.
3. Estimar as frequências dos haplogrupos do mtDNA nas populações de Santa Isabel do Rio Negro e Terena.
4. Estimar as frequências dos haplogrupos do cromossomo Y na população de Santa Isabel do Rio Negro em comparação com a população Terena.
5. Comparar os dados do mtDNA das populações estudadas com as de populações ancestrais e outras populações urbanas brasileiras.
6. Comparar os dados do mtDNA com outras populações ameríndias.
7. Comparar os dados do cromossomo Y com os de outras populações consideradas neste trabalho como ancestrais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras biológicas

As amostras populacionais utilizadas no presente estudo consistiam de indivíduos da comunidade Terena, localizada no Mato Grosso do Sul, região centro-oeste do Brasil e do município de Santa Isabel do Rio Negro, localizado na Amazônia, região norte do Brasil. Os números totais e por sexo de indivíduos em cada amostra populacional são apresentados na tabela 1. Através de termo de consentimento livre e esclarecido, foi obtida autorização para a utilização de amostras biológicas, de forma não identificada, para a realização de estudos científicos. Em relação aos Terena, a autorização para a coleta de amostra biológica foi concedida pela Coordenação Geral de Estudos e Pesquisa (CGEP) do Funai, sob o código 016/CGEP/99.

As amostras biológicas dos Terena foram coletadas, em 1999, nas reservas do Buriti, Córrego do meio e Água Azul, que estão localizadas nos municípios de Sidrolândia e Dois irmãos do Buriti, no estado do Mato Grosso do Sul, sob responsabilidade do Dr. José Ivan Aguiar. As amostras biológicas foram aprovadas para fins de pesquisa pelos comitês de ética da universidade Federal do Mato Grosso do Sul (CI nº015/98), e da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CAAE-0067.0.228.000-09). Para ter ingresso em área indígena é preciso ter autorização da FUNAI.

Em relação população de Santa Isabel do Rio Negro, as amostras foram coletadas, em 2010, sob a responsabilidade do Dr. Felipe Aníbal Carvalho Costa, pesquisador da FIOCRUZ, com base em um termo de concordância para realização de pesquisa científica na população urbana de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, assinado pelas lideranças locais (CNS 196/96).

Tabela 1- Número de amostras analisados por sexo e por região.

Sexo	POPULAÇÃO	
	Terena	Santa Isabel
Masculino	51	49
Feminino	-	51
Total	51	100

Uma vez que não havia sido informada a ocorrência, ou não, de relações de parentesco entre os indivíduos amostrados, com a finalidade de excluir das amostras populacionais indivíduos geneticamente relacionados por linhagens paternas e ou maternas, e, dessa forma, evitar uma superestimação dos haplogrupos nas populações em estudo, apenas indivíduos que não compartilhavam haplótipos quer sejam do mtDNA ou do cromossomo Y foram considerados. A ocorrência de haplótipos múltiplos é normal em qualquer população, porém os dados de autossomos demonstraram uma alta chance de alguns indivíduos serem relacionados em 1° ou 2° grau. Com isso, de uma amostra inicial de 100 indivíduos de Santa Isabel do Rio Negro, conseguiu-se assegurar que 76 não eram relacionados por herança materna, os quais constituíram a amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro avaliada quanto aos haplogrupos do mtDNA. De maneira semelhante, dos 51 indivíduos da amostragem inicial dos Terena, 46 tiveram seus haplogrupos do mtDNA considerados nesse estudo.

Em relação às linhagens paternas, a análise de *loci* STR do cromossomo Y, mostrou a ocorrência na amostra inicial de 49 indivíduos do sexo masculino de Santa Isabel do Rio Negro, de 30 haplótipos distintos, que caracterizavam grupos de indivíduos não relacionados por herança paterna. De cada um dos 30 diferentes haplótipos, um indivíduo foi selecionado aleatoriamente para a determinação dos haplogrupos. Quanto aos Terena, nenhum indivíduo foi excluído no tocante a definição de haplogrupos do cromossomo Y uma vez que apenas haplótipos únicos foram verificados na amostragem.

2.2 Extração de DNA

Foram coletados sangue periférico, utilizando-se de um sistema de punção venosa com tubo a vácuo (*Vacutainer*), contendo EDTA como anticoagulante e mantidas a -4° C.

A etapa da extração também foi realizada pelos grupos de pesquisa mencionados anteriormente no item 2.1. Todas as amostras tiveram seu DNA extraído a partir da fração de hemácias, segundo um procedimento do tipo *Salting-out* modificado por Miller *et al.*, 1988. Alíquotas de DNA das amostras de Santa Isabel do Rio Negro e Terena foram armazenadas em nosso laboratório a -4°C.

2.3 Determinação da concentração de DNA

A concentração do DNA foi realizada em nosso laboratório e determinada por espectrofotometria. O equipamento utilizado para a leitura foi o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), que utiliza um sistema de retenção e medição do volume da amostra diretamente em um pedestal ótico com um espectro de 190 a 840nm.

2.4 Metodologia utilizada para análise do mtDNA

Para amplificação do DNA através da técnica da PCR, foi utilizado *QIAGEN® Multiplex PCR kit*. Os elementos que compõem este *kit* estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Composição do QIAGEN® Multiplex PCR kit

QIAGEN® Multiplex PCR kit	
2x QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix	HotStarTaq DNA Polymerase
Q-Solution	QIAGEN® Multiplex PCR Buffer
Água RNase-free	dNTP Mix

2.4.1 Amplificação da Região Controle do DNA mitocondrial.

Alíquota contendo 2 ng (1,0µl) de DNA total era transferida para tubo estéril apropriado para a reação de PCR. A mistura de reação era completada pela adição de 7,5µl do kit da *Quiagen* (2x), 1,5µl de cada iniciador (2 µM) e 3,5µl de H₂O deionizada.

O par de iniciadores da reação em cadeia da polimerase (PCR) é mostrado na tabela 3 (Brandstätter *et al.*, 2006). O termociclador utilizado foi *GeneAmp* 2400 da Applied Biosystems. As condições nas quais as reações de amplificação eram procedidas são mostradas na Tabela 4

Tabela 3- Iniciadores utilizados na amplificação da região controle do mtDNA

	RC-mtDNA
Iniciador (5'- 3')	Sequência dos iniciadores
F-15997	CACCATTAGCACCCAAAGCT
R-649	TTTGTTTATGGGGTGATGTGA

Tabela 4 Condições de PCR para a amplificação da região controle

	Temperatura	Duração	Descrição
	95° C	15min	Incubação inicial
35 ciclos {	94° C	30seg	Desnaturação
	58° C	90seg	Anelamento
	72° C	90seg	Extensão
	72° C	10min	Extensão final
	4° C	+ ∞	Etapa final

Os produtos de amplificação por PCR da região controle do mtDNA eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, com tensão média de 110V, por 30 minutos, e, após, corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 15 minutos, eram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Para o registro da

imagem, era utilizado o leitor de fluorescência FMBIO II (Hitachi, Co).

2.4.2 Purificação do produto amplificado da PCR pelo complexo *ExoSAP-IT*

Para evitar que reagentes, como iniciadores e dNTPs, que não foram utilizados na PCR interferissem nas reações seguintes, os produtos amplificados eram purificados através da ação de duas enzimas- Exonuclease I (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), ambas disponíveis em conjunto em *ExoSAP-IT®* (usb®) (Onofri *et al.*, 2006; Brion *et al.*, 2005). A enzima Exo I degrada os iniciadores e DNA de cadeia simples enquanto a SAP desfosforila os dNTPs em solução.

Após reação de PCR, 2,0 µl de *ExoSAP-IT®* (volume sugerido pelo fabricante) eram adicionadas a 5 µl do produto amplificado, sendo a mistura incubada a 37°C por 15 minutos, seguindo-se de uma nova incubação por 15 minutos, a 85°C, para promover a inativação das enzimas de acordo com as indicações do fabricante. As incubações eram realizadas no termociclador *GeneAmp* 2400 da Applied Biosystems.

2.4.3 Sequenciamento da região controle do mtDNA

Após a etapa de purificação, o produto de amplificação era sequenciado através do método cíclico de terminação de cadeia. Nesse sistema, o mesmo par de iniciadores usados na reação de PCR, são desta vez utilizados individualmente com o intuito de dirigir a síntese de uma nova fita. Os dideoxirribonucleotídeos (ddNTPs) utilizados para a terminação da reação de polimerização eram marcados com distintos corantes fluorescentes (Tabela 5).

Tabela 5- Fluoróforos utilizados para reação de sequenciamento do mtDNA e indicação da cor atribuída a sua análise. Cada um dos ddNTPs marcados com fluoróforos.

Ddntp	Fluorocromo	Cor dos dados analisados
A	JOE	Verde
T	ROX	Vermelho
C	6-FAM	Azul
G	NED	Amarelo*

*Para melhor visualização, nos eletroferogramas a sua cor é preta.

Nesta etapa foi utilizado o *kit* comercial *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0*, (*Applied Biosystems*, Co). A mistura da reação era realizada em microtubos, sendo composta por- 2,5µL do produto de amplificação purificado, 0,5 µL do iniciador a 2 µM e 2 µL da solução de reação (kit 1-1) em um volume final de 5µL.

Como anteriormente citado, para reação de sequenciamento era utilizado o mesmo par de iniciadores da PCR, mas em casos onde apareceram sítios poliC eram adicionados iniciadores internos na reação, conforme mostrados na tabela 6. As reações de sequenciamento eram procedidas nos termocicladores 9600 e 2400 (*Applied Biosystems*), nas condições descritas na tabela 7.

Tabela 6- Iniciadores na reação de sequenciamento da Região controle do mtDNA

RC-mtDNA- Iniciadores(5'""- 3')	
<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
15997-CACCATTAGCACCCAAAGCT	649-TTTGTTTATGGGGTGATGTGA
16555-CCCACACGTTCCCCTTAAAT	017-CCCGTGAGTGGTTAATAGGGT

Tabela 7- Programa para a reação de sequenciamento do mtDNA através de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.0 kit*

	Temperatura	Duração	Descrição
	96° C	2min	Incubação inicial
35 ciclos	96° C	15seg	Desnaturação
	56° C	9seg	Anelamento
	58° C	2min	Extensão
	60° C	10min	Extensão final
	4° C	+ ∞	Etapa final

2.4.4 Purificação dos produtos da reação de sequenciamento em resina *Sephadex G-50*

Após a reação, o produto de sequenciamento era purificado em resina *Sephadex G-50*. Esse método é baseado na separação das moléculas de ácidos nucleicos de tamanhos diferentes por exclusão em resina de *Sephadex* (Sambrook *et al*, 1989).

Para o preparo da resina, 750 µL de solução contendo 10g de *Sephadex* em 150 mL de H₂O eram aplicados em uma coluna de purificação própria. Esta era colocada dentro de um tubo de 1,5 mL e centrifugada a 5.000 x g, por 1 minuto e 30 segundos (Centrifuga Centrimicro 242 - FANEM). O filtrado era descartado e a coluna, após a centrifugação nas mesmas condições, era então transferida para um novo tubo de 1,5 mL, sendo a ela adicionado o volume total da reação de sequenciamento, seguindo-se de nova centrifugação a 5.000 x g, por 3 minutos.

2.5- Eletroforese capilar

A separação dos produtos da PCR era realizada através da eletroforese capilar no sequenciador automático ABI Prism 3500 Genetic Analyser Instrument (Applied Biosystems).

2.5.1- Preparação das amostras

Ao filtrado, após a purificação em resina *Sephadex G-50*, eram adicionados 12 µL de formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems). Da mistura, 12 µL eram aplicados em um poço da placa do sequenciador, que era centrifugada a 1000 x g, por 1 minuto (*Laboratory Centrifuge 2-16P* Sigma). Em seguida, a placa contendo as amostras era desnaturada por 5 minutos a 95°C e posteriormente mantida em banho de gelo por 5 minutos ou até o início da eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3500* (*Applied Biosystems*), com a utilização do polímero POP-7TM (*Applied Biosystems, Co*) e de capilares de 50cm.

2.5.2 – Eletroforese capilar e detecção

Para eletroforese capilar foi utilizado o capilar *Avant Capillary Array 50 cm* (*Applied Biosystems*) preenchido com o polímero POP-7TM (*Performance Optimized Polymer*) (*Applied Biosystems*). Os dideoxirribonucleotídeos são marcados com diferentes fluoróforos que, quando excitado por uma fonte de alta energia, emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda. O resultado obtido é representado por um eletroferograma onde são observados picos resultantes do processo de emissão. Detecção e transformação do sinal luminoso, que são visualizados em unidades relativas de fluorescência (RFU).

2.5.3 - Análise das sequências e determinação dos haplogrupos

Após a eletroforese capilar, as sequências geradas, eram visualizadas por meio do software *Sequencing Analysis 3.7* (Applied Biosystems). A análise das sequências e a determinação dos polimorfismos eram realizadas com o auxílio do software *SeqScape®Software* - versão 2.5 (Applied Biosystems), que promove o alinhamento e a comparação entre as sequências geradas e a Sequência de Referência de Cambridge (rCRS) (Anderson *et al.*, 1981).

Os haplogrupos foram determinados com a utilização dos recursos de bioinformática online e gratuitos mtDNAManager (mtmanager.yonsei.ac.kr/), e as sequências foram re-classificadas dentro dos haplogrupos através do software *Haplogrep* (Kloss-Brandstätter *et al.*, 2011). O mtDNAManager analisa as sequências de DNA mitocondrial quanto aos polimorfismos das regiões hipervariáveis, estimando o haplogrupo mais provável em consideração ao conjunto de polimorfismos da sequência (Lee *et al.*, 2008), enquanto o HaploGrep encontra o haplogrupo correspondente aos perfis de DNA mitocondrial baseando-se na árvore de classificação deste genoma (PhyloTree). Qualquer região do genoma mitocondrial pode ser usada para classificação do haplogrupo, este que se baseia na estabilidade filogenética de polimorfismos do DNA mitocondrial.

HaploGrep gera uma visualização dos resultados e fornece recomendações de quais polimorfismos deveriam ser analisados adicionalmente para se obter um resultado mais preciso. O *PhyloTree* fornece uma árvore filogenética que pode ser atualizada pelo menos a cada seis meses, a menos que nenhum dado novo apareça. Para este trabalho foi usada a versão mais atualizada da árvore filogenética do DNA mitocondrial (PhyloTree 2012).

2.5.4 Análises Estatísticas

As frequências dos haplogrupos na amostra da população de Santa Isabel do Rio Negro e Terena foram estimadas através de contagem direta. O programa Arlequin versão 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005) foi usado para calcular as distâncias

genéticas entre pares de populações (F_{st}) e a análise de variância molecular (AMOVA).

2.5.5 Análise de distâncias genéticas utilizando haplogrupos do DNA mitocondrial

Com o propósito de avaliar os níveis de diferenciação genética entre diversas populações brasileiras e mundiais, as frequências dos haplogrupos do DNAm_t verificados em Santa Isabel do Rio Negro e Terena foram comparados com aqueles de populações- de Alagoas - AL (Nordeste) (Barbosa *et al.*, 2008), Pará - PA (Norte) (Feio-Dos-Santos *et al.*, 2006), Rio Grande do Sul – RS (Marrero *et al.*, 2005) e Santa Catarina - SC (Palencia *et al.*, 2010) (Sul), São Paulo - SP (Paneto *et al.*, 2011) e Rio de Janeiro-RJ (Santos, 2012) (Sudeste), Angola (AN) (Plaza *et al.*, 2004); Portugal (PT) (Pereira *et al.*, 2000); China (CH) (Yao *et al.*, 2002). As populações ameríndias estão representadas por Guarani (GA), Kaingang (KA), Wai Wai (WA), Ticuna (TI), Ache (AC), Ayore (AY), Gavião (GA), Xavante (XA), Zoró (ZO), Quechua (QE) (Bisso-Machado *et al.*, 2012). Essas populações ameríndias também foram utilizadas nos cálculos de AMOVA.

As comparações foram realizadas através de medidas de distância genética (F_{ST}), parâmetro calculado a partir das frequências dos haplogrupos verificadas nas populações. A matriz de F_{ST} foi construída por meio do *software* Arlequin versão 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). Na comparação com populações urbanas brasileiras, foram observados os haplogrupos- L0, L1, L2, L3, L4, A, B, C, D, H, K, N, U, M. Os haplogrupos não verificados em todas as populações foram agrupados em uma categoria nomeada O (outros) para a construção da matriz de distância genética.

Para a comparação com populações ameríndias foram considerados apenas os haplogrupos A, B, C e D, sendo os outros eventualmente verificados em uma dada população designado, neste trabalho, de haplogrupo "O".

Com a finalidade de representar graficamente as afinidades genéticas entre as populações comparadas, a análise do escalonamento multidimensional (MDS) das distâncias genéticas (F_{ST}) entre as diversas populações e o cálculo do valor de stress, foram realizadas, através do programa STATISTICA, versão 8.0 (StatSoft, 2007; www.statsoft.com).

2.6 Metodologia utilizada no estudo do Cromossomo Y

2.6.1 Marcadores do tipo microssatélites do cromossomo Y (Y-STR)

Neste trabalho, apenas o componente do sexo masculino da amostra de Santa Isabel do Rio Negro foi analisada quanto à haplótipos do cromossomo Y, uma vez que a genotipagem dos Terena nos mesmos marcadores STRs já havia sido realizada, em nosso laboratório (Silva, comunicação Pessoal). Conforme anteriormente exposto, visando identificar a ocorrência na amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro de indivíduos aparentados por herança paterna e assim definir linhagens masculinas únicas através da caracterização dos haplótipos únicos no cromossomo Y, os 49 homens foram genotipados nos 17 marcadores do tipo STR que formam o sistema de amplificação AmpF/STR® Y-Filer™ (Applied Biosystems, Co). Portanto, para a análise inicial foram considerados 17 marcadores microssatélite- DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS456, DYS19, DYS385I, DYS385II, DYS458, DYS391, DYS392, DYS393, DYS439, DYS635, DYS437, DYS438, DYS448 e GATA_H4.1.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 6,25 µL contendo 0,2 µL (1 unidade) de AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), 2,3 µL de mix da reação de PCR (AmpF/STRs Yfiler kit), 1,25 µL de primers (AmpF/STRs Yfiler kit *primer set*) e 1 µL de DNA (2ng/µL). As amostras foram amplificadas em termocicladores PCR system 9700 (Applied Biosystems). As condições da PCR estão descritas na tabela 8.

Tabela 8- Condições de PCR para a amplificação dos 17 marcadores Y-STRs

	Temperatura	Duração	Descrição
	95° C	10min	Incubação inicial
30 ciclos	94° C	1min	Desnaturação
	61° C	1 min	Anelamento
	72° C	1min	Extensão
	60° C	80min	Extensão final
	4° C	+ ∞	Etapa final

Os produtos de amplificação ou *amplicons* eram separados por eletroforese capilar no seqüenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) e analisados através do programa GeneMapper ® Software v3.2. As designações dos alelos foram baseadas na comparação com escalas alélicas padronizadas pelo fabricante (Figura 32).

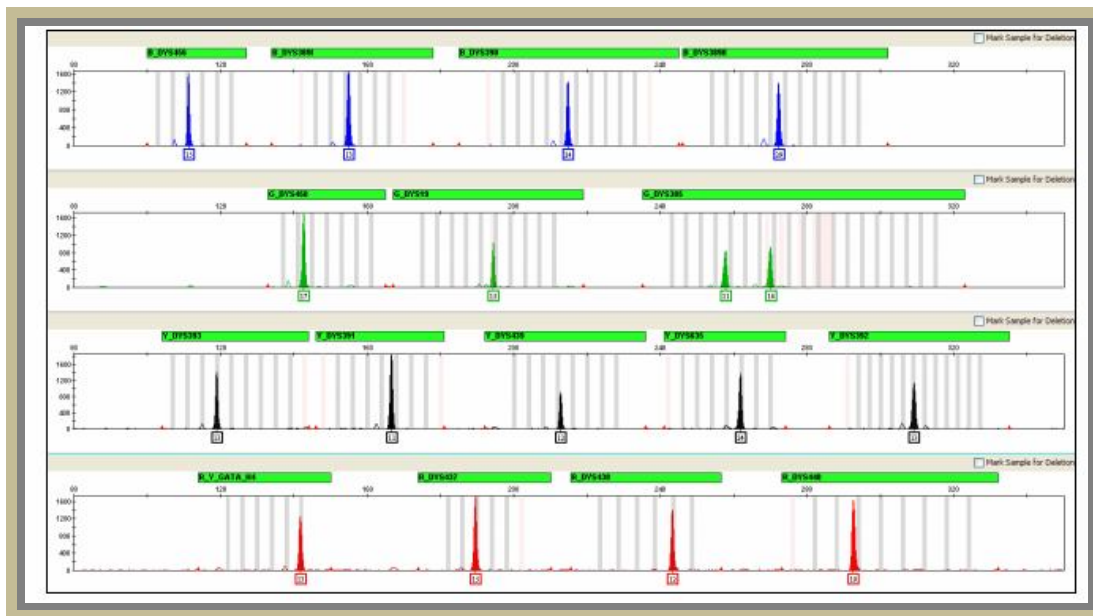


Figura 32 - Representação gráfica (eletroferograma) do resultado da eletroforese capilar dos produtos de amplificação (1ng de DNA controle - 007) com o kit comercial AmpF/STR® Y-Filter™ e analisado no sequenciador automático ABI 3130 amostra controle (DNA 007) (Applied Biosystems, Co).

