



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

Anna Beatriz Rodrigues Gonçalves

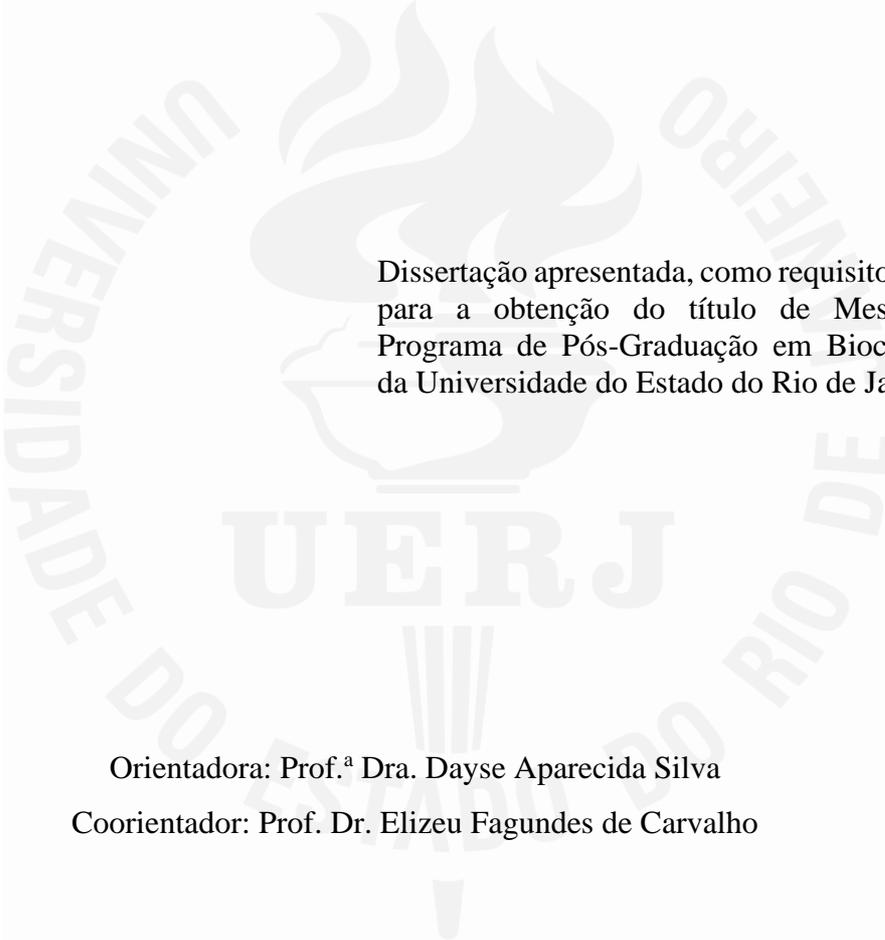
**Análise genética das linhagens matrilineas de indivíduos maranhenses
para fins de bancos de dados populacional e forense**

Rio de Janeiro

2020

Anna Beatriz Rodrigues Gonçalves

Análise genética das linhagens matrilineas de indivíduos maranhenses para fins de bancos de dados populacional e forense



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

Orientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida Silva

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Rio de Janeiro

2020

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

G635 Gonçalves, Anna Beatriz Rodrigues.
Análise genética das linhagens matrilineas de indivíduos maranhenses para fins de bancos de dados populacional e forense/ Anna Beatriz Rodrigues Gonçalves. – 2020.

112f.

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

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho.

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

1. Genética de populações - Teses. 2. População – Aspectos genéticos - Teses. 3. Polimorfismo (Genética) - Teses. 4. DNA Mitocondrial. I. Silva, Dayse Aparecida da. II. Carvalho, Elizeu Fagundes de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Humana e Experimental. IV. Título.

CDU 575.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 – 6382

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

Assinatura

Data

Anna Beatriz Rodrigues Gonçalves

Análise genética das linhagens matrilineas de indivíduos maranhenses para fins de bancos de dados populacional e forense

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

Aprovada em 10 de março de 2020.

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cynthia Chester Cardoso

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Leonor Gusmão

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente aos meus pais, Fernando Antonio e Rosa Maria, e meu irmão, Bruno Mateus. Vocês são meu suporte, minha força e a razão por trás de todas as minhas conquistas.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva, minha admiração e agradecimento pela honrosa oportunidade de trabalhar contigo. Obrigada por sua orientação e pelos seus ensinamentos, os quais me fizeram progredir muito durante a trajetória que acompanhou este trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, e a Prof.^a Dra. Marília de Brito Gomes, meu agradecimento por terem oferecido todo o apoio para a realização deste estudo.