Picos azuis- *loci* marcados pelo fluoróforo 6-FAM; Picos verdes- *loci* marcados pelo fluoróforo VIC; Picos pretos- *loci* marcados pelo fluoróforo NED; Picos vermelhos- *loci* marcados pelo fluoróforo PET.

2.6.2 Análise de Y-SNPs

A amplificação por PCR da região alvo foi realizada com o Kit de amplificação da Qiagen® Multiplex Kit. Cinco SNPs do clado Q (Blanco-Verea *et al.*, 2006) definidos pelas mutações M242, M3, M19, M194 e M199, reunidos em um *multiplex* (*Multiplex Q*) foram utilizados para caracterizar o principal haplogrupo ameríndio, o Q1a3a* (Blanco-Verea *et al.*, 2010).

2.6.2.1 Reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação dos Y-SNPs

Uma alíquota contendo 2 ng de DNA total era transferida para tubo estéril apropriado para a reação de PCR. A mistura de reação era completada pela adição de 2,5µl do kit da Quiagen (2x), 1,0µl de cada iniciador (2 µM) e 0,5 µl de H₂O deionizada.

As sequências dos pares de iniciadores são mostradas na tabela 9 ((Blanco-Verea *et al.*, 2010). O termociclador utilizado foi o *GeneAmp® PCR System 2400* da *Applied Biosystems* com programa de PCR apresentado na Tabela 10.

Os produtos de amplificação do *multiplex* eram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida a 12%, com tensão média de 110V, por 40 minutos, corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 20 minutos e eram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Para o registro da imagem, era utilizado o leitor de fluorescência FMBIO II (Hitachi, Co).

Após reação de PCR, 0,5 µl de *ExoSAP-IT®* foram adicionados a 1 µl de produto amplificado, e posteriormente colocados no termociclador *GeneAmp® PCR System 2400* da *Applied Biosystems*.

Tabela 9- Iniciadores utilizados na amplificação de Y-SNPs, distribuídos no multiplex

SNP	Primer (5'-3')		Amplicon(pb)
	forward	reverse	
M242	atagaaagttgtgcaaaaaggtga	accttacctagaacaactctgaagc	137
M3	ctgccagggctttcaaatag	aaggcatcttcatttaggt	93
M19	ctggtcataaactggaaatc	agctgaccacaaactgatgtaga	170
M194	gcctggatgaggaagtgag	atacagtcgttgccctctcg	127
M199	cctggttgattctggtctt	tgattcaaggatttgtagtctt	197

Tabela 10- Condições de PCR para a amplificação dos multiplexes

	Temperatura	Duração	Descrição
	95° C	10min	Incubação inicial
	94° C	30seg	Desnaturação
35 ciclos	58° C	1 min e 30 seg	Anelamento
	72° C	1min e 30 seg	Extensão
	72° C	10min	Extensão final
	4° C	+ ∞	Etapa final

2.6.2.2 Reação de minisequenciamento por SNaPshot

A genotipagem de Y-SNPs, por minisequenciamento pela SBE (*single base extension*), foi realizada com o kit *SNaPshotTM Multiplex* (Applied Biosystems, Co) (Applied Biosystems, 2001).

O princípio dessa metodologia consiste na extensão com dideoxirribonucleotídeo, por uma DNA polimerase, de uma única base complementar ao local polimórfico (Sanchez *et al.*, 2003), os iniciadores são desenhados para emparelhar com a sequência adjacente ao local do SNP. Uma vez posicionado com a sua extremidade 3' a um par de base a montante do polimorfismo relevante (local do Y-SNP), ao iniciador emparelhado não marcado é adicionado pela incorporação

de um único ddNTP complementar ao SNP alvo (Figura 33). Os quatro ddNTPs apresentam-se marcados com um distintos fluoróforos que face à emissão de diferente comprimento de onda são traduzidos em 4 cores, uma específica para cada base (Mengel-Jorgensen *et al.*, 2004). Deste modo, são gerados fragmentos de mesmo comprimento, que, diferindo apenas quanto ao espectro de emissão de fluoróforo associado ao único ddNTP incorporado, permitirá a fidedigna identificação do SNP alvo.

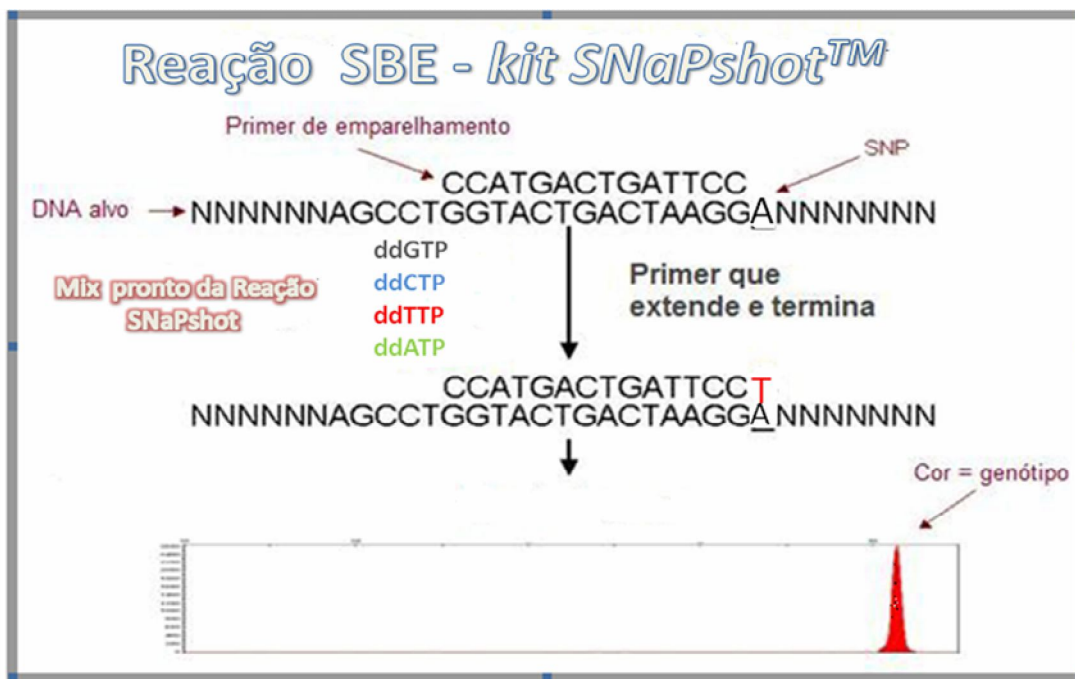


Figura 33- Esquema geral do processo de minisequenciamento por aplicação do SNaPshot™ Multiplex kit (adaptado -www.appliedbiosystems.com).

Para possibilitar a identificação dos Y-SNPs, é necessário que os produtos de extensão difiram entre si nos seus comprimentos, de tal modo que as diferenças de tamanhos sejam detectadas na eletroforese. Uma vez que mobilidade dos oligonucleotídeos por eletroforese capilar é determinada pelos seus tamanhos, composição nucleotídica e fluoróforo associada (Applied Biosystems, 2005), foram produzidos iniciadores com caudas na extremidade 5' (tabela 11), de modo a se gerar moléculas com diferentes tamanhos, prevenindo assim a sobreposição dos marcadores SNPs (Applied Biosystems, 2001).

Este kit da *Applied Biosystems* é composto por *SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix*, em único tubo estão reunidos a enzima *AmpliTaq® DNA Polimerase*, o tampão da reação e os ddNTPs marcados com fluoróforos (Tabela 12) e por dois controles- *SNaPshot Multiplex Control Primer Mix* e *SNaPshot Multiplex Control Template..*

A mistura da reação era composta por 2µl do produto purificado pela ExoSap, 2 µl do *kit SNaPshot*, 0,5 µl do SBE iniciadores (2 µM) , 0,5 µl de H₂O deionizada em um volume final de 5µl.

Tabela 11- SBE iniciadores utilizados na reação de minisequenciamento dos Y-SNPs.

SNP	SBE primer multiplex	Amplicon(pb)
M242	cccccccccccccccccaaaaagggtgaccaagggtgct	39
M3	ccccccccccccgggtcacctctgggactga	31
M19	Caaactattttgtgaagactgttga	27
M194	ccccccccactttaaacatacaggagtggtttt	35
M199	Gaaatgttaaaatggcttacacttg	25

Tabela 12- ddNTPs e respectivos *fluoróforos* da cor atribuída na sua análise

Ddntp	Fluorocromo	Cor dos dados analisados
A	R6G	Verde
T	ROX	Vermelho
C	TAMRA	Amarelo*
G	R110	Azul
size standard	Liz	Laranja

*Para melhor visualização, a sua cor de representação nos eletroferogramas é preto.

A identificação do estado selvagem e mutante são mostradas na tabela 13 e a condição termocíclica para reação de minisequenciamento está descrita na tabela 14.

Tabela 13-Relação dos SNPs do cromossomo Y aplicados neste estudo, indicando sua alteração nucleotídica no caso de mutação e respectiva detecção

SNP	Mutação	Deteccção
M242	C>T	C>T
M3	G>A	C>T
M19	T>A	T>A
M194	T>C	T>C
M199	>Ins G	>Ins G

Tabela 14- Programa de PCR para a minisequenciamento através de SnaPshot kit

	Temperatura	Duração	Descrição
	96° C	10 seg	Desnaturação
25 ciclos	51,5° C	5 seg	Anelamento
	60° C	30 seg	Extensão
	4° C	+ ∞	Etapa final

2.6.2.3 Purificação do produto da reação de minisequenciamento pela enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP).

O produto da reação de minisequenciamento (SBE) é tratado com a enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), que catalisa a remoção dos grupos 5' fosforil dos ddNTPs não incorporados, que tendo o padrão de migração alterado deixam de interferir na reação de minisequenciamento (Nasidze *et al.*, 2004).

Após reação de minisequenciamento, 1 unidade (1µl) de SAP (Roche®) era adicionado ao produto de SBE e, a seguir, a preparação era incubada a 37°C, por 1 hora, e, em seguida, a 85°C, por 15 minutos, no termociclador *GeneAmp® PCR System 2700* da *Applied Biosystem*, para a inativação da enzima

2.6.2.4 Eletroforese capilar e detecção dos produtos SBE

O preparo da amostra para eletroforese foi feito pela adição de 1 µl do produto de minisequenciamento purificado a uma solução contendo 24 µl de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Co) e 0,25 µl de padrão interno *GeneScan*® 120 LIZ (*Applied Biosystems, Co*).

A eletroforese e a detecção dos produtos de minisequenciamento purificados foram realizados em Analisador Genético ABI 310 (*Applied Biosystems, Co*), sendo utilizado capilar de 47 cm, polímero POP-6 e o módulo de corrida "GS STR POP6(1ml) E5.md5", tempo de injeção de 5 segundos. O tempo da eletroforese foi de 60 minutos, corrente elétrica mantida em 15V.

A análise dos eletroferogramas foi realizada com o software *GeneMapper v. 3.2 Applied Biosystems Co*).

2.6.2.5 Caracterização do haplogrupo e análises estatísticas

Depois de identificado o Y-SNP. A frequência do haplogrupo Q1a3a foi estimada por contagem direta.

O haplogrupo Q1a3a foi nomeado utilizando-se o sistema de terminologias do Y-Chromosome Consortium (YCC, 2002), atualizado por Karafet e colaboradores (2008).

As análises de escalonamento multidimensional (MDS) foram realizadas com base nas distâncias genéticas obtidas usando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, 2007; www.statsoft.com).

Para realizar o estudo da distância genética foi utilizado como comparação os dados disponíveis na literatura das seguintes populações-

- PT-Portugal (Gusmão *et al.*, 2002);
- ES- Espanha (Martín *et al.*, 2004);
- GU-Guiné-Equatorial (Arroyo-Pardo *et al.*, 2005);
- TE-Terena (Dayse Aparecida da Silva e colaboradores, paper em preparação);

3 RESULTADOS

3.1 Polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial

3.1.1 Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose a 2%

Com objetivo de identificar polimorfismos do tipo SNP da região controle do DNA mitocondrial, localizados entre as posições 16024-16569 e 1-573, estas regiões, foram amplificadas por PCR e sequenciadas, conforme descrito em material e métodos (itens 2.4.1; 2.4.2).

Na figura 34 são mostrados os resultados da amplificação da região controle do mtDNA pela PCR, na qual gerou fragmentos de 1122 pares de bases (pb) visualizados em gel de agarose, a 2%, corado com brometo de etídeo,.

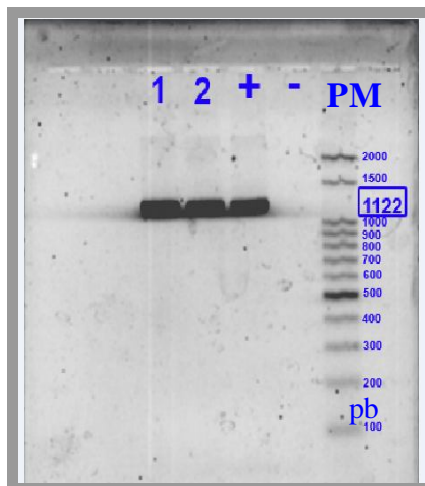


Figura 34- Produtos de amplificação por PCR da região controle do DNA mitocondrial.

Alíquotas contendo 2ng de DNA foram amplificadas com os pares de iniciadores F15997 e R649 da região controle do mtDNA. Após a eletroforese em gel de agarose 2%, os produtos de amplificação foram corados com brometo de etídeo e detectados através do escaneamento do gel no leitor de fluorescência FMBIO II. Amostra 1 e 2- produtos de amplificação da região controle de indivíduos da amostra populacional Terena; Amostra +- controle positivo (DNA K562) da reação de PCR; Amostra — controle negativo da reação de PCR; PM- Padrão de peso molecular.

3.1.2 Sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial

Eletroferograma do sequenciamento (sequência *Forward*) da região controle do mtDNA do código "T121" da população Terena é mostrado na figura 35.

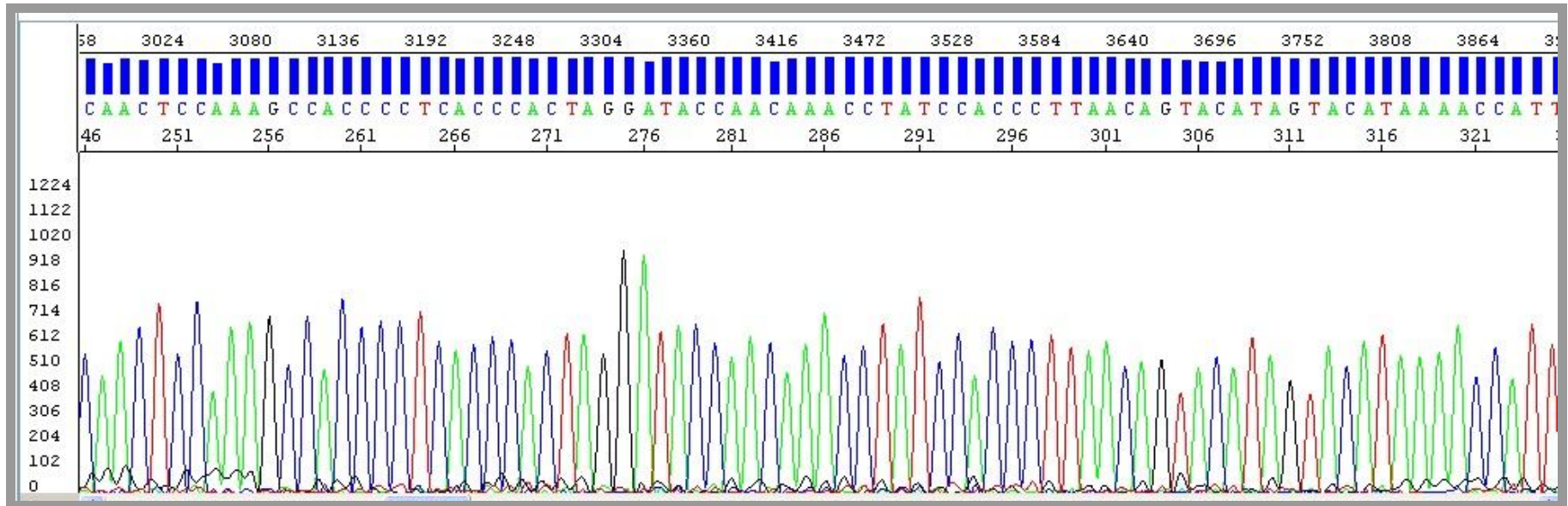


Figura 35 - Eletroferograma representativo da seqüência *Forward* da região controle do DNA mitocondrial (orientação 5'-3') de um indivíduo da população Terena.

Após a purificação dos produtos de PCR da região controle do mtDNA foram realizadas reações individuais de sequenciamento para produtos gerados por cada iniciador. Para esta etapa além dos iniciadores F15997 - R649 foram utilizados também os iniciadores F16555- R017. A seqüência de bases foi determinada em leitores de fluorescência ABI3500 durante eletroforese capilar e visualizada com o software Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems). **Legenda**- T = Timina; A = Adenina; G = Guanina; C= Citosina.

3.1.3 População Terena

Um total de 46 diferentes *loci* polimórficos foi verificado na região controle do DNA mitocondrial. Os polimorfismos que caracterizam os diferentes haplótipos e a classificação em haplogrupos são mostrados na tabela 15.

Tabela 15- Polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial e os seus respectivos haplogrupos, verificados na população indígena Terena, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Amostra	Polimorfismos presentes na região controle																		Haplogrupo				
T121	16111T	16209C	16223T	16290T	16319A	73G	146C	153G	235G	238G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D					A2			
T166	16111T	16223T	16274A	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D					A2			
T6	16111T	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	64T	73G	146C	153G	235G	238G	263G	523D	524D					A2			
T43	16111T	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	146C	153G	235G	238G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D					A2			
T59	16111T	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	16390 ^a	64T	73G	146C	153G	235G	238G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D			A2		
T72	16111T	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	16390 ^a	64T	73G	146C	153G	235G	238G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D			A2		
T215	16111T	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	16390 ^a	64T	73G	146C	153G	235G	238G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D			A2		
T116	16111T	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	64T	73G	146C	153G	235G	238G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D					A2	
T172	16111T	16209C	16223T	64T	73G	146C	153G	235G	238G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D									A2
T198	16111T	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	73G	146C	153G	235G	238G	263G	310.1C	315.1C	64T	523D	524D						A2
T250	16209C	16223T	16290T	16301T	16319A	64T	73G	146C	153G	235G	238G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D							A2
T50	16111T	16208C	16223T	16301T	16290T	16319A	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D								A2
T57	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D								A2
T66	16111T	16164G	16223T	16266T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	499A	523D	524D					A2
T96	16037G	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D							A2
T110	16111T	16126C	16223T	16274A	16290T	16319A	16362C	61T	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D					A2
T128	16111T	16164G	16223T	16266T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	499A	523D	524D					A2
T138	16111T	16218T	16223T	16249C	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D						A2
T198	16111T	16218T	16223T	16249C	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D						A2
T150	16111T	16164G	16223T	16266T	16290T	16319A	16362C	16437C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	499A	523D	524D				A2
T223	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	73G	146C	153G	235G	263G	523D												A2
T146	16182C	16183C	16189C	16217C	16274A	16344T	73G	499A															B4b
T10	16033T	16037G	16182C	16183C	16189C	16217C	73G	263G	309.3C	315.1C	499A												B4b
T222	16182C	16183C	16189C	16217C	73G	152C	263G	309.1C	499A														B2c
T7	16182C	16183C	16189C	16217C	16274A	73G	263G	309.2C	499A														B2c
T85	16051G	16182C	16183C	16189C	16217C	73G	152C	263G	309.1C	315.1C	499A	523D	524D										B2c
T89	16182C	16183C	16189C	73G	263G	499A																	B2c
T113	16182C	16183C	16189C	16217C	73G	263G	315.1C	499A															B2c
T143	16182C	16183C	16189C	16194G	73G	263G	499A																B2c
T203	16051G	16182C	16183C	16189C	16217C	73G	152C	499A	523D	524D													B4b
T246	16182C	16183C	16189C	16217C	73G	146C	151T	499A															B2c
T9	16180C	16182C	16183C	16189C	16217C	16274A	16519C	309.2C	315.1C	499A													B4b
T135	16180C	16182C	16183C	16189C	16217C	16274A	16519C	309.2C	315.1C	499A	523D	524D											B4b
T118	16037G	16051G	16183C	16189C	16217C	16360T	73G	152C	263G	309.2C	499A	523D	524D										B4b
T80	16051G	16183C	16189C	73G	152C	263G	309.2C	315.1C	499 ^a	523D	524D												B4b
T103	16093C	16183C	16189C	73G	152C	204C	247A	263G	309.2C	315.1C	499A												B4b
T234	16183C	16189C	16217C	73G	152T	263G	499A	523D	524D														B4b
T216	16223T	16233G	16298C	16311C	16325C	16327T	73G	249D	263G	290D	291D	309.1C	315.1C	408A	489C	523D	524D						C1
T190	16037G	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	64T	73G	194T	249D	263G	290D	291D	309.1C	315.1C	489C	523D	524D				C1d
T62	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	64T	73G	194T	249D	263G	290D	291D	309.2C	315.1C	489C	523D	524D					C1d
T139	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	64T	73G	194T	249D	263G	290D	291D	309.2C	315.1C	489C	523D	524D					C1d
T161	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	64T	73G	194T	249D	263G	290D	291D	309.2C	315.1C	489C	523D	524D					C1d

T255	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	64T	73G	194T	249D	263G	290D	291D	309.1C	315.1C	489C	523D	524D	C1d	
T262	16223T	16298C	16362C	489C	523D	524D													D4t	
T171	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	73G	263G	315.1C	451T	489C	523D	524D						C7	
T217	16223T	16319A	16362C	16512C	16547T	16551C	73G	146C	153G	263G	523D	524D							A2	
T231	16223T	16319A	16362C	16512C	16547T	16551C	523D	524D											D4b1	
T179	16223T	16319A	16362C	73G	263G	499A													D4b1	
T158	16223T	16298C	16314T	16316G	16325C	16327T	16362C	64T	73G	194T	263G	489C	523D	524D					D4b2b	
T112	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	64T	73G	194T	489C	523D	524D							C1d1c	
T48	16093C	16129A	16187T	16189C	16223T	16265C	16278T	16286G	16294T	16311C	16360T	16519C	16527T	73G	151T	152C	182T	186A	189C	L1c2b
													195C	198T	247A	263G	264T	297G	316A	

As amostras em destaque compartilham os mesmos haplótipos. Cabe ressaltar que apenas um exemplar destes foi considerado para análise estatística.

3.1.3.1 Proporção dos haplogrupos do mtDNA na população Terena

Os diferentes haplótipos formados pelos SNPs do mtDNA verificados na amostra Terena foram associados a haplogrupos conforme no item 2.5.3. As proporções dos haplogrupos que caracterizam distintas ancestralidades maternas então ilustradas na figura 36.

Cabe ressaltar, que para evitar indivíduos de mesma ancestralidade materna o que poderia erroneamente elevar a frequência de determinados haplogrupos, os haplótipos do mtDNA que foram observados mais de uma vez na amostra populacional Terena foram retirados do estudo.

Observa-se que na amostra Terena, 45 indivíduos apresentaram haplogrupos associados à ancestralidade materna ameríndia, enquanto apenas um indivíduo com ancestralidade materna africana foi observado.

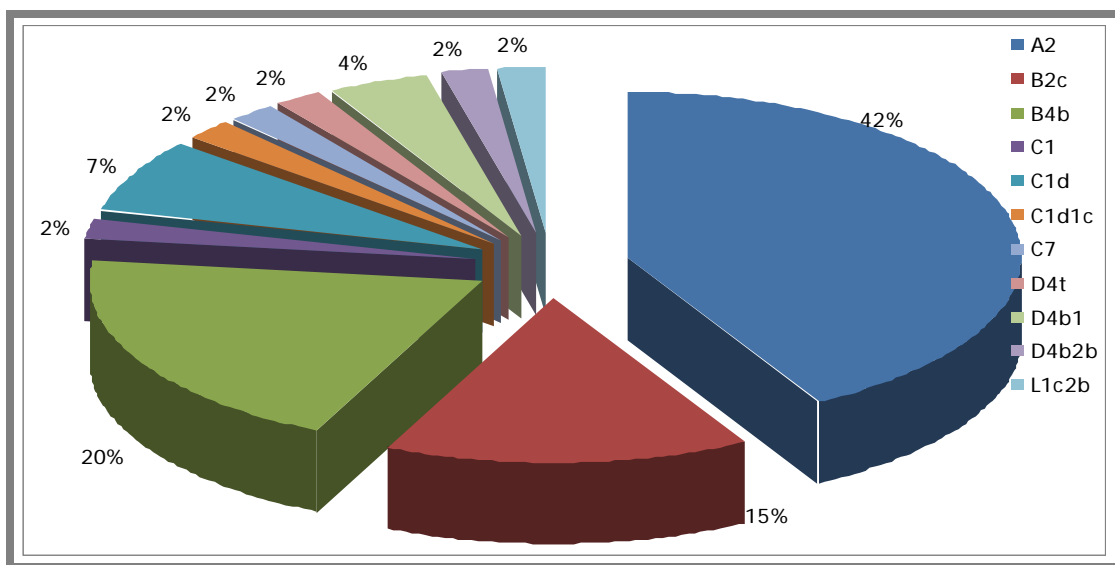


Figura 36-Haplogrupos ameríndios e apenas um haplogrupo africano e suas respectivas frequências determinadas por contagem direta na população Terena.

Os haplogrupos foram determinados com o auxílio do software mtDNAManager (mtmanager.yonsei.ac.kr) e Haplogrep (haplogrep.uibk.ac.at). As frequências dos haplogrupos foram calculadas dividindo-se o número de ocorrência de cada haplogrupo pelo número total de indivíduos (46) da amostra populacional Terena que portavam haplótipos diferentes.

51	16183C	16189C	16194C	16217c	16390A	16519C	73G	263G	309.1C	499A	574C									B4b
52	16142T	16147T	16223T	16325C	16362C	16519C	489C													D1f
53	16114T	16182C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	139C	263G	309.1C	315.1C	499A								B4b
55	16142T	16193T	16223T	16325C	16362C	16398A	16400T	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C	489C							D1f
56	16095T	16111T	16207G	16223T	16290T	16319A	16362C	16519C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D		A2
57	16111T	16192T	16223T	16290T	16319A	16362C	16519C	16545C	64T	73G	146C	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D			A2
58	16111T	16209C	16213A	16223T	16290T	16319A	16325C	16362C	64T	73G	125C	127C	146C	235G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D	A2
59	16150T	16183C	16189C	16217C	16519C	16546C	73G	214G	263G	309.2C	315.1C	499A								B4b
60	16142T	16223T	16325C	16362C	16519C	73G	249D	263G	291D	315.1C	489C	523D	524D							D1f
61	16051G	16172C	16223T	16257T	16298C	16325C	16327T	16519C	73G	249D	263G	290D	291D	309.1C	315.1C	489C	523D	524D		C1
62	16070G	16223T	16325C	16362C	73G	309.1C	315.1C	489C												D1
63	16223T	16325C	16362C	16390A	16519C	73G	94A	109A	146C	263G	309.1C	315.1C	489C							D1e
64	16126C	16142T	16193T	16223T	16325C	16362C	16398A	16400T	16519C	73G	249D	290D	291D	315.1C	489C	493G	523D	524D		C1b
65	16114T	16183C	16193T	16223T	16325C	16362C	16398A	16400T	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C	489C						D1
66	16114T	16182C	16183C	16189C	16217C	16519C	16545C	73G	139C	263G	315.1C	499A								B4b
67	16111T	16223T	16290T	16319A	16356C	16362C	16443C	73G	139C	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D			A2
68	16362C	16482G	146C	239C	263G	309.1C	315.1C													H6
69	16183C	16189C	16217C	16519C	499A	572T														B4b
70	16142T	16223T	16325C	16362C	16519C	73G	152C	195C	263G	315.1C	489C									D1f
71	16051G	16176T	16223T	16294T	16298C	16325C	16327T	16362C	73G	249D	263G	290D	291D	309.1C	315.1C	489C	523D	524D		C1 d
72	16183c	16189C	16217C	16519C	73G	263G	309.2C	315.1C	411G	414G										B4
73	16093C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	315.1C	499A											B4b
74	16092C	16111T	16213A	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D			A2
76	16092C	16111T	16213A	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	523D	524D				A2
75	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C	73G	194T	249D	263G	290D	291D	315.1C	489C	523D	524D				C1c
77	16092C	16111T	16213A	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	193T	235G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D		A2
78	16183C	16189C	16217C	16519C	16545C	73G	263G	309.2C	315.1C	411G	499A									B4c
79	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	151T	153G	211G	235G	263G	315.1C	523D	524D				A2
80	16111T	16242T	16290T	163111C	16319A	16362C	64T	73G	153G	195C	199C	204C	235G	263G	315.1C	523D	524D			A2
81	16111T	16213A	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D				A2

82	16095T	16111T	16207G	16223T	16290T	16319A	16362C	16519C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D				A2
83	16111T	16192T	16223T	16259T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D						A2
85	16111T	16192T	16223T	16259T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D						A2
84	16095T	16111T	16207G	16223T	16290T	16319A	16362C	16519C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D				A2
86	16093C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	315.1C	499A													B4
87	16093C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	315.1C	499A													B4
88	16095T	16111T	16207G	16223T	16290T	16319A	16362C	16519C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D				A2
89	16095T	16111T	16207G	16223T	16290T	16319A	16362C	16519C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523D	524D				A2
90	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	16526A	64T	73G	146C	151T	153G	211G	235G	263G	315.1C	523D	524D					A2
101	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	16526A	64T	73G	146C	151T	153G	211G	235G	263G	315.1C	523D	524D					A2
91	16051G	16182G	16223T	16248T	16298C	16335G	16519C	73G	237G	249D	263G	309.2C	315.1C	489C								C
92	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	309.2C	315.1C	499A													B4b
93	16111T	16213A	16223T	16290T	16319A	16362C	146C	153G	235G	263G	309.2C	315.1C	523D	524D								A2
94	16142T	16223T	16325C	16362C	16519C	152C	263G	315.1C	489C													D1f
95	16111T	16223T	16290T	16293G	16304C	16319A	16362C	64T	73G	146C	152C	153G	189G	207A	235G	263G	315.1C	523D	524D			A2
96	16093C	16183C	16189C	16217C	16519C	499A																B4b
97	16223T	16249C	16298C	16316G	16325C	16327T	73G	146C	249D	263G	290D	291D	315.1C	489C								C1
98	16223T	16249C	16298C	16316G	16325C	16327T	73G	146C	249D	263G	290D	291D	315.1C	489C								C1
99	16093C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C													B4
100	16093C	16183C	16189C	73G	263G	315.1C	499A															B4
102	16223T	16298C	16325C	16327C	16540G	249D	263G	290D	291D	309.1C	315.1C	489C	493G	523D	524D							C1b

As amostras em destaque compartilham os mesmos haplótipos. Cabe ressaltar que apenas um exemplar destes foi considerado para análise estatística.

3.1.4.1 Proporção dos haplogrupos do mtDNA na população de Santa Isabel do Rio Negro

Os diferentes haplótipos formados pelos SNPs do mtDNA verificados na amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro foram associados a haplogrupos, conforme no item 2.5.3. As proporções dos haplogrupos que caracterizam distintas ancestralidades maternas são mostradas na figura 37.

Para amostragem de Santa Isabel do Rio Negro foi também verificado quem tinha a mesma ancestralidade materna através dos haplótipos do mtDNA, após essa investigação o tamanho amostral ficou composto por 76 indivíduos não relacionados por herança materna, em um total de 100.

Na amostra de Santa Isabel do Rio Negro, 75 indivíduos apresentaram haplogrupos associados à ancestralidade materna ameríndia enquanto apenas um indivíduo com ancestralidade materna europeia foi observado. As freqüências dos haplogrupos mitocondriais nas populações de Santa Isabel do Rio Negro e Terena estão destacadas em uma mapa ilustrativo na figura 38.

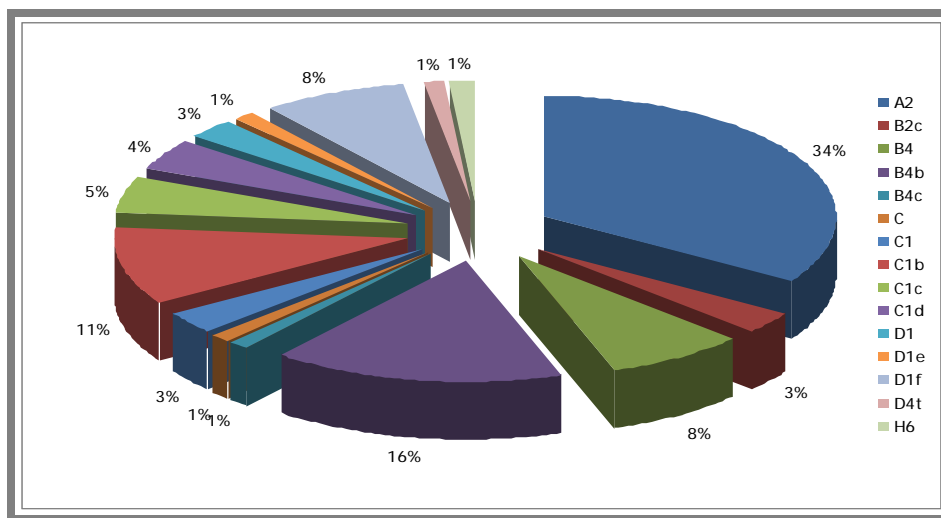


Figura 37-Haplogrupos ameríndios e apenas um haplogrupo europeu e suas respectivas frequências determinadas por contagem direta na população de Santa Isabel do Rio Negro.

Os haplogrupos foram determinados com o auxílio do software mtDNAManager (mtmanager.yonsei.ac.kr) e Haplogrep (haplogrep.uibk.ac.at). As frequências dos haplogrupos foram calculadas dividindo-se o número de ocorrência de cada haplogrupo pelo número total de indivíduos (76) da amostra populacional Santa Isabel do Rio Negro que portavam haplótipos diferentes.

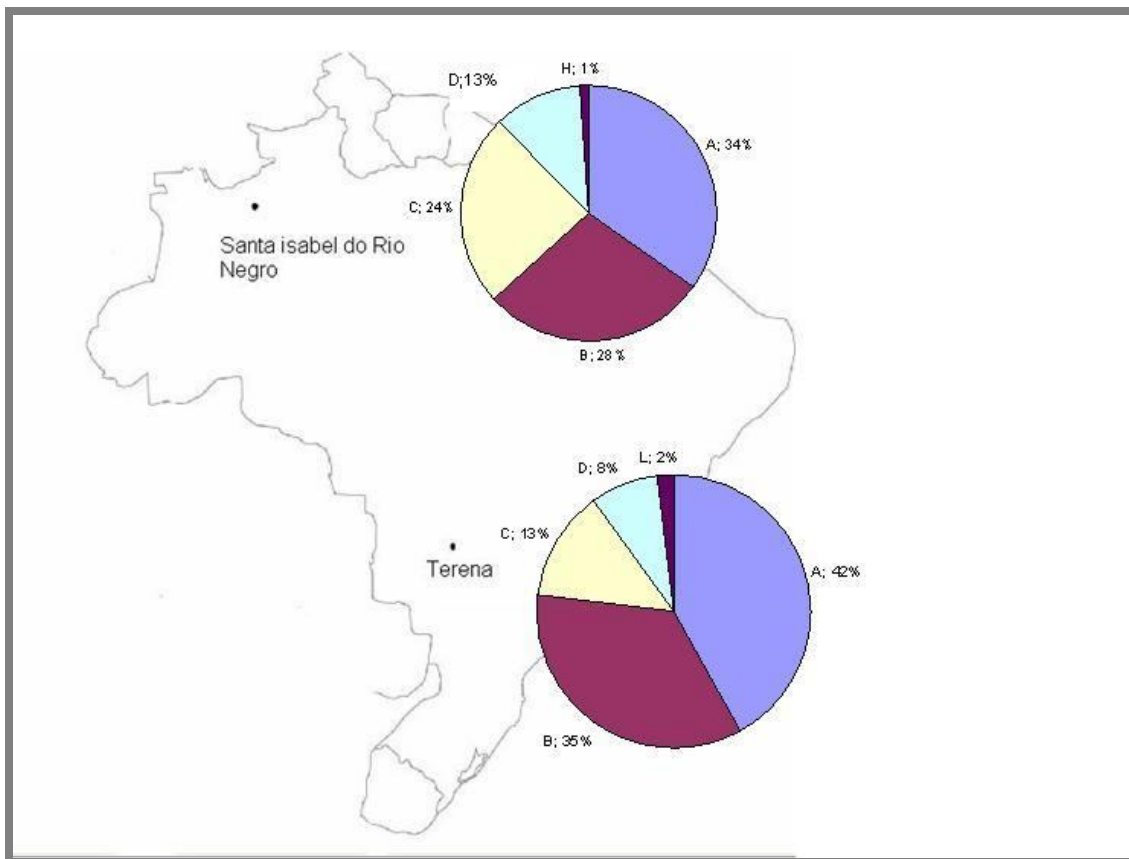


Figura 38- Mapa ilustrativo destacando as frequências dos haplogrupos mitocondriais nas populações de Santa Isabel do Rio Negro e Terena

3.1.5 Análises estatísticas

3.1.5.1 Amova nas amostras populacionais de Santa Isabel do Rio Negro e Terena

A análise da variância molecular (AMOVA) foi calculada com base na distribuição dos haplogrupos do mtDNA, visando examinar o nível de estruturação das populações aqui estudadas. Os resultados estão expressos na tabela 17.

Tabela 17-Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) com base nos haplogrupos do mtDNA entre as populações de Santa Isabel do Rio Negro e Terena

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Interpopulacional	128.386	0.11098	27.64
Intrapopulacional	343.110	0.29010	72.36

O cálculo para análise de variância molecular foi calculado com o auxílio do software Arlequin versão 3.01

3.1.5.2 Distâncias genéticas entre as populações alvo deste estudo e populações urbanas brasileiras e mundiais de interesse.

A análise do índice de fixação F_{st} entre pares de populações mede efeitos da estrutura populacional combinada, podendo ser aplicada na mensuração de distância genética. Portanto, procedemos a uma análise comparativa entre as duas populações alvo desse estudo e entre cada uma delas e populações de diferentes regiões do Brasil, assim como da África, Portugal e China, que juntamente com os Terena são nesse trabalho considerados grupos ancestrais.

Na tabela 18 são apresentados os resultados das análises distâncias genéticas (F_{st}) entre os pares de populações, organizados em forma de matriz. O nível de significância considerado para as medidas das distâncias genéticas foi de 0,05, ao qual foi aplicado a correção de Bonferroni para múltiplas comparações (Abdi, 2007), resultando na aceitação de hipótese nula, ou seja, de não diferenciação genética entre as populações para valores de P maiores que 0,00357.

Para melhor observação da posição relativa das populações no espaço genético em duas dimensões, foi feito o escalonamento multidimensional (MDS) (Figura 39) da matriz de distâncias entre pares de populações. O valor de stress foi estimado em 0,11729, o que sugere uma aproximação adequada entre os resultados do MDS e os dados da matriz de distâncias, conforme valores tabelados propostos por Sturrock & Rocha, 2000. Esta medida de stress é utilizada para mensurar a qualidade do ajuste da análise do MDS, indicando a proporção da variação entre as distâncias genéticas originais presentes na matriz e aquelas computadas pelo MDS (Knoke & Yang, 2008).

Tabela 18- Matriz de distâncias genéticas (F_{ST}) para haplogrupos do DNAmT entre pares de populações. Abaixo da diagonal estão os valores de P e acima estão dispostos os correspondentes valores de F_{ST} .

	SI	TE	AF	PT	CH	AL	PA	RJ	SC	RS	SP
SI		-0.00483	0.25704	0.32505	0.12951	0.09801	0.05194	0.13810	0.15180	0.09979	0.11692
TE	0.52252+- 0.0297		0.26905	0.34375	0.14021	0.10817	0.07073	0.14945	0.17058	0.12400	0.13073
AF	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000		0.31720	0.22406	0.06162	0.10851	0.03159	0.16654	0.14865	0.06146
PT	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000		0.20979	0.17225	0.25653	0.22524	0.05694	0.13116	0.14578
CH	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000		0.10594	0.10403	0.14945	0.10514	0.08633	0.10745
AL	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000		0.02276	0.01048	0.04528	0.02948	0.00311
PA	0.00901+- 0.0091	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.00901+- 0.0091		0.02378	0.09485	0.05193	0.02428
RJ	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.01802+- 0.0182	0.00901+- 0.0091		0.08377	0.06399	0.00773
SC	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000		0.01141	0.03183
RS	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.07207+- 0.0227		0.02628
SP	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	0.11712+- 0.0273	0.0000+- 0.0000	0.05405+- 0.0201	0.0000+- 0.0000	0.0000+- 0.0000	

Considerar- SI (Santa Isabel), TE (Terena), AF (África), PT (Portugal), CH (China), AL (Alagoas), PA (Pará), RJ (Rio de Janeiro), SC (Santa Catarina), RS (Rio Grande do Sul), SP (São Paulo). Valores negativos devem ser interpretados como diferenciação genética inexistente entre as duas populações, sendo produzidos provavelmente pela impressão do algoritmo utilizado. Foi considerado como base o nível de significância (p) = 0,05, ao qual foi aplicada a correção de Bonferroni passando a ser significativo os valores de P menores ou igual a 0,00357. As distâncias genéticas significativas estão mostradas na matriz de significância com sinal “+” na tabela 19.

Tabela 19- Matriz de significância das distâncias genéticas (F_{ST}). Distâncias significativas são marcadas com sinal “+” e distâncias com sinal “-” não são significativas.