A Prof.^a Dra. Leonor Gusmão, agradeço por todos os ensinamentos, apoio, disponibilidade e contribuições.

A Dra. Tatiana Nogueira, Silvia Loiola, Dra. Filipa Simão e Dra. Cassandra Calloway, minhas mentoras quanto aos métodos de análise do DNA mitocondrial.

Aos colegas do Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) e do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), obrigada pelo apoio e amizade de cada um.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da minha bolsa de estudos.

Todos somos uma mistura completa; e, ao mesmo tempo, somos todos aparentados. Cada gene pode traçar sua própria jornada até um ancestral comum diferente. Esta é uma herança bastante extraordinária que todos nós recebemos de pessoas que viveram antes de nós.

Bryan Sykes

RESUMO

GONÇALVES, Anna Beatriz Rodrigues. *Análise genética das linhagens matrilineas de indivíduos maranhenses para fins de bancos de dados populacional e forense*. 2020. 112f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A análise do DNA mitocondrial humano (mtDNA) permite a caracterização da ancestralidade matrilinear de uma população. Além disso, a análise deste genoma possui potencial para contribuir em estudos clínicos e para fins de identificação de indivíduos. Nesse sentido, é evidente a importância da informação genética presente neste marcador para estudos populacionais, clínicos e forenses. Devido às particularidades de cada população, existe a necessidade de estudos acerca da herança mitocondrial de cada localidade para a aplicação do mtDNA como um marcador genético. No entanto, os dados a respeito da herança mitocondrial da população brasileira ainda são escassos, não havendo informações disponíveis em bancos de dados genéticos sobre as populações que compõem alguns Estados do país, como o Maranhão, localizado na região Nordeste. Assim, este estudo teve como objetivo a análise das linhagens maternas que constituem uma amostra de indivíduos oriundos do Estado Brasileiro do Maranhão, de modo a colaborar com estudos de ancestralidade e expandir o banco de dados genético de mtDNA. Através do sequenciamento da região controle do mitogenoma, foram analisados 151 indivíduos nascidos no Maranhão. Por meio do método de Terminação em Cadeia foi possível identificar as variações que caracterizam os haplótipos e os haplogrupos. Como resultado, foram encontrados 144 haplótipos únicos e 65 haplogrupos diferentes. Além disso, foi possível estabelecer os índices de diversidade molecular e a linhagem materna dos indivíduos pertencentes à amostra maranhense. Os altos valores de diversidade molecular e baixo valor de probabilidade de coincidência aleatória (RMP) indicaram alta diversidade populacional. No tocante da linhagem materna, o principal componente foi o nativo americano, correspondendo a 45%, seguido por 38,5% de contribuição africana, 13,85% europeia e 2,65% asiática. O haplogrupo mais frequente encontrado nesta amostra foi L3, seguido de B4. Esses são os primeiros resultados sobre a ancestralidade materna de uma população do Maranhão, e indicam uma importante herança materna indígena e africana. Estas possivelmente estão relacionadas a presença das tribos indígenas nativas do território brasileiro e a intensa migração africana para o Brasil devido ao tráfico de escravos, à época em que o Maranhão era um destino de desembarque das rotas marítimas. Ao comparar com estes resultados com os dados de outras populações brasileiras encontrados em outros estudos, os resultados de diferenciação populacional e F_{ST} indicaram maiores diferenças entre Maranhão e o sul do Brasil, e menores diferenças em relação ao sudeste brasileiro, o que pode estar relacionado com questões acerca da colonização e diferentes padrões de migração existentes entre as localidades. Assim, o presente estudo apresenta informações inéditas acerca da composição genética matrilinea para a formação da população maranhense. Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam a importância da continuidade do estudo do genoma mitocondrial para aplicações em âmbito clínico, populacional e forense.

Palavras chave: DNA mitocondrial. Ancestralidade Materna. Genética de Populações. Maranhão. Nordeste Brasileiro. População Brasileira.