	SI	TE	AF	PT	CH	AL	PA	RJ	SC	RS	SP
SI											
TE	-										
AF	+	+									
PT	+	+	+								
CH	+	+	+	+							
AL	+	+	+	+	+						
PA	-	+	+	+	+	-					
RJ	+	+	+	+	+	-	-				
SC	+	+	+	+	+	+	+	+			
RS	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
SP	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	

Foi considerado como base o nível de significância (p) = 0,05, ao qual foi aplicada a correção de Bonferroni passando a ser significativo os valores de P menores ou igual a 0,00357. Considerar SI (Santa Isabel), TE (Terena), AF (África), PT (Portugal), CH (China), AL (Alagoas), PA (Pará), RJ (Rio de Janeiro), SC (Santa Catarina), RS (Rio Grande do Sul), SP (São Paulo).

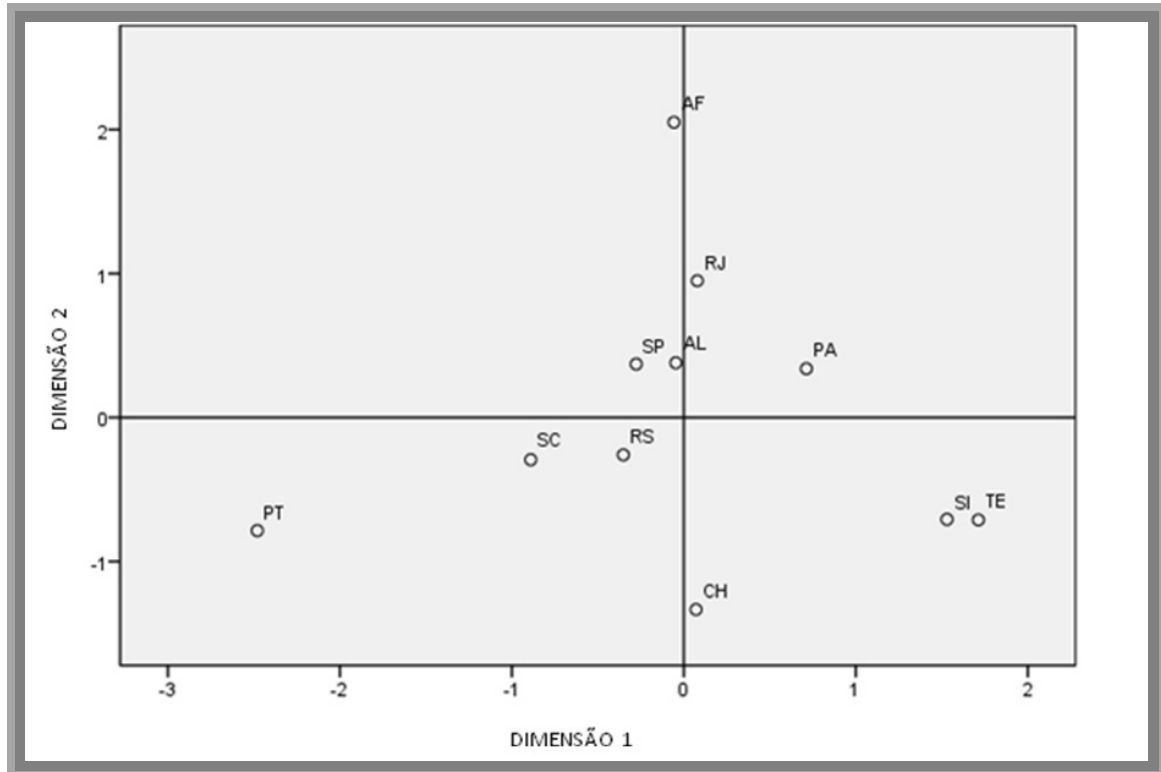


Figura 39- Projeção em duas dimensões do MDS das distâncias genéticas (F_{ST}) entre as 10 populações analisadas (valor de stress = 0,11729).

Foi gerada uma matriz de distâncias genéticas (F_{st}) entre as populações, por meio do programa Arlequin. Esta matriz foi baseada nas freqüências dos haplogrupos verificados nas populações estudadas. A partir desta matriz foi realizada uma análise multidimensional (MDS), com auxílio do software STATISTICA v8.0 e gerado um gráfico em duas dimensões. Os círculos representam as populações.

Legenda- SI - Santa Isabel do Rio Negro, AM e a população, TE - Terena, RJ- Rio de Janeiro; SP - São Paulo; AL- Alagoas; PA - Pará; SC - Santa Catarina; RS - Rio Grande do Sul; AF- África; CH - China (Ásia); PT – Portugal (Europa).

A partir dos resultados mostrados na Figura 39, é possível observar que os quatro grupos ancestrais localizam-se em lados opostos do gráfico e que populações miscigenadas brasileiras, representadas por Rio de Janeiro, Pará, Alagoas, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina agrupam-se no centro do gráfico, enquanto a população de Santa Isabel do Rio Negro agrupou-se com a Terena, indicando que a população urbana de Santa Isabel do Rio Negro apresenta uma ascendência matrilinear majoritariamente ameríndia.

3.1.5.3 Distâncias genéticas entre as populações alvo desse estudo e populações ameríndias.

Para esta etapa do trabalho, as populações ameríndias foram selecionadas com base em sua localizações geográficas (figura 40) e nas proporções de haplogrupos do mtDNA nelas descritas. Em termos de localização foram escolhidas populações nas proximidades de Santa Isabel do Rio Negro e da reserva onde se encontra o grupo Terena. Quanto aos haplogrupos, buscaram-se populações com frequências semelhantes às verificadas entre Santa Isabel do Rio Negro e Terena considerando apenas os haplogrupos ameríndios- A, B, C, D, sendo os outros eventualmente verificados em uma população designado, neste trabalho, de "haplogrupo O".

Desta forma, foram selecionadas as populações- Ache, Ayoreo, Ticuna, Wai-Wai, Gavião, Zoró, Xavante, Kaingang, Guarani, Quechua (adaptado de Bisso-Machado *et al.*, 2012) (Tabela 20).



Figura 40- Localização geográfica das populações utilizadas para análise da distância genética com relação às amostras do presente estudo- Santa Isabel do Rio Negro e Terena.

Tabela 20- Matriz de distância genética (Fst) para haplogrupos do mtDNA entre pares de populações ameríndias. Abaixo da diagonal estão os valores de P e acima da diagonal estão os correspondentes valores de Fst.

	SI	GU	TE	KA	WA	TI	AC	AY	GA	XA	QU	ZO
SI		0.29479	-0.00102	0.09320	0.04277	0.05749	0.34654	0.35586	0.23028	0.23663	0.11518	0.15710
GU	0.00000		0.30503	0.28519	0.48630	0.32812	0.72875	0.69116	0.59712	0.67424	0.50198	0.51651
TE	0.41758	0.00000		0.16193	0.10546	0.10777	0.33944	0.48281	0.24337	0.20535	0.09712	0.18378
KA	0.00010	0.00000	0.00000		0.11674	0.12218	0.58965	0.30913	0.43199	0.49063	0.33035	0.31787
WA	0.04495	0.00000	0.00178	0.00347		-0.01174	0.54490	0.21766	0.21137	0.40121	0.20425	0.10578
TI	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.73171		0.40178	0.19439	0.14554	0.34687	0.21234	0.06400
AC	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000		0.76590	0.66610	-0.00747	0.09672	0.63458
AY	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00020	0.00000	0.00000		0.61117	0.72115	0.47238	0.49936
GA	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00010	0.00010	0.00000	0.00000		0.55198	0.34920	-0.00022
XA	0.00000	0.00000	0.00050	0.00000	0.00000	0.00000	0.46193	0.00000	0.00000		0.04895	0.50985
QU	0.00000	0.00000	0.00010	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.02990		0.32489
ZO	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.01277	0.00426	0.00000	0.00000	0.39085	0.00000	0.00000	

Considerar- SI (Santa Isabel), TE (Terena), AC (Ache), AY (Ayoreo), TI(Ticuna), WA(Wai-Wai), GA(Gavião),ZO(Zoró), XA(Xavante),KA(Kaingang),GU(Guarani),QU(Quechua). Foi considerado como base o nível de significância (p) = 0,05, ao qual foi aplicada a correção de Bonferroni passando a ser significativo os valores de P menores ou igual a 0,0125. As distâncias genéticas significativas estão mostradas na matriz de significância com sinal “+” visualizado na tabela 21.

Tabela 21- Matriz de significância das distâncias genéticas (F_{ST}). Distâncias significativas são marcadas com sinal “+” e distâncias com sinal “-” não são significativas.

	SI	GU	TE	KA	WA	TI	AC	AY	GA	XA	QU	ZO
SI												
GU	+											
TE	-	+										
KA	+	+	+									
WA	+	+	+	+								
TI	+	+	+	+	-							
AC	+	+	+	+	+	+						
AY	+	+	+	+	+	+	+					
GA	+	+	+	+	+	+	+	+				
XA	+	+	+	+	+	+	-	+	+			
QU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ZO	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	

Foi considerado como base o nível de significância (p) = 0,05, ao qual foi aplicada a correção de Bonferroni passando a ser significativo os valores de P menores ou igual a 0,0125. Considerar SI (Santa Isabel), TE (Terena), AC (Ache), AY (Ayoreo), TI(Ticuna), WA(Wai-Wai), GA(Gavião),ZO(Zoró), XA(Xavante),KA(Kaingang),GU(Guarani),QU (Quechua).

A partir dos dados da matriz de distâncias genéticas de pares de populações, foi construído o gráfico de escalonamento multidimensional (MDS) mostrado na figura 41. O valor de stress foi estimado em 0,14567 o que, sugere uma aproximação adequada entre os resultados do MDS e os dados da matriz de distâncias.

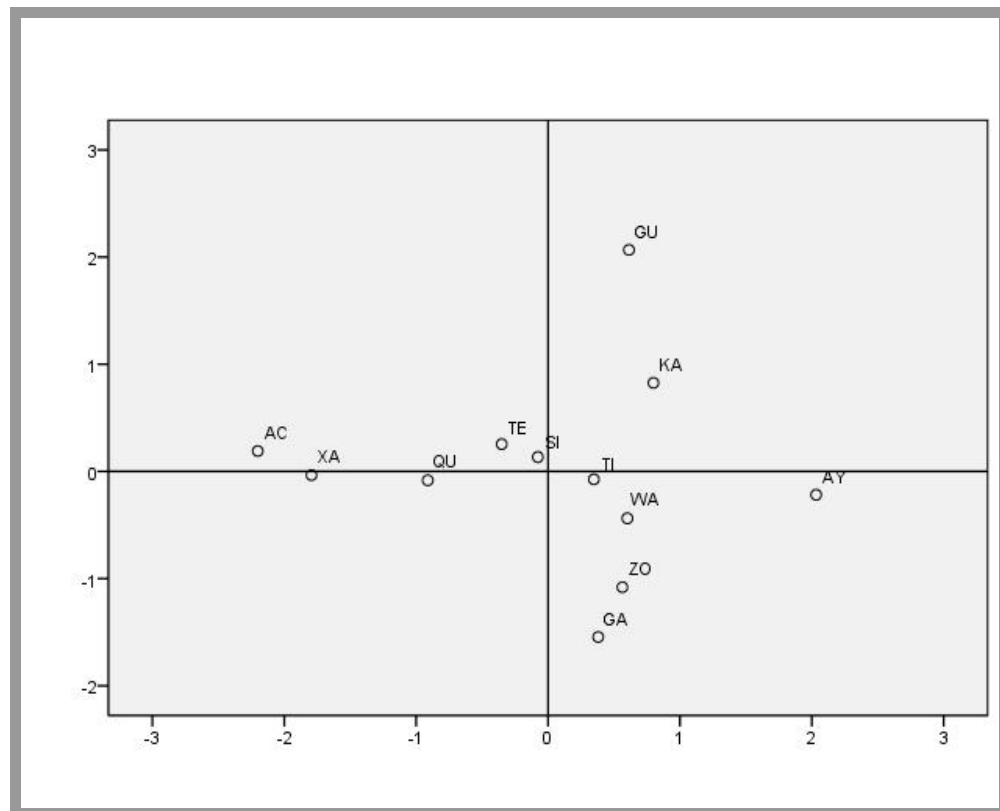


Figura 41- Projeção em duas dimensões do MDS das distâncias genéticas (F_{ST}) entre as 10 populações analisadas (valor de stress = 0,14567). Os círculos representam as populações. A população de Legenda- SI - Santa Isabel e a população TE- Terena, AC- Ache, AY -Ayoreo, TI-Ticuna, WA- Wai-Wai, GA- Gavião,ZO- Zoró, XA- Xavante,KA- Kaingang ,GU- Guarani,QU -Quechua.

3.2 – Polimorfismos do cromossomo Y

3.2.1 - STRs

Na tabela 22 são apresentados os haplótipos constituídos por 17 *loci* STR do cromossomo Y de 49 indivíduos da amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro. Enquanto 46 indivíduos tiveram seus haplótipos convenientemente definidos, para outros 3 não se verificou a definição de todos os 17 marcadores genéticos que formam o haplótipo Y- STR considerado.

Tabela 22- Haplótipos do cromossomo Y dos 49 indivíduos da população de Santa Isabel do Rio Negro. A ordem dos haplótipos Y-STRs são- DYS456, DYS389 I, DYS390, DYS389 II, DYS458, DYS19, DYS385, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448

Amostra	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATAH4	DYS437	DYS438	DYS448
12	15	13	25	30	15	14	9-20	12	10	12	22	14	12	14	11	19
11	15	13	25	30	15	14	9-20	12	10	12	22	14	12	14	11	19
2	15	13	25	30	15	14	9-20	12	10	12	22	14	12	14	11	19
9	15	13	25	30	15	14	9-20	12	10	12	22	14	12	14	11	19
33	14	13	23	28	18	16	12	13	10	nt	22	11	12	14	10	20
101	15	12	23	30	16	13	13-16	13	10	11	22	15	12	14	12	19
90	15	12	23	30	16	13	13-16	13	10	11	22	15	12	14	12	19
48	15	12	23	30	16	13	13-16	13	10	11	22	15	12	14	12	19
88	15	12	23	30	16	13	13-16	13	10	11	22	15	12	14	12	19
26	15	12	23	30	16	13	13-16	13	10	11	22	15	12	14	12	19
87	15	12	23	30	16	13	13-16	13	10	11	22	15	12	14	12	19
89	15	12	25	29	16	13	14-14.3	13	10	12	22	14	12	14	11	20
80	15	12	25	29	16	13	14-14.3	13	10	12	22	14	12	14	11	20
56	15	12	25	29	16	13	14-14.3	13	10	12	22	14	12	14	11	20
44	15	12	24	28	18	14	11-14	13	11	11	23	13	12	15	12	19
68	15	13	22	30	19	15	14	13	11	12	21	11	11	16	10	20
46	15	13	23	30	16	13	13-17	13	10	11	25	14	11	14	11	20
43	15	13	24	29	15	13	17-18	13	10	12	23	11	12	14	10	20
65	15	13	24	29	17	14	11-14	13	11	12	23	13	12	14	12	18
91	15	13	24	29	19	13	14-18	13	10	12	22	14	11	14	11	21
61	15	13	24	30	15	13	14-18	14	10	12	22	14	12	14	12	20
36	15	13	24	30	18	13	14-18	13	10	13	22	14	11	14	11	21
75	15	13	24	30	19	13	14-18	13	10	12	22	14	11	14	11	20

38	15	13	24	30	19	13	14-18	13	10	12	22	14	11	14	11	20
63	15	13	24	30	19	13	14-18	13	10	12	22	14	11	14	11	20
102	15	13	25	29	16	14	12-15	13	11	12	23	12	12	14	13	18
5	15	14	24	30	17	15	11-14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
84	16	12	24	30	16	13	14-16	13	10	11	22	15	12	14	12	19
35	16	13	22	29	18	14	11-16	12	10	11	23	13	12	15	12	19
39	16	13	23	29	15	15	12-16	13	9	12	22	11	12	14	9	20
28	16	13	23	31	15	13	15-16	13	10	12	22	14	12	14	11	21
37	16	13	24	29	17	14	11-14	13	11	13	23	13	11	15	12	19
34	16	13	24	30	15	14	14-19	12	10	12	22	14	11	14	11	19
7	16	13	24	30	15	14	14-19	12	10	12	22	14	11	14	11	19
10	16	13	24	30	15	14	14-19	12	10	12	22	14	11	14	11	19
21	16	13	24	30	15	14	14-19	12	10	12	22	14	11	14	11	19
1	16	13	24	30	15	14	14-19	12	10	12	22	14	11	14	11	19
22	16	13	24	30	15	14	14-19	12	10	12	22	14	11	14	11	19
27	16	13	24	30	15	14	14-19	12	10	12	22	14	11	14	11	19
92	16	13	24	30	20	13	14-19	13	10	13	22	13	11	14	11	21
78	16	13	24	31	16	13	16-18	12	10	12	23	11	12	14	10	21
9	16	13	25	30	15	14	9-20	12	10	12	22	14	12	14	11	19
45	16	14	24	30	18	13	14	13	9	11	21	11	12	14	10	20
71	16	14	24	31	16	13	14-18	14	10	11	22	14	12	14	12	20
3	16	14	25	31	15	14	9-20	12	10	12	22	14	12	14	11	19
96	14	13	23	28	18	16	12	13	10	nt	22	11	12	14	10	20
62	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	12	nt	nt	nt	nt	nt	15	nt	Nt
74	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	13	10	nt	nt	nt	nt	16	nt	Nt
24	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	14	11	nt	23	nt	nt	15	nt	Nt

As amostras em destaque compartilham os mesmos haplótipos. Cabe ressaltar que apenas um exemplar destes observados em multiplicidade foi considerado para análise estatística. nt- não tipado

3.2.2 - SNPs

A análise dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do cromossomo Y foi realizada somente para a população de Santa Isabel do Rio Negro, uma vez que a amostra da população Terena já havia sido avaliada, no LDD, com relação a marcadores Y- SNP, sendo estes resultados considerados na discussão deste trabalho.

Com base em levantamentos históricos e visando inferir as origens geográficas dos ancestrais masculinos da população de Santa Isabel do Rio Negro, dos mais de 500 SNPs compilados na árvore filogenética do cromossomo Y publicada pelo YCC (2002), atualizada em 2008 por Karafet e colaboradores, 5

SNPs foram selecionados para identificação do principal haplogrupo ameríndio, Q1a3a*, putativamente presente nesta população. Estes 5 SNPs, denominados de M242, M3, M19, M194, M199 compuseram o multiplex, Q.

3.2.2.1 Análise dos produtos de amplificação em gel de acrilamida 12%

Os produtos relativos à amplificação do *multiplex* da região não recombinante do cromossomo Y foram analisados em gel de acrilamida, a 12%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. A amplificação por PCR gera 5 fragmentos- M3(93pb), M194 (127pb), M242(137pb), M19(170pb), M199 (197pb). O tamanho dos fragmentos pode ser visualizado na figura 42.

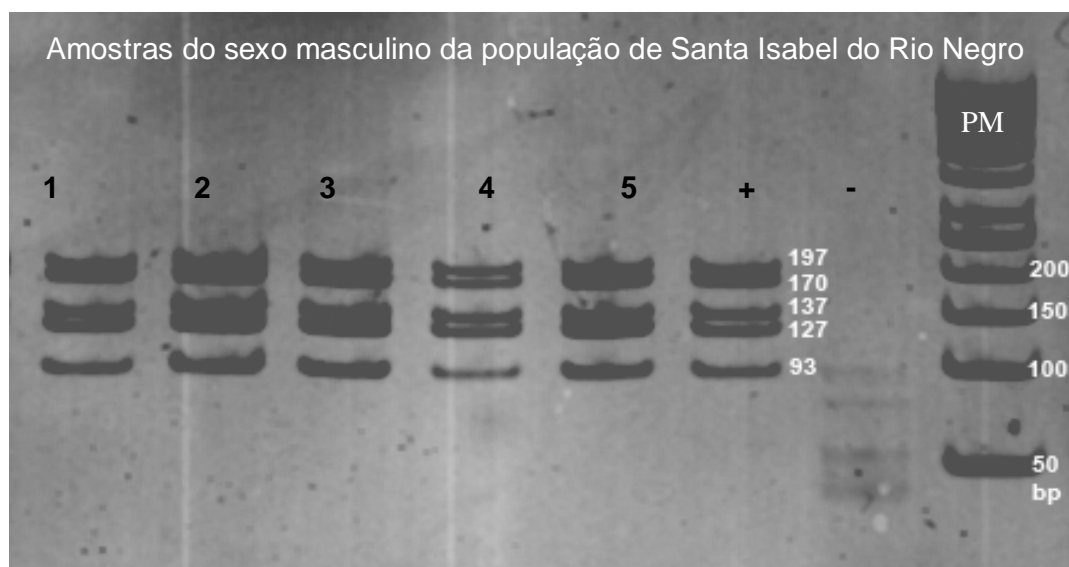


Figura 42- Produtos de amplificação por PCR da região não recombinante do cromossomo Y.

A amplificação do produto de gerou 5 fragmentos- M3(93pb), M194 (127pb), M242(137pb), M19(170pb), M199 (197pb). Alíquotas de 2ng do produto da PCR foram analisadas em gel de acrilamida, a 12%, corados com brometo de etídeo e detectados através do escaneamento do gel no leitor de fluorescência FMBIO II. Amostras de 1 a 5- produtos de amplificação da região de interesse da porção não recombinante do cromossomo Y da amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro; amostra+- controle positivo do sexo masculino (DNA K007); amostra - controle negativo; PM- Padrão de peso molecular.

3.2.2.2 Minisequenciamento da porção não recombinante do cromossomo Y

Para a genotipagem dos indivíduos foi aplicada a técnica de minisequenciamento por meio da reação SBE, utilizando-se o kit SNAPshot™. A estratégia de genotipagem proposta, dos 31 indivíduos que compõem a amostra, 15 indivíduos tiveram seus haplogrupos identificados sendo genotipados pelo multiplex Q. Dentre os 16 restantes, 4 não apresentaram uma boa amplificação e 12 indivíduos apresentaram ausência da mutação M3 e M242, com isso foram classificados como “outros”. As análises genéticas resultaram em eletroferogramas com picos bem definidos e ínfima formação de artefatos, o que garante qualidade e confiabilidade aos perfis obtidos.

O eletroferograma “A” da figura 43 representa a genotipagem de um indivíduo com ancestralidade ameríndia. Neste indivíduo observa-se a mutação no *locus* M3 (C>T) e no *locus* M242 (C>T), ao contrário do eletroferograma “B” que mostra a genotipagem de um indivíduo não ameríndio, onde não se verifica a mutação descrita acima. A distribuição da frequência do haplogrupo do cromossomo Y está descrita na figura 44.

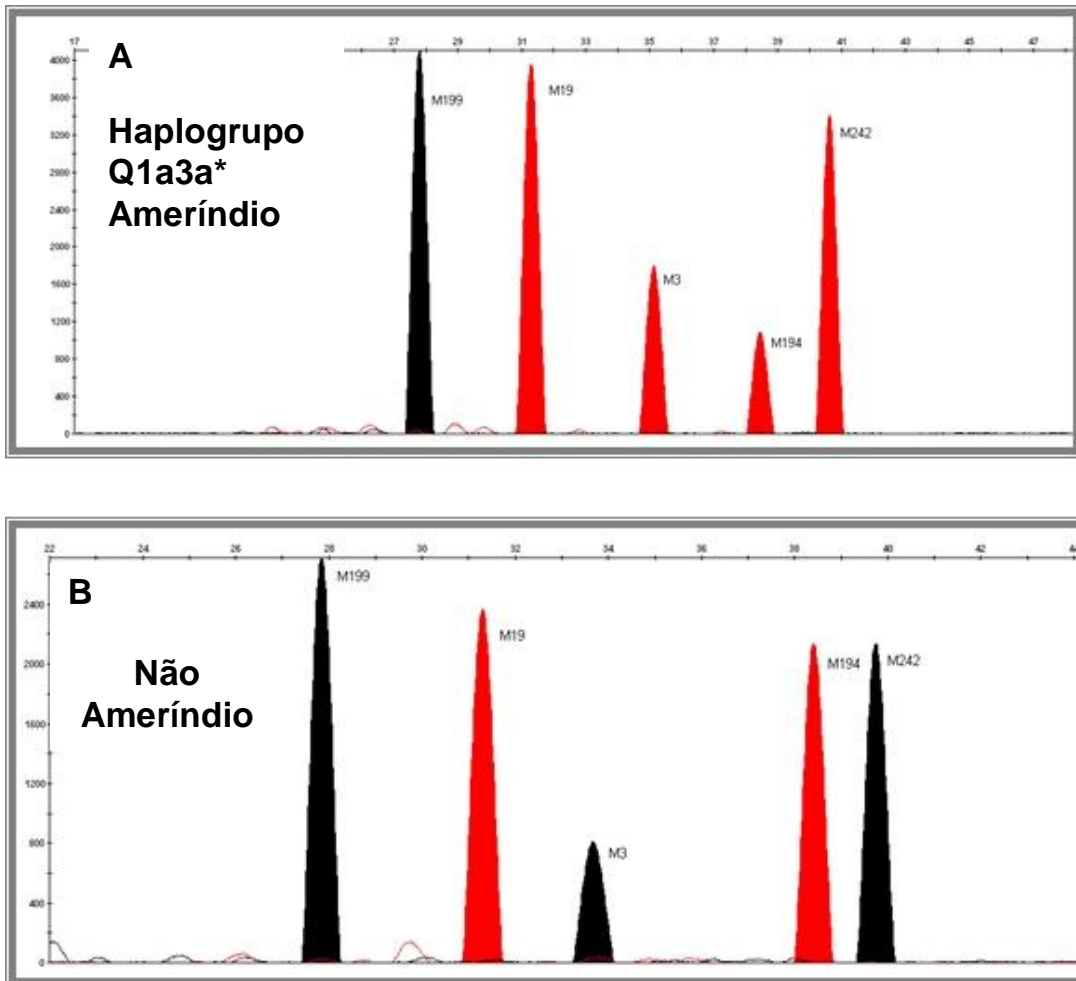


Figura 43- Eletroferograma do produto amplificado da região não recombinante do cromossomo Y pelo multiplex Q. Os produtos amplificados foram separados e detectados pelo leitor de fluorescência ABI Prism 310.

O eletroferograma “A” é característico de indivíduos com ancestrais pertencentes ao haplogrupo Q1a3a* (ameríndio), enquanto que o padrão observado no eletroferograma “B” remete a um indivíduo que não apresenta ancestralidade ameríndia.

No eixo das abcissas são apresentados os produtos de amplificação, em pares de base. No eixo das ordenadas são mostrados em Unidades Relativas de Fluorescência (RFU) os produtos de amplificação gerados pelo multiplex Q.

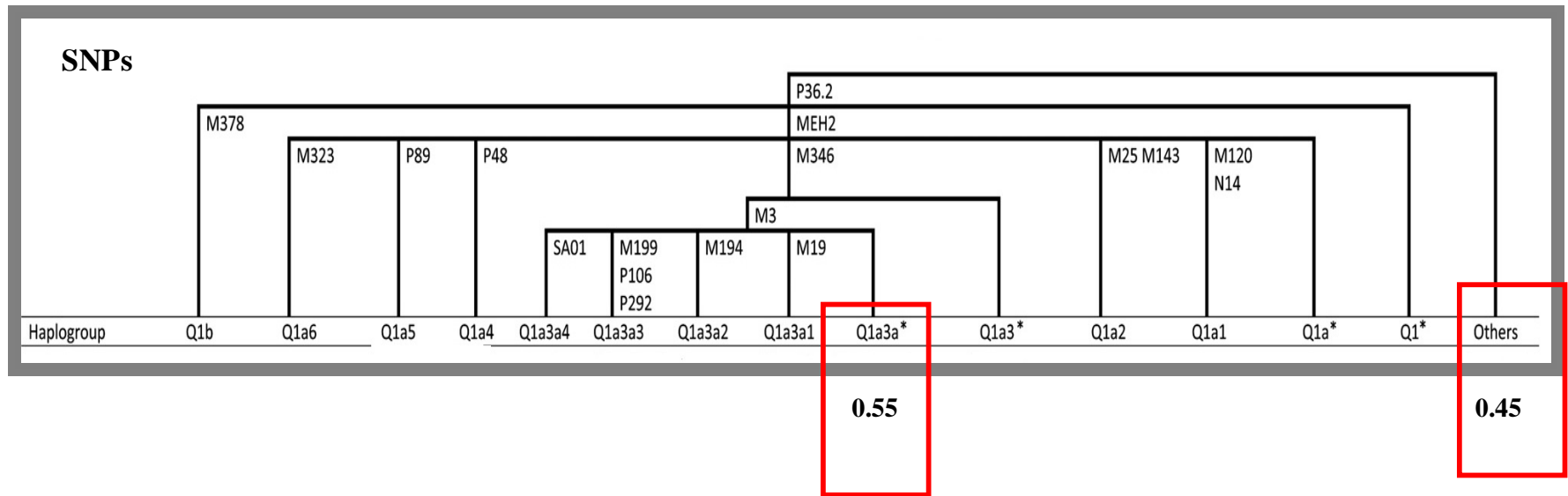


Figura 44- Árvore filogenética do cromossomo Y mostrando apenas a linhagem ameríndia. A frequência do haplogrupo ameríndio Q1a3a* foi de 55% enquanto 45% dos indivíduos apresentaram haplogrupos denominado neste trabalho como "outros".

3.3 - Distâncias genéticas entre a população de Santa Isabel do Rio Negro e populações mundiais de interesse.

A diversidade do cromossomo Y foi analisada através da distância genética, utilizando como comparação os dados obtidos da população do estudo com dados disponíveis na literatura de populações parentais que teriam migrado para o Brasil (africanos, europeus e ameríndios) contribuindo assim para a atual composição genética brasileira. As populações representativas dessas etnias são- Portugal, Espanha, Guiné-Equatorial e Terena. Foi aplicada a correção de Bonferroni sobre o valor de P.

Os dados de STRs foram utilizados para análise da distância genética. Não foi possível aproveitar os dados dos SNPs, pois somente foi usado o multiplex de marcadores SNPs específicos de ameríndio, discriminando apenas se indivíduo, é ou não, pertencente a este grupo ancestral. Para esta análise foi considerado o haplótipo mínimo estendido (8 marcadores analisados), uma vez que os dados publicados não apresentaram todos os 17 marcadores STRs presentes neste trabalho (Tabela 9). Como resultado, foi observado diferença significativa entre as populações (Tabela 23).

Tabela 23- Matriz de distância genética (F_{st}) para haplótipos do cromossomo Y entre pares de populações. Abaixo da diagonal estão os valores de P e acima da diagonal estão os valores de F_{st} . As distâncias genéticas significativas estão mostradas com sinal “+” na tabela 24.

	AF	PT	ES	SI	TE
AF		0.20792	0.19295	0.17146	0.22315
PT	0.00000		0.05302	0.07022	0.15174
ES	0.00000	0.00000		0.13219	0.20651
SI	0.00000	0.00000	0.00000		0.07778
TE	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	

Africa (AF), Portugal (PT), Espanha (ES), Santa Isabel (SI), Terena (TE).

Tabela 24- Matriz de significância das distâncias genéticas (F_{ST}). Distâncias significativas são marcadas com sinal “+”. Foi considerado como base o nível de significância (p) = 0,05, ao qual foi aplicada a correção de Bonferroni passando a ser significativo os valores de P menores ou igual a 0,00416. Considerar- África (AF), Portugal (PT), Espanha (ES), Santa Isabel (SI), Terena (TE).

	AF	PT	ES	SI	TE
AF					
PT	+				
ES	+	+			
SI	+	+	+		
TE	+	+	+	+	

A partir dos dados da matriz de distâncias genéticas de pares de populações, foi construído, o gráfico de escalonamento multidimensional (MDS) mostrado na figura 45. O valor de stress foi estimado em 0,02210 o que sugere uma ótima aproximação entre os resultados do MDS e os dados da matriz de distâncias.

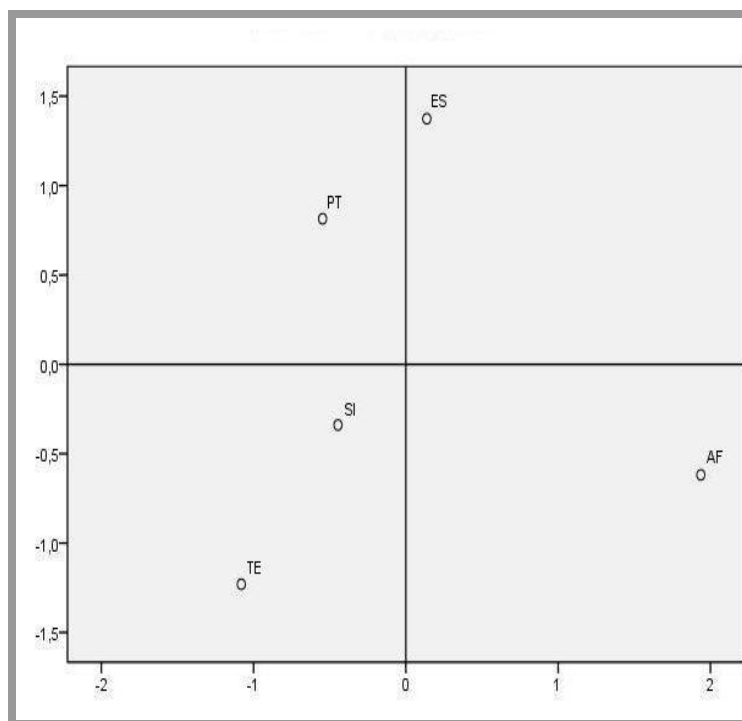


Figura 45- Projeção em duas dimensões do MDS das distâncias genéticas (F_{ST}) entre as 5 populações analisadas (valor de stress = 0,02210). Os círculos representam as populações. A população de Santa Isabel é representada pela sigla SI. Considerar- AF- Guiné-Equatorial (África); PT – Portugal (Europa), ES-Espanha (Europa) e TE –Terena (Ameríndio).

A figura 46 destaca a diferença na frequência do haplogrupo ameríndio- Q1a3a* nas populações de Santa Isabel do Rio Negro (55%) e Terena (62%) (Dayse Aparecida da Silva, paper em preparação).

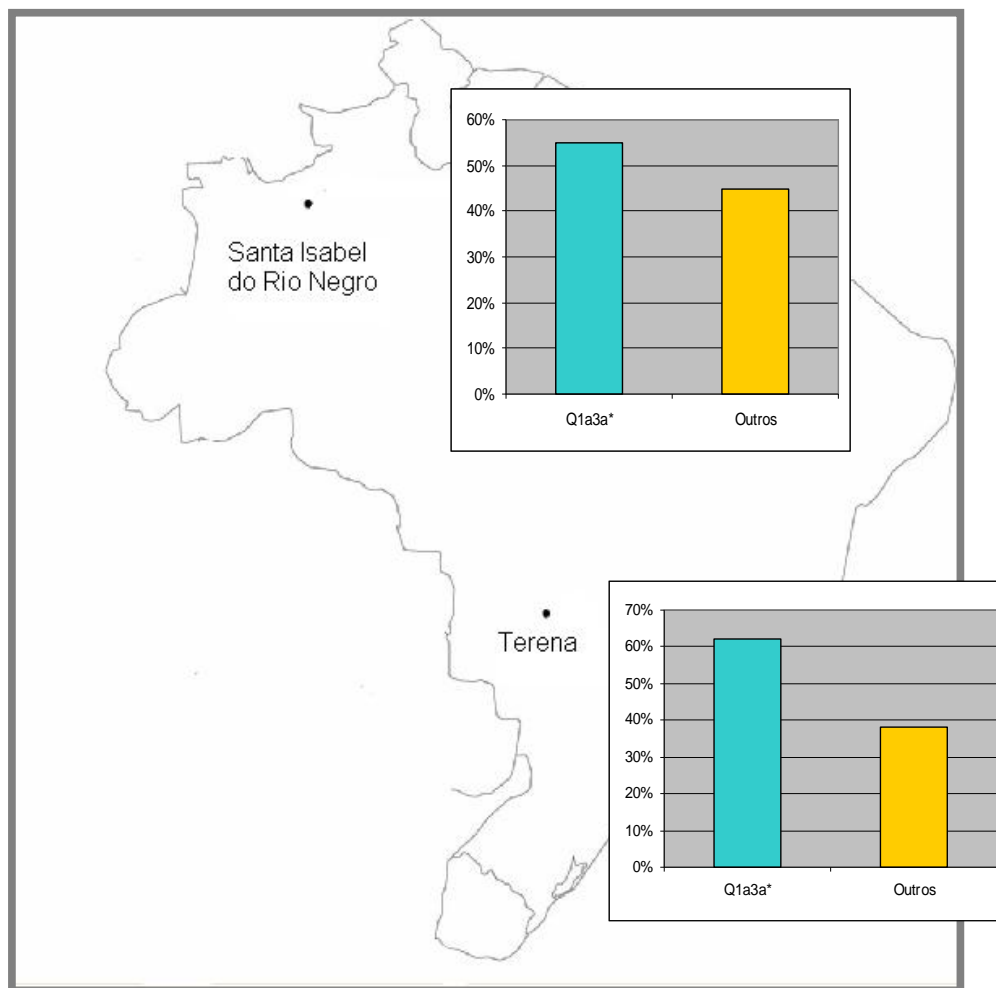


Figura 46- Mapa ilustrativo destacando a frequência do haplogrupo ameríndio- Q1a3a* (55%) na população de Santa Isabel e (62%) na população Terena.

4 DISCUSSÃO

A população brasileira constituiu-se a partir de mistura multiétnica, com base em três grupos principais- europeus, ameríndios e africanos. As formas como esses grupos se distribuíram e contribuíram para a formação das populações das diversas regiões do país se reflete na distribuição diferencial de fenótipo entre elas. Por exemplo, ocorreu um maior fluxo de africanos para o Nordeste e Sudeste do Brasil, enquanto que os extremos do país, Norte e Sul, tiveram menor participação desses migrantes (IBGE, 2010). No Norte, a contribuição ameríndia foi numericamente relevante para a população local, já a região Centro-Oeste brasileira foi colonizada por migrações internas advindas de todas as partes do Brasil, principalmente dos estados vizinhos e foi a última região brasileira a ser povoada (Palacín & Moraes, 1994).

O contato com os portugueses, pacífico em alguns casos e hostil em outros, gerou miscigenação e a redução drástica da população ameríndia brasileira, hoje estimada em 900 mil indígenas. Embora corresponda a somente 0,4% da população total, o Brasil apresenta um significativo contingente de indígenas. Neste conjunto, não estão contabilizados povos indígenas brasileiros considerados “índios isolados”, pela própria política de contato, como também indígenas que estão em processo de reafirmação étnica, após anos de dominação e repressão cultural (Luciano, 2006) e, conseqüentemente, ainda não se autodeclararam como tal. No Censo Demográfico 2010, aprimorou-se a investigação desse contingente populacional, introduzindo o contexto étnico, a língua falada no domicílio e a localização geográfica, que são considerados critérios de identificação de população indígena nos censos nacionais de diversos países.

Este último censo permitiu o conhecimento da grande diversidade indígena existente no Brasil e um melhor entendimento quanto à composição deste segmento populacional, os povos indígenas residentes nas terras indígenas; os indígenas urbanizados com pertencimento étnico a povos indígenas específicos; e pessoas que se classificaram genericamente como indígenas, mas que não possuem identificação com etnias específicas (Pereira *et al.*, 2005).

É fundamental ressaltar que a classificação das comunidades remanescentes de indígenas por parte do governo utiliza como parâmetros aspectos culturais, históricos, sociológicos e antropológicos, todos avaliados à luz da autotaxonomia, fator ainda primordial para a identificação do indígena. O quesito cor da pele, erroneamente vem sendo utilizado desde o primeiro Recenseamento Geral do Brasil, em 1872 para a definição da ancestralidade. O critério de autodeclaração é superficial e subjetivo, não se relacionando objetivamente com a real ancestralidade do indivíduo, como mostraram Parra e colaboradores (2003) e Pimenta e colaboradores (2006). Sabe-se que essa, assim como outras características físicas externas como formato da face, do nariz, e textura do cabelo são traços superficiais, que espelham adaptações ao clima e outras variáveis ambientais. Por isso, a utilização de marcadores genéticos adequados tem como definir corretamente a ancestralidade de um indivíduo e relacioná-los a estudos populacionais.

Os dados genéticos também podem ser utilizados para compreensão dos fatos históricos. Marcadores uniparentais como o cromossomo Y e o DNA mitocondrial, podem auxiliar no entendimento do processo de povoamento, pois permitem distinguir o quanto da mistura herdada deriva da contribuição diferencial entre homens e mulheres. No Brasil sabe-se que o cruzamento preferencial entre homens europeus e mulheres africanas e ameríndias contribuiu para o processo assimétrico na época da colonização brasileira (Callegari -Jacques *et al.*, 2003).

Nesse trabalho analisamos marcadores uniparentais masculinos e femininos de uma amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro, no Amazonas e o mtDNA em uma amostra da tribo Terena do Mato Grosso do Sul, tendo em vista que para essa amostragem o cromossomo Y já havia sido estudado e tais resultados serão discutidos adiante.

Dados históricos e culturais da população urbana do município de Santa Isabel do Rio Negro indicam a presença de uma alta ancestralidade ameríndia na sua composição. Adicionalmente, dados históricos sobre a comunidade Terena apontam sua saída das reservas para a cidade na busca de melhores condições de vida, uma vez que muitos Terenas passaram a morar em cidades, para ficarem mais próximos de seus trabalhos. Nesse sentido, o interesse em estudar essas duas populações, uma urbana e a outra rural, foi averiguar através da genética se ocorreram cruzamentos preferenciais entre homens europeus e mulheres ameríndias, como observado para a população caracteristicamente miscigenada do

Brasil, se ocorreu diferenças nesta contribuição em relação aos 3 principais componentes étnicos ou se tais populações apenas são descendentes de uma única etnia, a ameríndia.