ABSTRACT

GONÇALVES, Anna Beatriz Rodrigues. *Genetic analysis of maternal lineages from Maranhão individuals for population databases and forensic purposes*. 2020. 112f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The analysis of human mitochondrial DNA (mtDNA) allows the characterization of a population's matrilineal ancestry. Besides, the analysis of this genome has the potential to contribute to clinical studies and human identification. On this wise, this genetic information has importance for population, clinical, and forensic studies. Due to the particularities of each population, mitochondrial genome information is needed for the application of mtDNA as a genetic marker. However, genetic data of mitochondrial inheritance of the Brazilian population is still limited, with no information available in genetic databases on some states in the country, as Maranhão, located in the Brazilian northeast. Thus, this study aims to analyze the maternal lineages that constitute a sample of individuals from Brazilian State Maranhão, in order to collaborate with ancestry studies and expand the mtDNA genetic database. Through the sequencing of the mtDNA complete control region, we analyzed 151 individuals who were born in Maranhão. As a result, the identification of genetic variations by the termination chain method allowed the characterization of different haplotypes and haplogroups. As a result, 144 unique haplotypes and 65 different haplogroups were found. Besides, it was possible to establish the molecular diversity indices and the maternal lineages. High molecular diversity values and low random match probability (RMP) indicated high population diversity. Regarding the maternal lineage, the main component was Native American, corresponding to 45%, followed by 38.5% of African contribution, 13.85% European, and 2.65% Asian. The most frequent haplogroup found in this sample was L3, followed by B4. These are the first data on the maternal ancestry of a population from Maranhão, and the results indicated an important indigenous and African maternal heritage. These results are possibly related to the presence of native indigenous tribes in the Brazilian territory and the intense African migration to Brazil due to the slave trade when Maranhão was a destination for the disembarking of slave ships. When comparing these results with data from other Brazilian populations, the results of population differentiation and F_{ST} indicated greater differences between Maranhão and southern Brazil and smaller differences compared with the southeast Brazilian region, which may be related to colonization and different migration patterns between the localities. Thus, this study shows unprecedented information about the matrilineal genetic composition for the formation of the population of Maranhão. The results obtained in this research reinforce the importance of continuing to study the mitochondrial genome for clinical, population, and forensic applications.

Keywords: Mitochondrial DNA. Maternal Ancestry. Population Genetics. Maranhão. Brazilian Northeast. Brazilian Population.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura mitocondrial	19
Figura 2 –	Representação esquemática do mtDNA, evidenciando os elementos presentes na região controle e a estrutura do D-loop.....	22
Figura 3 –	Esquema representando o processo de replicação do mtDNA de mamíferos ..	23
Figura 4 –	Representação dos tipos de mutação de sítio único	24
Figura 5 –	Exemplos de polimorfismos	27
Figura 6 –	Esquema representando o mtDNA humano, evidenciando a região controle do mtDNA e HV1, HV2 e HV3.....	28
Figura 7 –	Tipos de heteroplasmia	30
Figura 8 –	Modelo esquemático representando o princípio do Método de Terminação em Cadeia (Sequenciamento de Sanger) e o resultado final do sequenciamento ...	33
Figura 9 –	Polimorfismos encontrados em relação a rCRS.....	35
Figura 10 –	Esquemas demonstrando os movimentos migratórios e a formação de novas populações segundo a teoria “ <i>Out of Africa</i> ”.....	38
Figura 11 –	Árvore contendo os haplogrupos mitocondriais principais e suas respectivas origens geográficas	40
Figura 12 –	Rotas marítimas do tráfico de escravos africanos para o Brasil	46
Figura 13 –	Distribuição de povos indígenas no nordeste brasileiro	47
Figura 14 –	Mapa evidenciando a região nordeste brasileira, o Estado do Maranhão e os locais de proveniência das amostras analisadas.....	50
Figura 15 –	Condições das reações de amplificação por PCR.....	51
Figura 16 –	Condições das reações de sequenciamento.....	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Códigos estabelecidos pela IUPAC para representação de heteroplasmia em sequências de mtDNA.....	36
Quadro 2 –	Lista de primers utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento, sua orientação e sequência de bases nucleotídicas.....	51
Quadro 3 –	Reagentes utilizados nas reações de amplificação por PCR e as devidas quantidades utilizadas por amostra	51
Quadro 4 –	Reagentes utilizados nas reações de sequenciamento e as devidas quantidades utilizadas por amostra	53
Gráfico 1 –	Macrohaplogrupos de mtDNA que constituem a amostra maranhense.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização da amostra maranhense de acordo com os parâmetros listados para RC-mtDNA e para cada segmento de desta região.....	56
Tabela 2 –	Número de amostras que apresentam polimorfismos entre as posições listadas	56
Tabela 3 –	Índices de diversidade molecular obtidos para a análise de RC-mtDNA da amostra referente ao Estado do Maranhão em comparação com dados de outros estudos para estados brasileiros	57
Tabela 4 –	Índices de diversidade molecular obtidos ao analisar HVR na amostra maranhense em comparação com dados de outros estudos para regiões brasileiras	58
Tabela 5 –	Haplogrupos de mtDNA de origem ameríndia encontrados na amostra maranhense	59
Tabela 6 –	Haplogrupos de mtDNA de origem africana encontrados na amostra maranhense	60
Tabela 7 –	Frequência (%) dos haplogrupos de mtDNA observados na amostra do Maranhão, em regiões do Brasil e outros Estados do Nordeste.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AIMs	Marcadores informativos de Ancestralidade (<i>Ancestry Informative Markers</i>)
AL	Alagoas
AME	Ameríndio
AFR	Africano
ASN	Asiático
ATP	Adenosina Trifosfato
BA	Bahia
C	Citosina
CE	Ceará
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeos trifosfato
DF	Distrito Federal
D-Loop	<i>Displacement Loop</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDNAP	<i>European DNA Profiling Group</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EMPOP	EDNAP <i>mtDNA Population Database</i>
ES	Espírito Santo
EUR	Europeu
FUNAI	Fundação Nacional do Índio
G	Guanina
GTP	Guanosina trifosfato
H	Diversidade haplotípica
HG	Haplogrupo
HSP	Promotor da Cadeia Pesada (<i>Heavy Strand Promoter</i>)
HUPE-UERJ	Hospital Universitário Pedro Ernesto-Universidade do Estado do Rio de Janeiro
HU-UFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
HV1	Região Hipervariável 1 (<i>Hypervariable region 1</i>)
HV2	Região Hipervariável 2 (<i>Hypervariable region 2</i>)
HV3	Região Hipervariável 3 (<i>Hypervariable region 3</i>)