4.1-Contribuição uniparental feminina

O conjunto de polimorfismos existentes no DNA mitocondrial é amplamente utilizado com diferentes objetivos em estudos populacionais, antropológicos, de genética médica e forense (Van Oven & Kayser, 2009). A partir dos dados sobre a evolução humana, realizados através do mtDNA, identificou-se que as linhagens matrilineares estão relacionadas com regiões geográficas específicas, o que possibilita a reconstrução da história demográfica, das migrações e da determinação da ancestralidade genética de indivíduos e grupos humanos (Barbosa *et al.*, 2008; Bobillo *et al.*, 2010; Paneto *et al.*, 2011).

No presente trabalho, em indivíduos não relacionados por herança materna da população de Santa Isabel do Rio Negro e Terena foi analisada a região controle do DNA mitocondrial. Através do sequenciamento desta porção do mtDNA, pode-se estimar as frequências de haplogrupos característicos de linhagens ameríndias, européias e africanas, ou seja, das principais populações parentais brasileiras.

Haplogrupos mitocondriais ameríndios prevaleceram nas duas populações, tendo sido verificados em 98,7% da população de Santa Isabel do Rio Negro e em 97,7% na população Terena. O haplogrupo mitocondrial ameríndio mais freqüente em ambas as populações foi o A com percentuais de 34% em Santa Isabel do Rio Negro e 42 % na população Terena, sendo que em ambas as populações, os haplogrupos B, C e D apresentaram frequências gradativamente inferiores. O haplogrupo L característico da população africana foi verificado em apenas uma amostra Terena enquanto que na população de Santa Isabel do Rio Negro apenas um indivíduo do haplogrupo europeu H foi observado (Figura 38).

4.1.1 Distâncias genéticas entre as populações alvo deste estudo e populações urbanas brasileiras e mundiais de interesse

A análise de distância genética envolveu a comparação aos pares entre as 2 populações aqui estudadas e de cada uma delas com populações miscigenadas de Alagoas, Pará, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro e com populações ameríndias. Em termos metodológicos, quando ocorrem múltiplos testes de significância independente, recomenda-se usar algum tipo de correção do nível de significância a fim de diminuir a chance de rejeição da hipótese nula, ou seja, de não diferenciação quando ela é verdadeira (erro tipo I). Para este estudo, foi utilizada a correção de Bonferroni, que altera o nível de significância (P) a fim de evitar erros derivados da múltipla comparação, ou seja, este método não aumenta os erros do tipo II, caracterizado por aceitar como verdadeira uma hipótese nula (Abdi, 2007).

Em relação à ancestralidade materna, os resultados da análise de distância genética, *Fst*, entre pares de populações mostraram que as populações Terena e Santa Isabel do Rio Negro se diferenciam de forma significativa das populações miscigenadas e das populações ancestrais, de Portugal, China e África com as quais elas foram comparadas. Através do gráfico MDS (Figura 39), observamos que as populações de Santa Isabel do Rio Negro e Terena formam um agrupamento com localização distante das demais populações. Acrescentar argumentos genéticos aos históricos juntamente com observações fenotípicas, reforça a ideia de que a população de Santa Isabel do Rio Negro manteve a sua ascendência matrilinear ameríndia e que os Terena conservaram suas características genéticas ancestrais, apesar do longo contato com não índios.

4.1.2 Amova nas amostras populacionais de Santa Isabel do Rio Negro e Terena e distância genética entre estas duas populações e populações ameríndias.

Entre as características particulares que faz com que os nativos americanos sejam tão interessantes de serem investigados, é a sua baixa variabilidade intrapopulacional (Bisso-Machado *et al.*, 2012), o que também foi verificado no

presente estudo, cujos resultados mostraram percentuais de 74 % e 71% para as populações de Santa Isabel do Rio Negro e Terena, respectivamente.

Portanto, as 2 populações alvo deste estudo não apresentaram importantes graus de miscigenação, o que justifica valores menores de diversidade haplotípica em relação aos encontrados em populações abertas como do Rio de Janeiro (Santos, 2012). Quanto menor o tamanho populacional e a taxa de imigração, maior será o grau de homozigose nela verificado, em conjunto com o baixo fluxo gênico e o elevado endocruzamento. A frequência com que os haplogrupos A, B, C e D do mtDNA distribuem-se ao longo do continente sul-americano é diferente, variando em um gradiente Norte-Sul. O haplogrupo A diminui em latitudes mais altas, enquanto que os haplogrupos C e D aumentam. O haplogrupo B apresenta-se em maior frequência na região central do continente (Figura 47) (Bisso – Machado *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foram observadas diferenças nas distribuições das frequências relativas dos haplogrupos na América do Sul, sendo verificadas distâncias genéticas significativas entre populações ameríndias de diferentes regiões geográficas (Tabela 20 e 21). Considerando a menor prevalência, na ordem de aproximadamente 1%, de componente étnico europeu ou africano nas amostras populacionais aqui estudadas, as diferenças observadas podem ser decorrentes de deriva genética. Por outro lado, as diferenças entre comunidades não indígenas, tendo em vista a história recente de sua formação, seria mais plausivelmente atribuída ao fluxo gênico.

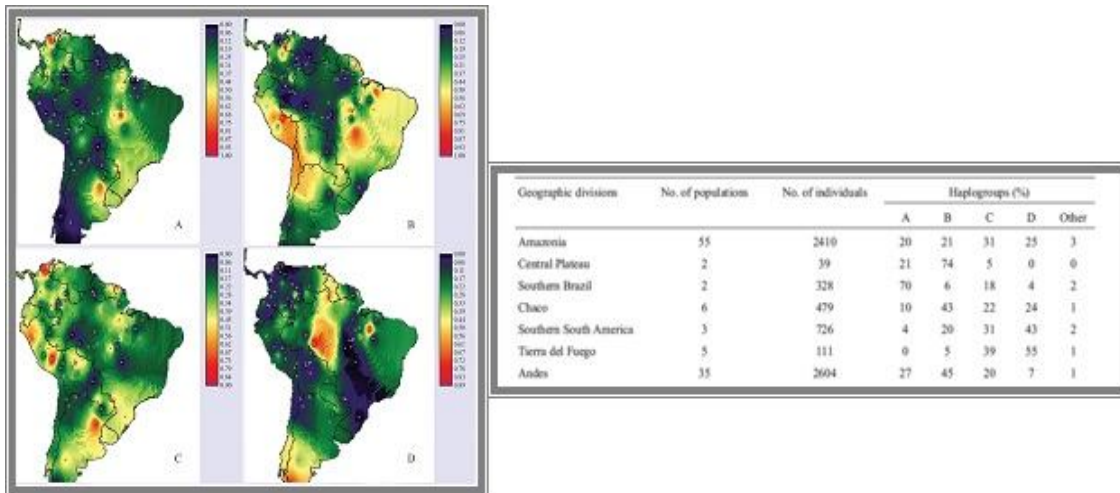


Figura 47- Mapa ilustrando a distribuição do padrão geográfico dos quatro haplogrupos (A-D) em ameríndios do sul. A escala a direita de cada mapa representa a frequência do haplogrupos (0.00-1.00) e a tabela ao lado ressalta essa frequência por geografia (Adaptado de Bisso –Machado *et al.*, 2012).

Foi observado também que a população de Santa Isabel do Rio negro não apresentou diferenciação genética significativa com a tribo indígena WaiWai ($F_{st} = 0.04277$), provavelmente por essas populações serem geograficamente próximas. A localização geográfica de cada população analisada pode ser visualizada na figura 40. Os WaiWai encontram-se dispersos em extensas partes do norte da Amazônia, entre o Brasil e a região das Guianas. Estes indígenas possuem um longo histórico de processos de troca e de relações com outras tribos.

A aproximação genética dos Terena com Santa Isabel do Rio negro ($F_{st} = 0.00102$) pode ser devido à alta frequência do haplogrupos A, seguido do haplogrupos B, C e D, observado em ambas as amostras, mas é importante ressaltar que não só os fatores geográficos podem implicar no padrão de distribuição dos haplogrupos ao longo do continente. Os fatores linguísticos também podem influenciar nessa variação (Bisso - Machado *et al.*, 2012). Com isso, a diferenciação genética não significativa entre Terena e Santa Isabel do Rio Negro, pode ser também atribuída a questão linguística, pois os Terena fazem parte do grupo pertencente a língua Aruak e Santa Isabel do Rio Negro apresenta este como prevalente em sua população.

Concluiu-se com esses resultados, que, mesmo que o número de indígenas tenha diminuído drasticamente durante os 500 anos de colonização, uma porcentagem significativa da linhagem ameríndia foi assimilada pela população branca. Os brancos brasileiros guardam grande parte da história da variabilidade do

mtDNA indígena. Portanto, é possível ao se analisar uma população ter uma ideia da variabilidade do mtDNA dos índios que viveram naquela região.

4.2 - Contribuição uniparental masculina

A maior parte do cromossomo Y é não recombinante e, desse modo, as mutações nesse cromossomo representam um registro de seu passado evolutivo, que pode ser usado na reconstrução da história de populações (Jobling & Tyler-Sith, 2003). Foi descrita uma série de polimorfismos nessa porção não recombinante do cromossomo Y, possibilitando a definição de haplogrupos representativos das linhagens associadas a origens geográficas (YCC, 2002; Karafet *et al.*, 2008). Dessa série de polimorfismos, foram selecionados para este estudo 5 marcadores bialélicos (SNPs).

Esse conjunto de marcadores genéticos aqui investigados em homens de Santa Isabel do Rio Negro permitiu a identificação do haplogrupo característico de ameríndio, Q1a3a* (Bisso- Machado *et al.*, 2011). Esse resultado nos forneceu estimativas interessantes a respeito da composição genética ancestral, pois Santa Isabel do Rio Negro não apresentou a mesma assimetria (homem europeu com mulher ameríndia ou africana) como a maioria dos estudos revelam (Bortolini *et al.*, 1999; Sans, 2000; Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Salzano & Bortolini, 2002, Santos, 2012).

Estudos pioneiros do cromossomo Y de nativos americanos identificaram uma única linhagem nas Américas, no qual hoje está reorganizada como haplogrupo Q. Este haplogrupo apresenta diversas linhagens, uma delas está presente com alta frequência somente em nativos americanos e muito pouco em populações siberianas, identificado por uma mutação no M3 (Bortolini *et al.*, 2003; Karafet *et al.*, 2008; Jota *et al.*, 2011). A mutação M242 definida pela transição de C>T observado em nativos americanos e asiáticos (Karafet *et al.*, 2008; Seielstad *et al.*, 2003) também foi encontrada na população de Santa Isabel do Rio Negro. Esta mutação ocorreu na Ásia central, antes da primeira migração para a América do Sul, já a mutação M3 ocorreu após a ocupação neste continente (Bortolini *et al.*, 2003) (Figura 48).

De acordo com o estudo realizado por Bortolini e colaboradores (2003), o alelo mutado M19 era apenas confinado no grupo populacional Tucano-Equatorial da região norte da América do Sul, onde a população de Santa Isabel do Rio Negro está inserida. Nesta amostra populacional apenas foram encontradas as mutações M242 e M3 e não M19, como visto na figura 43. Toscanini e colaboradores (2011) descreveram o alelo mutado M19 em uma população ameríndia da Argentina. A detecção do alelo M19 mais ao sul permite questionar a observação realizada por Bortolini e colaboradores de que esta linhagem serve como um exemplo de isolamento após a colonização, e que também sugere a forte deriva genética na qual os nativos americanos foram sujeitos.

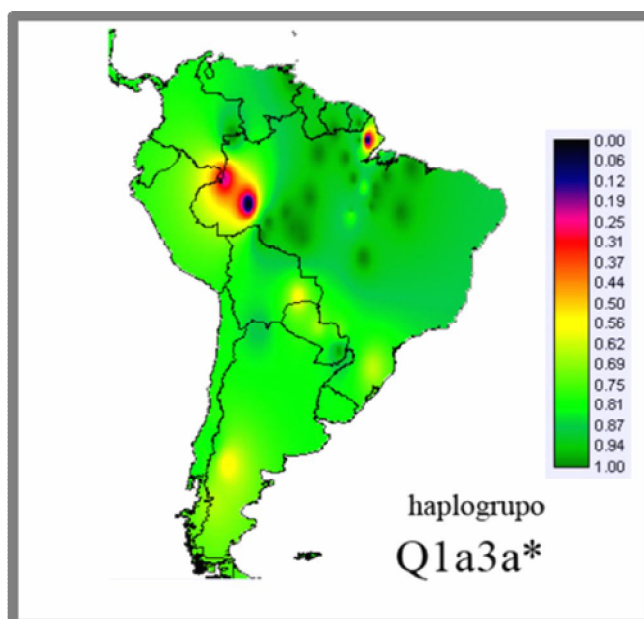


Figura 48- Mapa ilustrativo mostrando a distribuição do cromossomo Y Q1a3a* na América do Sul (Adaptado de Bisso- Machado, 2010).

4.2.1 Distâncias genéticas entre a população de Santa Isabel do Rio Negro e populações mundiais de interesse.

Para análise de distância genética, entre a população de Santa Isabel do Rio Negro e populações ancestrais de Portugal, Espanha, África (Guiné- Equatorial) e Terena, foram utilizados os dados de STRs do cromossomo Y.

Através do gráfico MDS (Figura 45), foi observado uma discreta proximidade com duas populações ancestrais Terena e Portugal, mas os resultados mostraram uma diferenciação genética significativa para todas as populações aqui analisadas, o que pode ser explicado pela diferença entre os tamanhos das amostras populacionais, o efeito de deriva ou refletir diferenças entre as rotas migratórias dos ameríndios anteriormente à colonização. As populações pré-colombianas sul-americanas mantinham dois fluxos gênicos principais- O fluxo dentro das populações andina e entre as populações abaixo do Andes (Tarazona-Santos *et al.*, 2001).

Bisso-Machado e colaboradores (2012) descreveram a frequência dos marcadores STRs do cromossomo Y observados em 29 populações de ameríndios do Sul, e fizeram uma classificação média sobre os alelos de maior prevalência por *locus*, reconstruindo um haplótipo provável do ancestral do clado Q de nativo americano (ANAQC), estes alelos são- 13 (DYS19), 12 (DYS388), 14 (DYS389I), 31 (DYS389II), 24 (DYS390), 10 (DYS391), 14 (DYS392), 13 (DYS393), 14 (DYS437), 11 (DYS 438), 12 (DYS439), 20 (DYS448), 15 (DYS456), 16 (DYS458), 22 (DYS635). Entretanto quando utilizaram esta informação no banco de dados do cromossomo Y (*Y Chromosome Haplotype Reference Database*) encontraram este haplótipo apenas em 3 indivíduos em um total de 36.448. No presente estudo, este haplótipo apareceu apenas em uma amostra de Santa Isabel do Rio Negro, mostrando que provavelmente não existe um único haplótipo ancestral do cromossomo Y em populações de nativos americanos da América do Sul.

4.3 Comparação entre a contribuição parental masculina e feminina

Polimorfismos genéticos, mas especificamente do mtDNA e do cromossomo Y, tem sido amplamente usados para analisar a população da América e determinar a origem de diferentes grupos nativos americanos (Tamm *et al.*, 2007; Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2009; Perego *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm revelado que recentes processos de miscigenação pós-conquista poderiam explicar parte da diversidade genética detectada na população existente de alguns grupos de nativos americanos (Salas *et al.*, 2008a; Sandoval *et*

al., 2009). Este padrão de mistura é mais aparente com marcadores de Y porque os cruzamentos entre homens europeus e mulheres ameríndias foram mais frequentes do que o reverso (Salas *et al.*, 2008b; Sandoval *et al.*, 2009).

A presença de genomas mitocondriais de origem não ameríndia foi rara nas duas populações analisadas, em contraste com os dados de Y-SNPs que mesmo prevalecendo o haplogrupo ameríndio Q1a3a*, apresentaram 45% e 38% de origem não ameríndia na população de Santa Isabel do Rio Negro e Terena, respectivamente (Figura 46).

A presença desses outros haplogrupos não ameríndios poderia ser explicada pela introdução de cromossomos Y dentro de tribos, enquanto que os genomas mitocondriais autóctones foram preservados. No entanto, a dinâmica de mistura é provavelmente diferente daqueles observados em grupos urbanos, uma vez que normalmente envolvem mulheres indígenas que moram em reservas e homens que vivem perto da fronteira dessas reservas. Nesta situação, a criança normalmente permanece com sua mãe. Este fenômeno tem sido descrito em índios Guarani (Marrero *et al.*, 2007), mas diversos estudos indicam que este fenômeno poderia ser mais comum do que previamente se pensava (Bortolini *et al.*, 2003; Mazieres *et al.*, 2008; Baillet *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010; Gaya-Vidal *et al.*, 2011).

Com relação aos estudos de populações ameríndias brasileiras, destacam-se aqueles que realizaram a análise do mtDNA e do cromossomo Y (Santos *et al.*, 1996; Bortolini *et al.*, 1997; Bonatto *et al.*, 1997a, 1997b; Bortolini *et al.*, 2002, Marrero *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2008a, 2008b). Esses trabalhos indicaram baixa diversidade genética, com elevada diferenciação interpopulacional e, em alguns casos, presença de material genético não indígena devido a fluxo gênico com europeus e africanos.

4.4 Comparação com outros marcadores utilizados para esta população

Os Indels são polimorfismos de comprimento, gerados a partir de inserções e deleções de um ou mais nucleotídeos. Esse tipo de polimorfismo é de relevante interesse em estudos de ancestralidade, pois permite a identificação de mínimas diferenças entre frequências alélicas de grupos populacionais separados

geograficamente (Santos, 2010; Pereira, 2012). Sendo assim, são considerados marcadores denominados de informativos de ancestralidade (*Ancestry Informative Markers – AIMs*). A análise desses marcadores na população de Santa Isabel do Rio Negro e Terena permitiu estimar a miscigenação a nível individual, e com isso permitiu inferir a proporção ancestral que cada indivíduo apresenta na população atual.

Observou-se uma contribuição genética dos três grupos étnicos formadores da população brasileira na amostra de Santa Isabel do Rio Negro e Terena (Figura 49). Porém, ambas as populações apresentaram uma composição genética de ameríndio muito maior do que as populações urbanas brasileiras, até mesmo quando comparadas com a região Norte (Manta, comunicação pessoal; Santos *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2012).

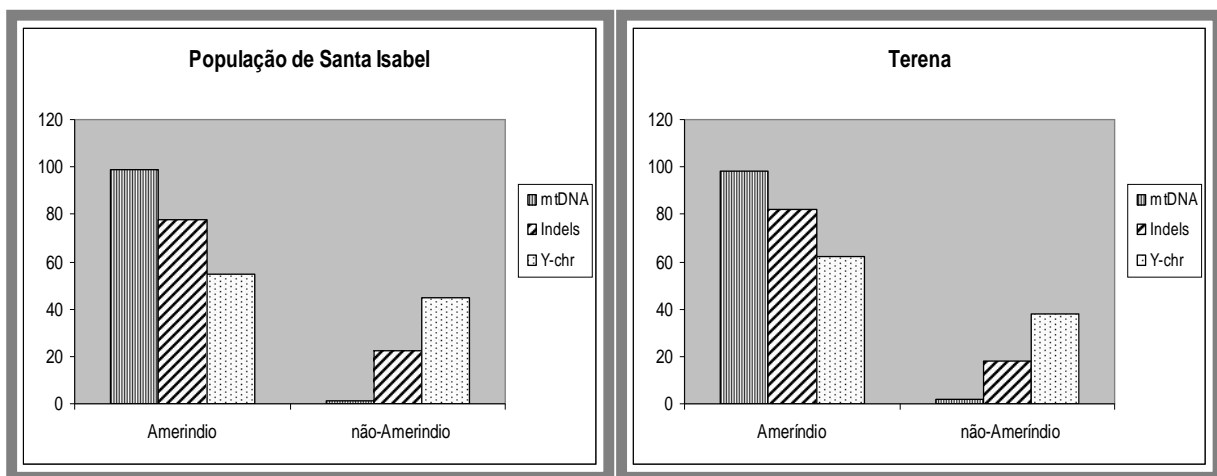


Figura 49-Representação gráfica da frequência de indivíduos que apresentam ancestralidade ameríndia e não ameríndia, que foram discriminadas através dos marcadores Indels, mtDNA e Y-SNPs.

Os resultados encontrados neste trabalho podem ajudar no entendimento das relações étnicas formadoras do povo brasileiro. As análises dos marcadores uniparentais em conjunto com os marcadores autossômicos, possibilitaram um maior entendimento da estrutura genética destas populações aqui estudadas.

5 CONCLUSÃO

- ✓ A análise do mtDNA mostrou a prevalência dos 4 haplogrupos A, B,C e D característicos de nativos sul - americanos, tendo sido verificadas em 98,7% na amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro e em 97,7% na população Terena. O que denota que não há fluxo gênico mediado por mulheres não indígenas para as aldeias. Tais haplogrupos mostraram distribuições diferenciadas, sendo o haplogrupo A o mais frequente nas duas populações.
- ✓ A genotipagem dos polimorfismos nos 5 *locus* analisados M242, M19, M3, M199 e M194, apontam que a maioria dos cromossomos Y (55%) da amostra populacional de Santa Isabel do Rio Negro, foram identificados como pertencentes ao haplogrupo Q1a3a*, principal haplogrupo nativo americano presente na América do Sul.
- ✓ Os fatores que podem ter influenciado nos resultados do cromossomo Y incluem, o padrão de migração diferenciado entre homens e mulheres e ou pequeno número da amostragem masculina de Santa Isabel do Rio Negro , na qual a deriva genética possa ter influenciado.
- ✓ A população de Santa Isabel do Rio Negro e a população Terena não apresentam diferenças significativas na distribuição das frequências dos haplogrupos mitocondriais ameríndios e com relação ao cromossomo Y observamos o mesmo, a não diferença significativa do haplogrupo Q1a3a* característico de ameríndio.
- ✓ Os parâmetros populacionais obtidos neste estudo são suficientes para caracterizar a comunidade Terena e a população de Santa Isabel do Rio Negro com um significativo grau de conservação da ancestralidade ameríndia, observado através dos marcadores uniparentais.

REFERÊNCIAS

Abdi H. The Bonferonni and Šidák Corrections for Multiple Comparisons. In- Salkind, N. Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks (CA)- Sage, 2007.

Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR. et al. The Phylogeny of The Four Pan-American Mtdna Haplogroups- Implications For Evolutionary And Disease Studies. Plos One. 2008 Mar; 3(3)- E1764.

Alvarez JC, Entrala C, Lorente JÁ, Lorente M, Fernandez-Rosado FI, Martinez-Espin E et al. Análisis de ADN mitocondrial Forénsica. 2001; 1(1)-40-59.

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Hum Genet. 2000 Jun; 67(2)-444-61.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981 Apr; 290(5806)- 457-64.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat. Genet. 1999 Oct; 23(2)- 147.

Anjos MJ, Carvalho M, Andrade L, Lopes V, Serra A, Batista L, et al. Individual genetic identification of biological samples- a case of an aircraft accident. Forensic Sci Int. 2004 Dec; 146-115–7.

Applied Biosystems. Using the SNaPshot® Multiplex System with the POP-7™ Polymer on Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers and 3130/3130xl Genetic Analyzers. Part Number 4367258 Rev. 2005. A. Disponível em www.appliedbiosystems.com. Acesso em 02 de junho de 2012.

Applied Biosystems. ABI Prims® Snapshot tm Multiplex Kit Protocol. P/N 4323357. 2001. Disponível em www.appliedbiosystems.com Rev. Acesso em 03 de Junho de 2012.

Arcot SS, Adamson AW, Lamerdin JE, Kanagy B, Deininger PL, Carrano AV, et al. Alu fossil relics-distribution and insertion polymorphism. Genome Res. 1996 Nov; 6(11)- 1084-92.

Arroyo-Pardo E, Gusmão L, Lopez-Parraa AM, Baeza C, Mesa, MS Amorim A. Genetic variability of 16 Y-chromosome STRs in a sample from Equatorial Guinea (Central Africa). Forensic Sci Int. 2005 Apr; 149(1)- 109–13.

Azevedo, Dalmo Almeida de. Contribuição ao estudo da constituição genética da população brasileira- análise de regiões polimórficas do cromossomo Y em uma

amostra populacional de Alagoas. 2010. 159f. Dissertação (Mestrado em Biociências). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith JM. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*. 1999 Dec; 286(5449)- 2524-5.

Balaresque PL, Ballereau SJ, Jobling MA. Challenges in human genetic diversity- demographic history and adaptation. *Hum Mol Genet*. 2007 Oct; 16 Spec No. 2- R134-9.

Bailliet G, Ramallo V, Muzzio M, García A, Santos MR, Alfaro EL, et al. Brief communication- Restricted geographic distribution for Y-Q* paragroup in South America. *Am J Phys Anthropol*. 2009 Nov; 140- 578–82.

Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A, Gan YY, Hodge JA, Hassan K, et al. Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations. *Genetics*. 1992 Jan; 130(1)-139-52.

Barbosa AB, da Silva LA, Azevedo DA, Balbino VQ, Mauricio-da-Silva L. Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas state, north-eastern Brazil. *J Forensic Sci*. 2008 Jan; 53(1)-142-6.

Beleza S, Gusmão L, Lopes A, Alves C, Gomes I, Giouzele M, et al. Micro-phylogeographic and demographic history of Portuguese male lineages. *Ann Hum Genet*. 2006 Mar; 70(2)-181-94.

Behar DM, Metspalu E, Kivisild T, Tzur S, Hadid Y, Yudkovsky G, et al. Counting the founders- the matrilineal genetic ancestry of the Jewish Diaspora. *PLoS One*. 2008 Apr; 3(4)-e2062.

Bianchi NO, Catanesi CI, Bailliet G, Martinez-Marignac VL, Bravi CM, Vidal-Rioja LB, et al. Characterization of ancestral and derived Y-chromosome haplotypes of new world native populations. *Am J Hum Genet*. 1998 Dec; 63(6)- 1862-71.

Bisso-Machado R. Vestígio do passado- a história ameríndia revelada através de marcadores genéticos uniparentais. Dissertação de mestrado. 2010.

_____, Jota MS, Ramallo V, Paixão-Côrtes VR, Lacerda DR, Salzano FM, Bonatto SL, Santos FR, Bortolini MC Distribution of Y-chromosome Q lineages in Native Americans. *Am J Hum Biol* 2011 Jul-Aug; 23(4)-563-6.

_____, Bortolini MC, Salzano FM. Uniparental genetic markers in South Amerindians. *Genet Mol Biol*. 2012 Apr; 35(2)-365-87.

Blanco-Verea A, Brion M, Sanchez-Diz P, Jaime JC, Lareu MV , Carracedo A. Analysis of Y chromosome lineages in native South American population. *Prog. Forensic Genet*. 2006; 1288 (11)- 222-4.

_____, Jaime JC, Brion M, Carracedo A. Y chromosome lineages in native american population. *Forensic Sci Int Genet.* 2010 Apr; 4(3)- 187-93.

Bobillo MC, Zimmermann B, Sala A, Huber G, Rock A, Bandelt HJ, et al. Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina- towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *Int J Legal Med.* 2010 Jul;124(4)-263-8.

Bonatto SL & Salzano FM. Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the new world. *Am J Hum Genet.* 1997a Dec; 61-(6)1413-23.

_____, _____. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci.* 1997b Mar; 94(5)- 1866-71.

Bortolini MC, Zago MA, Salzano FM, Silva-Junior WA, Bonatto SL, Silva MC, et al. Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations. *Hum Biol.* 1997 Apr; 69 (2)-141-59.

_____, Da Silva WA Junior, De Guerra DC, Remonato G, Mirandola R, Hutz MH, et al. African-derived South American populations- A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *Am J Hum Biol.* 1999;11(4)-551-563.

_____, Salzano FM, Bau CH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, et al. Y-chromosome biallelic polymorphisms and Native American population structure. *Ann Hum Genet.* 2002 Jul; 66(4)- 255-9.

_____, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SPK, Bau CHD, et al. Y-Chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet.* 2003 Sep; 73(3)- 524–39.

Bourgeois S, Yotova V, Wang S, Bourtoumieu S, Moreau C, Michalski R, et al. X Chromosome Lineages and the Settlement of the Americas. *Am J Phys Anthropol.* 2009 Nov;140 (3)-417- 28.

Brandstätter A, Salas A, Niederstätter H, Gassner C, Carracedo Á, et al. Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis.* 2006 Jul; 27(13)- 2541- 50.

Brión M. Y chromosome SNP analysis using the single-base extension- a hierarchical multiplex design. *Methods Mol Biol.* 2005; 297- 229-42.

Brisighelli F, Capelli C, Álvarez-Iglesias, Arredi VB, Baldassarri L, Boschi I, et al. Y-chromosomal and mitochondrial markers- A comparison between four population groups of Italy. *Progress in Forensic Genetics.* 2006 Apr; 1288- 91-3.

Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, et al. mtDNA haplogroup X- An ancient link between Europe western Asia and North America? *Am J Hum Genet.* 1998 Dec; 63(6)-1852-61.

Brown WM, George MJR, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979 Apr; 76(4)- 1967-71.

Budowle B & Brown BL (2001) El uso del análisis de AND en la identificación forense. *Forénsica.* 1-9-22.

Burger G, Gray MW, Franz Lang B. Mitochondrial genomes- anything goes. *Trends Genet.* 2003 Dec; 19(12)- 709-16.

Butler JM. Forensic DNA typing- biology, technology and genetics of STR markers. Academic Press /Elsevier. 2005.

Calafell F, Shuster A, Speed WC, Kidd JR, Kidd KK. Short Tandem Repeat polymorphism evolution in humans. *Eur J Hum Genet* 1998 Jan; 6(1)-38-39.

Callegari-Jacques SM, Salzano FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciênc. Cult.* 1999; 51-166-74.

Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, et al. Historical genetics- spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am Jour Hum Biology.* 2003 Nov Dec; 15- 824-34.

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 1987 Jan; 325(6099)- 31-36.

Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages *Am J Hum Genet.* 2001 Jan; 68(1)-281-6.

Carvalho BM, Bortolini MC, Santos SEB, Ribeiro dos Santos AKC. Mitochondrial DNA mapping of social-biological interactions in Brazilian Amazonian African-descendant populations. *Genet. Mol. Biol.* 2008; 31 (1)- 12-22.

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. *The History and Geography of Human Genes.* Princeton- Princeton Univ Press; 1994.

_____. Genes, peoples, and languages. *Proc Biol Sci.* 1997; 94(15)- 7719-24.

_____. The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet.* 1998 Feb; 14(2)- 60-5.

Ceppellini R, Curtoni ES, Mattiuz PL, Miggiano V, Scudeller G, Serra A. Genetics of leukocyte antigens. A family study of segregation and linkage. *Histocompatibility Testing.* 1967; 149-87.

Chen YS, Olckers A, Schurr TG, Kogelnik AM, Huoponen K, Wallace DC. MtDNA variation in the South African Kung and Khwe and their genetic relationships to other African populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 Apr; 66(4)- 1362-83.

Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, Wallace DC. Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am.J.Hum.Genet.* 1995 Jul; 57 (1)133-49.

Chong MD, Calloway CD, Klein SB, Orrego C, Buoncristiani MR. Optimization of a duplex amplification and sequencing strategy for the HVI/HVII regions of human mitochondrial DNA for forensic casework. *Forensic Sci Int.* 2005 Nov; 154(2-3)-137-48.

Cinnioglu C, King R, Kivisild T, Kalfoglu E, Atasoy S, Cavalleri GL, et al. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Hum. Genet.* 2004 Jan; 114 (2)-127–48.

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998 Dec; 8(12)- 1229-31.

Cruciani F, Santolamazza P, Shen P, MacAulay V, Moral PA, Modiano D, et al. A back migration from Asia to Sub-Saharan Africa is supported by high-resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 2002 May; 70(5)- 1197–14.

Curtin PD. *The Atlantic slave trade- a census.* The University of Wisconsin Press, Milwaukee. 1969.

Dias RA, Marincek R; Oliveira BM (2008) Santa Isabel do Rio Negro (AM)- Situação socioambiental de uma cidade no noroeste da Amazônia brasileira.

Domingues PM, Gusmao L, da Silva DA, Amorim A, Pereira RW, de Carvalho EF. Sub-Saharan Africa descendents in Rio de Janeiro (Brazil)- population and mutational data for 12 Y-STR loci. *Int J Legal Med.* 2007 May;121(3)-238-41.

Dornelles, C.L., Bonatto, S.L., De Freitas, L.B. & Salzano, F.M. () Is haplogroup X present in extant South American Indians? *American Journal of Physical Anthropology.*2005; 127-439-448.

Edwards, A., A. Civitello, H.A. Hammond C.T. Caskey. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. 1991; 49(4)- 746-56.

Elson JL, Andrews RM, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am J Hum Genet.* Jan 2001; 68 (1)- 145-53.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0)- an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online.* 2005;1- 47-50.

Eyre-Walker A, Awadalla P. Does human mtDNA recombine? *J Mol Evol.* 2001 Oct-Nov; 53 (4-5)-430-5.

_____, Smith NH, Smith JM. How clonal are human mitochondria? *Proc Biol Sci.* 1999 Mar; 266(1418)-477-83.

Fagundes NJR, Bonatto SL, Callegari-Jacques SM, Salzano FM. Genetic, geographic, and linguistic variation among South American Indians- possible sex influence. *Am J Phys Anthropol.* 2002 Jan; 117(1)-68-78.

_____, Kanitz R, Eckert R, Valls ACS, Bogo MR, et al. Mitochondrial Population Genomics Supports a Single Pre-Clovis Origin with a Coastal Route for the Peopling of the Americas. *Am J Hum Genet.* 2008a Mar; 82(3)- 583–92.

_____, Kanitz R, Bonatto SL. A Reevaluation of the Native American MtDNA Genome Diversity and Its Bearing on the Models of Early Colonization of Beringia. *PLoS ONE.* 2008b Sep; 3(3)-3157.

Feio-Dos-Santos AC, Carvalho BM, Batista dos Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK. Nucleotide variability of HV-I in admixed population of the Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci Int.* 2006;164(2-3)-276-7.

Finsterer J. Mitochondriopathies. *Eur.J.Neurol.* 2004; 11(3)-163-86.

Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. Origin and evolution of Native American mtDNA variation- a reappraisal. *Am J Hum Genet.* 1996 Oct; 59(4)-935-45.

Fowler JC, Burgoyne LA, Scott AC, Harding HW. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation – A concise review relevant to forensic biology. *J. Forensic Sci.* 1988 Sep; 33(5)- 1111-26.

Funai-2009. Plano estratégico 2009-2010- por uma gestão integrada e compartilhada.

Fundação Nacional de Saúde 2010- coordenação regional do paraná. Disponível em -www.funasa.gov.br.Acesso em nov 2012

Fuselli, S., Tarazona-Santos, E., Dupanloup, I., Soto, A., Luiselli, D. & Pettener, D. Mitochondrial DNA Diversity in South America and the Genetic History of Andean Highlanders. *Mol Biol Evol* 2003 Oct; 20(10)-1682- 1691.

García-Bour J, Pérez-Pérez A,  lvarez S, Fernández E, López- Parra AM, Arroyo-Pardo E, et al. Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra Del Fuego – Patagonia- Ancient mtDNA sequences and Y-chromosome STR characterization. *Am J Phys Anthropol.* 2004 Apr; 123(4)-361-70.

Gay -Vidal M, Moral P, Saenz-Ruales N, Gerbault P, Tonasso L, Villena M, et al. mtDNA and Y-chromosome diversity in Aymaras and Quechuas from Bolivia- Different stories and special genetic traits of the Andean Altiplano populations. *Am J Phys Anthropol.* 2011 Jun; 145(2)-215–30.

Golubenlo MV, Puzyrev VP, Saliukov VB, Kucher AN, Sanchat NO. Analysis of distribution of “mongoloid” haplogroups of mitochondrial DNA among indigenous population of the Tuva Republic. *Genetika*. 2001 Jun; 37(6)-831-9.

Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A. Intraspecific Nucleotide-Sequence Variability Surrounding the Origin of Replication in Human Mitochondrial-Dna. *Gene*. 1983 Jan-Feb; 21(1-2)-33-49.

Greenberg JH, Turner CG II, Zegura SL. The settlement of the Americas- a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr Anthropol*. 1986; 27(5)-477–97.

Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, et al. Origins and divergence of the Roma (Gypsies). *Am J Hum Genet*. 2001 Dec; 69(6)-1314-31.

Guidon N. Cliff Notes. *Nat Hist*. 1987; 8-6-12.

Gusmão L, Alves C, Beleza S, Amorim A. Forensic evaluation and population data on the new Y-STRs DYS434, DYS437, DYS438, DYS439 and GATA A10. *Int J Legal Med* . 2002 Jun; 116 (3)-139–147.

Gusmão, L., Sanchez-Diz, P., Calafell, F., Martin, P., Alonso, C. A., Álvarez-Fernandez, F., et al. Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites. *Hum Mutat*. 2005 Dec; 26(6), 520-528.

Gusmão A, Gusmão L, Gomes V, Alves C, Calafell F, Amorim A, et al. A perspective on the history of the Iberian Gypsies provided by phylogeographic analysis of Y-chromosome lineages. *Ann Hum Genet*. 2008 Mar; 72(2)-215-27.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*. 1991 Jul 18; 352(6332)-255-7.

Hagelberg E, Goldman N, Lió P, Whelan S, Schiefenhövel W, Clegg JB, et al. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc Biol Sci*. 1999 Mar; 266(1418)-485-92.

Hammer MF. A recent common ancestry human Y chromosomes. *Nature*. 1995 Nov; 378(6555)- 376-8.

_____, Karafet T, Rasanayagam A, Wood ET, Altheide TK, Jenkins T, Griffiths RC, Templeton AR, Zegura SL. Out of Africa and back again- nested cladistic analysis of human Y chromosome variation. *Mol. Biol. Evol*. 1998 Apr; 15(4)- 427-41.

_____, Karafet TM, Redd AJ, Jarjanazi H, Santachiara-Benerecetti S, Soodyall H, et al. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol. Biol. Evol*. 2001 Jul; 18 (7)- 1189–203.

Hammer MF, Chamberlain VF, Kearney VF, Stover D, Zhang G, Karafet T, Walsh B, Redd AJ. Population structure of Y chromosome SNP haplogroups in the United

States and forensic implications for constructing Y chromosome STR databases. *Forensic Sci. Int.* 2006 Dec; 164(1)- 45-55.

Hudjashov G, Kivisild T, Underhill PA, Endicott P, Sanchez JJ, Lin AA, Shen P, Oefner P, Renfrew C, Villems R, Forster P. Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May; 104(21)-8726-30.

Hummel S. *Ancient DNA typing- methods, strategies and applications-* Springer-Verlang Berlin Heidelberg, Germany. 2003.

Hertzberg M, Mickleson KN, Serjeantson SW, Prior JF, Trent RJ. An Asian-specific 9-bp deletion of mitochondrial DNA is frequently found in Polynesians. *Am J Hum Genet.* 1989 Apr; 44(4)-504-10.

Hulten E. *Outline of the History of Arctic and Boreal Biota During the Quaternary Period- Their Evolution During and After the Glacial Period As Indicated by the Equiformal Progressive Areas of Present Plant Species.* Cramer. 1972.

Hoffecker JF, Powers WR, Goebel T. The colonization of beringia and the peopling of the new world. *Science.* 1993 Jan 1; 59(5091)-46-53.

Hopkins DM. Cenozoic History of the Bering Land Bridge- The seaway between the Pacific and Arctic basins has often been a land route between Siberia and Alaska. *Science.* 1959 Jun; 9 (3362)-1519-28.

Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, Tajima K. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol.* 1993 Jan; 0(1)-23-47.

Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) *Censo Demográfico 2000- Características da População e dos Domicílios- Resultados do universo.* Rio de Janeiro, 2012.

Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), *Os indígenas no Censo Demográfico 2010.* Rio de Janeiro, 2012.

Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 2000 Dec; 408(6813)-708-13.

Jobling MA, Tyler-Smith C. Fathers and sons- the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 1995 Nov; 11(11)- 449-56.

_____, Pandya A, Tyler-Smith C. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.* 1997; 110(3)- 118-24.

_____, Y-chromosomal SNP haplotypes diversity in forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 2001 May 15; 118 (2-3)-158-62.

_____, Tyler-Smith C. The human Y chromosome- an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 2003; 4(8)- 598–612.

_____, Hurles ME, Tyler-Smith C. *Human Evolutionary Genetics- Origins, Peoples & Disease.* Garland Science. 2004.

Jorde LB, Bamshad M, Rogers AR. Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution. *Bioessays.* 1998 Feb;20(2)-126-36.

Jota MS, Lacerda DR, Sandoval JR, Vieira PP, Santos-Lopes SS, Bisso-Machado R, et al. A new subhaplogroup of native American Y-Chromosomes from the Andes. *Am J Phys Anthropol.* 2011 Dec; 146(4)-553-9.

Karafet TM, Xu L, Du R, Wang W, Feng S, Wells RS, Redd AJ, Zegura SL, Hammer MF. Paternal population history of East Asia- Sources, patterns, and micro evolutionary processes. *Am. J. Hum. Genet.* 2001 Sep; 69(3)- 615–28.

_____, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Zegura SL, Hammer MF. High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life. *Hum. Biol.* 2002 Dec; 74(6)- 761–89.

_____, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* 2008 May; 18(5)- 830-8.

Kayser M, Brauer S, Cordaux R, Casto A, Lao O, Zhivotovsky LA, et al. Melanesian and Asian origins of Polynesians- mtDNA and Y chromosome gradients across the Pacific. *Mol. Biol. Evol.* 2006 Nov; 23 (11)- 2234-44.

Ke Y, Su B, Song X, Lu D, Chen L, Li H, et al. African origin of modern humans in East Asia- a tale of 12,000 Y chromosomes. *Science.* 2001 May; 292(5519)-1151-3.

King TE, Parkin EJ, Swinfield G, Cruciani F, Scozzari R, Rosa A, et al. Africans in Yorkshire? The deepest-rooting clade of the Y phylogeny within an English genealogy. *Eur J Hum Genet.* 2007 Mar; 15(3)- 288–93.

Kivisild T, Villems R, Jorde LB, Bamshad M, Kumar S, Hedrick P, et al. Questioning Evidence For Recombination In Human Mitochondrial DNA. *Science.* Jun 2000; 288 (5473)-1931a.

_____, Rootsi S, Metspalu M, Mastana S, Kaldma K, Parik J, et al. The genetic heritage of the earliest settlers persists both in Indian tribal and caste populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2003 Feb; 72(2)- 313-22.

_____, Shen P, Wall D, Do B, Sung R, Davis K, et al. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics.* 2006 Jan; 172(1)-373-87.

Knoke D, Yang S. *Social network analysis.* 2nd ed Los Angeles- SAGE Publications. 2008.

Kloss-Brandstätter, A., Pacher, D., Schönherr, S., Weissensteiner, H., Binna, R., Specht, G. & Kronenberg, F. HaploGrep- a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum Mutat.* 2011 Jan- 32(1)- 25-32.

Kunkel TA, Loeb LA. Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 1981; 213(4509)- 765-7.

Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet.* 2001 Mar; 2(3)-207-16..

Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Chung U, Shin KJ. Mitochondrial DNA control region sequences in Koreans- identification of useful variable sites and phylogenetic analysis for mtDNA data quality control. *Int. J. Legal Med.* 2006 Jan; 120(1)- 5-14.

Li L, Li CT, Li RY, Liu Y, Lin Y, Que TZ, et al. Y. SNP genotyping by multiplex amplification and microarrays assay for forensic application. *Forensic Sci Int.* 2006 Oct; 162(1-3)- 74-9.

Luciano, GS. O índio brasileiro- o que você precisa saber sobre os povos indígenas no Brasil de hoje 227 pp. 2006. Disponível em- <<http://unesdoc.unesco.org/images/0015/001545/154565por.pdf>>. Acesso em- abr. 2012.

Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum. Genet.* 1997 Dec; 101(3)- 384.

_____, Wittig H, Weisser HJ, Heizmann J, Junge A, Dimo-Simonin N, et al. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci. Int.* 2000 Sep; 113 (1-3)- 97-101.

Manta FS, Silva DA, Sanchez-Diz P, Aguiar JI, Cabello PH, Carvalho EF. Terena Amerindian group autosomal STR data- comparison studies with other Brazilian populations. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(4)-4455-9.

_____, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol.* 2013 Jan;40(1)-94-8.

Marrero AR, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, et al. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol.* 2005 Jul-Aug;17(4)-496-506.

_____, Silva-Junior WA, Bravi CM, Hutz MH, Petzl-Erler ML, Ruiz-Linares A, et al. Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil. *Am J Phys Anthropol.* 2007 Feb;132(2)-301-10.

Martín P, García-Hirschfeld J, García O, Gusmão L, García P, Albarrán C, et al. A Spanish population study of 17-chromosome STR loci. *Forensic Sci. Int.* 2004; 139-231-5.

Mazières S, Guitard E, Crubézy E, Dugoujon JM, Bortolini MC, Bonatto SL, et al. Uniparental (mtDNA, Y-chromosome) polymorphisms in French Guiana and two related populations – Implications for the region's colonization. *Ann Hum Genet.* 2008 Jan; 72 (1)-145–56.

Meira M. Laudo Antropológico. Área Indígena “Baixo Rio Negro”. Belém-SCT/CNPq/MPEG. 1991.

Mengel-Jorgensen J, Sanchez JJ, Borsting C, Kirpekar F, Morling N. MALDI-TOF Mass Spectrometric Detection of Multiplex Single Base Extended Primers- a study of 17 Y-chromosome single-nucleotide polymorphisms. *Anal. Chem.* 2004; 76(20)-6039-45.

Miller S. A simples Salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 1988; 16 (3)- 1215.

Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan; 100 (1)-171-6.

Mitomap- A Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular and Mitochondrial Medicine and Genetics, University of California – Irvine (Irvine, CA). Disponível em <http://www.mitomap.org>. Acesso em 24 de junho de 2012.

Nasidze I, Ling EY, Quinque D, Dupanloup I, Cordaux R, Rychkov S, et al. Mitochondrial DNA and Y-chromosome variation in the Caucasus. *Ann Hum Genet.* 2004 May; 68(3)-205-21.

Nass, MM, Nass S. Intramitochondrial fibers with dna characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J.Cell Biol.* 1963; 19- 593-11.

Nielsen R. Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms. *Genet.* 2000 Feb; 154(2)-931-42.

Nilsson M, Andréasson-Jansson H, Ingman M, Allen M. Evaluation of mitochondrial DNA coding region assays for increased discrimination in forensic analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2008 Jan; 2(1)-1-8.

Nunes AC, Silva DA, Teixeira MA, Nunes DD, Lopes CM, Netto OR, et al. Y chromosome comparative analysis of Rondonia with other Brazilian populations. *Leg Med (Tokyo).* 2011 May;13(3)-161-3.

Onofri V, Alessandrini F, Turchi C, Pesaresi M, Buscemi L, Tagliabracci A. Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int.* 2006 Feb; 157(1)-23-35.

O'rourke DH. & Raff JÁ. The Human Genetic History of the Americas- The Final Frontier. *Curr biol.* 2010 Feb;20(4)-R202-R207.

Oliveira AG. O mundo transformado- um estudo da cultura de fronteira no Alto Rio Negro. Belém- Museu Paraense Emílio Goeldi.1995.

Oven MN e Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mut.* 2008 Feb; 1039 (30)-386-94.

Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005; 6-165-83.

Palacín M, Moraes MAS. História de Góias. UCG Goiânia/Góias–Brasil. 1994.

Palencia L, Valverde L, Alvarez A, Caine LM, Cardoso S, Alfonso-Sanchez MA, et al. Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil)- predominance of the European input. *Int J Legal Med.* 2010 Jul;124(4)-331-6.

Paneto GG, Kohnemann S, Martins JA, Cicarelli RM, Pfeiffer H. A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. *Mitochondrion.* 2011 Mar;11(2)-296-302.

Pena SDJ, Santos FR, Bianchi NO, Bravi CM, Carnese FR, Rothhammer F, et al. A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. *Nature Genetics.* 1995 Sep; 11(1)- 15-16

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan; 100(1)-177-82.

Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, et al. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol.* 2009 Jan; 19(1)-1-8.

_____, Angerhofer N, Pala M, Olivieri A, Lancioni H, Hooshiar Kashani B, et al. The initial peopling of the Americas- A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Res.* 2010 Sep; 20(9)-1174-9.

Pereira NOM, Azevedo MM, Santos RV. Perfil demográfico esocioeconômico das pessoas que se autodeclararam indígenas nos censos demográficos de 1991 e 2000. In- PAGLIARO, H.; AZEVEDO, M. M.; SANTOS, R.V. (Org.). Demografia dos povos indígenas no Brasil. Rio de Janeiro- Ed. FIOCRUZ; Campinas- Associação Brasileira de Estudos Populacionais - ABEP. 2005.

Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L. Insertion/deletion polymorphisms- A multiplex assay and forensic applications. *Forensic Sci Int- Genetics Supplement Series.* 2009a; 2(1)- 513-5.

Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C. Santos SEB, Amorim A, et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One.* 2012; 7 (1)-e29684.

- Pereira L, Prata MJ, Amorim A. Diversity of mtDNA lineages in Portugal- not a genetic edge of European variation. *Annals of human genetics*. 2000 Nov; 64(6)-491-506.
- Piganeau G, Eyre-Walker A. A reanalysis of the indirect evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Heredity*. 2004; 92(4)-282-8.
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians- a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006; 62(4)- 190-5.
- Plaza S, Salas A, Calafell F, Corte-Real F, Bertranpetit J, Carracedo A, et al. Insights into the western Bantu dispersal- mtDNA lineage analysis in Angola. *Human genetics*. 2004;115(5)-439-47.
- Quintana-Murci L, Krausz C, McElreavey K. The human Y chromosome- function, evolution and disease. *Forensic Sci Int*. 2001 May 15; 118(2-3)-169-81.
- Ribeiro D. O povo Brasileiro- a formação e o sentido do Brasil. Companhia das Letras, São Paulo.1995.
- Rosa A, Ornelas C, Jobling MA, Brehm A, Villems R. Y-chromosomal diversity in the population of Guinea-Bissau- a multiethnic perspective. *BMC Evol Biol*. 2007 Jul; 7-12.
- Roosevelt A. Amazonian Indians from Prehistory to the Present. Anthropological perspectives. Arizona, The University of Arizona press. 1994; 421.
- Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, et al. Reconstructing Native American population history. *Nature*. 2012 Aug; 488(7411)-370-4.
- Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol*. 1988; 136(3)-507-13.
- Rojas W, Parra MV, Campo O, Caro MA, Lopera JG, Arias W, Duque C, Naranjo A, García J, Vergara C, et al. Genetic makeup and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am J Phys Anthropol*. 2010;143- 13–20.
- Rootsi S, Magri C, Kivisild T, Benuzzi G, Help H, Bermisheva M, et al. Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am. J. Hum. Genet*. 2004; 75(1)- 128-37.
- _____, Zhivotovsky LA, Baldovic M, Kayser M, Kutuev IA, Khusainova R, et al. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *Eur. J. Hum. Genet*. 2007; 15- 204–11.

- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*. 2003 Jun; 423(6942)- 873-6.
- Salas A, Richards M, De Lafe T, Lareu MV, Sobrino B, Sanchez-Diz P. et al. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet*. 2002 Nov; 71(5)-1082-11.
- _____, Acosta AA, Ivarez-Iglesias V, Cerezo M, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. The mtDNA ancestry of admixed Colombian populations. *Am J Hum Biol*. 2008a; 20-584–91.
- _____, Jaime JC, Alvarez-Iglesias V, Carracedo A. Genderbias in the multiethnic genetic composition of central Argentina. *J Hum Genet*. 2008b; 53(7)- 662–74.
- Salzano FM, Freie-Maia N. Populações brasileiras, aspectos demográficos genéticos e antropológicos. São Paulo- Companhia Editora Nacional. 1967.
- _____. Molecular variability in Amerindians- widespread but uneven information. *Anais da Acad. Brasil. Ciênc*. 2002; 74(2)-223-63.
- _____, Bortolini MC Evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge. 2002.
- Sambrook M, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning- a laboratory manual. 1989.
- Sanchez JJ, Borsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs - a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int*. 2003; 137(1)-74-84.
- Sandoval K, Buentello-Malo L, Penaloza-Espinosa R, Avelino H, Salas A, Calafell F, et al. Linguistic and maternal lgenetic diversity are not correlated in Native Mexicans. *Hum Genet*. 2009 Oct;126(4)- 521–31.
- Sans M. Admixture studies in Latin America- from the 20th to the 21st century. *Hum Biol*. 2000 Feb; 72(1)-155-77.
- Santos, Suellen Bernado dos. Estudo da ancestralidade maternal da população do Rio de Janeiro- Análise do DNA mitocondrial. 2012. 83f. Dissertação (mestrado em Biociências). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC, Meyer D, Zago MA. Multiple founder haplotypes of mitochondrial DNA in Amerindians revealed by RFLP and sequencing. *Ann Hum Genet*. 1996b Jul; 60(4)- 305-19.
- _____, Rodrigues JD, Ribeiro-dos-Santos AKC, Zago MA. Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon region as revealed by mtDNA and Y DNA. *Am J Phys Anthropol*. 1999 Jun; 109-175-80.

Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C, Pena SD, Schanfield M, Leonard WR, et al. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 1999 Feb; 64(2)-619-28.

Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion deletion (INDEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010 Feb; 31 (2)- 184-90.

_____, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel *Hum Mutat.* 2010. Feb;31(2)-184-90.

Seielstad M, Bekele E, Ibrahim M, Toure A, Traore M. A view of modern human origins from Y chromosome microsatellite variation. *Genome Res.* 1999 Jun; 9 (6)-558-67.

_____, Yuldasheva N, Singh N, Underhill P, Oefner P, Shen P, et al. A novel Y-chromosome variant puts an upper limit on the timing of first entry into the Americas. *Am J Hum Genet.* 2003 Sep; 73(3)-700–5.

Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE, et al. The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans- A Y chromosome perspective. *Science.* 2000 Nov; 290(5494)- 1155–9.

_____, Santachiara-Benerecetti AS, Falaschi F, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA, Santachiara-Benerecetti AS, et al. Ethiopians and Khoisan share the deepest clades of the human Y-chromosome phylogeny. *Am. J. Hum. Genet.* 2002 Jan; 70-265–8.

_____, Magri C, Benuzzi G, Lin AA, Al-Zahery N, Battaglia V, et al. Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J- Inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean area. *Am. J. Hum. Genet.* 2004 May; 74-1023–34.

Scheinfeldt L, Friedlaender F, Friedlaender J, Latham K, Koki G, Karafet T, et al. Unexpected NRY chromosome variation in Northern Island Melanesia. *Mol. Biol. Evol.* 2006 Aug; 23(8)- 1628-41.

Scholotterer C. Microsatellites. In- Hoelzel AR (ed). *Molecular genetics analysis of population- A practical Approach.* Oxford University Press, New York, NY. 1998; 237-61.

Schroeder KB, Schurr TG, Long JC, Rosenberg NA, Crawford MH, Tarskaia LA, et al. private allele ubiquitous in the Americas. *Biol Lett.* 2007 Apr;3 (2)-218-23.

_____, Jakobsson M, Crawford MH, Schurr TG, Boca SM, Conrad DF, et al. Haplotypic background of a private allele at high frequency in the Americas. *Mol Biol Evol.* 2009 May; 26(5)-995-1016.

Schultes T, Hummel SM, Herrmann B. Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material. *Hum. Gen.* 1998 Feb; 104(2)- 164-166.

Schuch MEJ (1995). Xaray e Chané- índios frente a expansão espanhola e portuguesa no alto Paraguai. Dissertação mestrado em história- Instituto Anchieta de Pesquisas/UNISINOS.

Schumm JW, Lins AM, Micka KA, Sprecher CJ, Rabbach DR, Bacher JW. Automated fluorescent detection of STRs multiplexes- Development of the genePrint™ PowerPlex™ and FFFL multiplexes for forensic and Paternity Applications. *First Europ. Sympos. Hum. Identif.* 1997; 90-104.

Schurr TG. The peopling of the New World- Perspectives from molecular anthropology. *Annual Review of Anthropology.* 2004; 33- 551-583.

Schurr TG, Wallace DC. Mitochondrial DNA diversity in Southeast Asian populations. *Hum Bio.* 2002 Jun; 74(3)-431-52.

_____, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Ite'emen- population replacement in the Okhotsk Sea-Bering Sea region during the Neolithic. *Am J Phys Anthropol.* 1999 Jan; 108(1)-1-39.

Schwartz M, Vissing J. New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct; 310(2)-247-51.

Scozzari R, Cruciani F, Santolamazza P, Sellitto D, Cole DEC, Rubin LA, et al. mtDNA and Y chromosome-specific polymorphisms in modern Ojibwa- Implications about the origin of their gene pool. *Am J Hum Genet.* 1997 Jan; 60(1)- 241- 44.

Seielstad MT, Hebert JM, Lin AA, Underhill PA, Ibrahim M, Vollrath D, et al. Construction of human Y-chromosomal haplotypes using a new polymorphic A to G transition. *Hum Mol Genet.* 1994 Dec; 3(12)-2159-61.

Sengupta S, Zhivotovsky LA, King R, Mehdi SQ, Edmonds CA, Chow CE, et al. Polarity and temporality of high-resolution Y-chromosome distributions in India identify both indigenous and exogenous expansions and reveal minor genetic influence of Central Asian pastoralists. *Am. J. Hum. Genet.* 2006 Feb; 78(2)- 202- 21.

Silva DA, Carvalho E, Costa G, Tavares L, Amorim A, Gusmao L. Y-chromosome genetic variation in Rio de Janeiro population. *Am J Hum Biol.* 2006 Nov-Dec; 18(6)- 829-37.

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003 Jun; 423(6942)- 825-822.

Su B, Xiao J, Underhill P, Deka R, Zhang W, Akey J, et al. Y-chromosome evidence for a northward migration of modern humans into Eastern Asia during the last Ice Age. *Am. J. Hum. Genet.* 1999 Dec; 65(6)- 1718-24.

_____, Jin L, Underhill P, Martinson J, Saha N, Mc Garvey ST, et al. Polynesian origins- Insights from the Y chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Jul; 97(15)- 8225–28.

Strachan T, Read A. *Human molecular genetics.* 4^a ed. Nova Iorque- Garland Science; 2010.

Stoneking M, Jorde LB, Bhatia K, Wilson AC. Geographic-Variation in Human Mitochondrial-Dna from Papua-New-Guinea. *Genetics.* 1990 Mar; 124 (3)- 717-33.

Sturrock K, Rocha J. A Multidimensional Scaling Stress Evaluation Table Field Methods. 2000;12- 49-60.

Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One.* 2007 Sep; 2(9)-e829.

Tarazona-Santos E, Carvalho-Silva DR, Pettener D, Luiselli D, De Stefano GF, Labarga CM, et al. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity- evidence from the Y chromosome. *Am J Hum Genet.* 2001 Jun; 68(6)-1485-96.

Tarskaia L, Gray RR, Burkley B, Mulligan CJ. Genetic variation at the mitochondrial DNA 9-bp repeat locus in the Sakha of Siberia. *Hum Biol.* 2006 Apr; 78(2)-179-98.

Thyagarajan B, Padua RA, Campbell C. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J Biol Chem.* 1996 Nov; 271(44)-27536-43.

Thomson R, Pritchard JK, Shen P, Oefner PJ, Feldman MW. Recent common ancestry of human Y chromosomes- evidence from DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun; 97(13)-7360-5.

Torrioni A, Bandelt HJ, D'Urbano L, Lahermo P, Moral P, Sellitto D, et al. mtDNA analysis reveals a major late paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am J Hum Genet.* 1998 May; 62 (5)-1137- 52.

_____, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML and Wallace DC. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics.* 1996 Dec; 144(4)- 1835- 50.

_____, Miller JA, Moore LG, Zamudio S, Zhuang J, Droma T, et al. Mitochondrial-Dna Analysis in Tibet - Implications for the Origin of the Tibetan Population and Its Adaptation to High-Altitude. *Am J Phys Anthropol.* 1994a Feb; 93(2)-189-99.

_____, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC. mtDNA and the origin of Caucasians- identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of

which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet.* 1994b Oct;55(4)-760-76.

Torrioni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, et al. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet.* 1993a Sep;53(3)-563-90.

_____, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, et al. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics.* 1992 Jan;130(1)-153-62.

_____, Sukernik RI, Schurr TG, Starikorskaya YB, Cabell MF, Crawford MH, et al. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am J Hum Genet.* 1993 Sep;53(3)-591-608.

Underhill P, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, et al. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 1997 Oct; 7(10)- 996-05.

_____, Lin AA, Shen P, Mirazon LM, Foley RA, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann. Hum. Genet.* 2001 Jan; 65(1)- 43–62.

_____, Shen P, Lin A. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat. Genet.* 2000 Nov; 26(3)- 358–61.

Toscanini U, Gusmão L, Berardi G, Gomes V, Amorim A, Salas A, et al. Male lineages in South American Native Groups- Evidence of M19 Traveling South. *Am J Phys Anthropol.* 2011 Oct; 146(2)-188-96.

Vargas VLFV. A construção do território Terena (1870-1966)- uma sociedade entre a imposição e opção. Dissertação de mestrado em história-UFMS. 2003.

Van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat.* 2009 Feb; 30(2)-E386-94

..

Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science.* 1991 Sep; 253 (5027)- 1503-07.

Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet.* 1995 Sep; 57(2)-201-23.

Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, et al. Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet.* 2007 Nov; 3 (11)-e185.

Watson E, Forster P, Richards M, Bandelt HJ. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am J Hum Genet.* 1997 Sep; 61(3)- 691-04.

Wetton JH, Tsang KW, Khan H. Inferring the population of origin of DNA evidence within the UK by allele-specific hybridization of Y-SNPs. *Forensic Sci Int.* 2005 Aug; 152 (1) 45-53.

Wittas HW, Zawick P. Mitochondrial DNA And Human Evolution- A Review. *Anthropological Review.* 2004; 67- 97-110.

Wood ET, Stover DA, Ehret C, Destro-Bisol G, Spedini G, McLeod H, et al. Contrasting patterns of Y chromosome and mtDNA variation in Africa- Evidence for sex-biased demographic processes. *Eur. J. Hum. Genet.* 2005 Jul; 13(7)- 867–76.

Y Chromosome Consortium. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 2002 Feb; 12(2)- 339–348.

Yao YG, Kong QP, Bandelt HJ, Kivisild T, Zhang YP. Phylogeographic differentiation of mitochondrial DNA in Han Chinese. *Am J Hum Genet.* 2002 Mar;70(3)-635-51.

Yakes MF and Van Houten, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 Jan; 94(2)-514-9.

Yu M, Zhang Y, Xue Y, Chen F, Wang Q, Huang X, Wang B, Yu Y, Liu A, Ma L, Shi R, Lu F, Shi Z, Zhang Y, Cheng W, Ai Q, Xu F, Huang C, Chen B, Yang H, Kang X, Sun Y, Zhang G, Li P, Fu S. A new haplogroup pattern displayed in Fujian Han in China. *J Hum Genet.* 2002;47(2)-95-8.

Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LV, Hammer MF. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol. Biol. Evol.* 2004 Jan; 21-164–175.