HVR	Regiões Hipervariáveis (<i>Hypervariable regions</i>)
IBEx	Instituto de Biologia do Exército
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.e.	<i>id est</i>
ISFG	<i>International Society for Forensic Genetics</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Desequilíbrio de Ligação (<i>Linkage disequilibrium</i>)
LSP	Promotor da Cadeia Leve (<i>Light Strand Promoter</i>)
MA	Maranhão
μL	Microlitro
μM	Micromolar
MRCA	Ancestral Comum Mais Recente (<i>Most Recent Common Ancestor</i>)
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
nDNA	DNA nuclear
NE	Nordeste brasileiro
NGS	Sequenciamento de Próxima Geração (do inglês <i>Next Generation Sequencing</i>)
NMDP	Número Médio de Diferenças Pareadas (<i>Mean number of pairwise differences</i>)
O _H	Origem de replicação da fita H
O _L	Origem de replicação da fita L
PB	Paraíba
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Pernambuco
PI	Piauí
Pol γ	DNA polimerase gama
POLRMT	RNA polimerase mitocondrial
PR	Paraná
RC-mtDNA	Região controle do DNA mitocondrial
rCRS	Sequência Referência de Cambridge Revisada (<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i>)
RFU	Unidades relativas de fluorescência (do inglês, <i>relative fluorescence unit</i>)
RJ	Rio de Janeiro

RMP	Probabilidade de Coincidência Aleatória (<i>Random Match Probability</i>)
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SE	Sudeste brasileiro
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STR	Repetição Curta em Tandem (do inglês, <i>Short Tandem Repeat</i>)
SWGAM	<i>Scientific Working Group on DNA Analysis Methods</i>
T	Timina
TAS	Sítio de Terminação da Replicação
TFAM	Fator de Transcrição Mitocondrial A
tRNA	RNA transportador
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1.	REVISÃO TEÓRICA	19
1.1	Origem, estrutura e funções das mitocôndrias	19
1.2	O genoma mitocondrial humano e suas particularidades	21
1.2.1	<u>Mecanismos de replicação e transcrição do genoma mitocondrial</u>	23
1.2.2	<u>O mecanismo de herança do mtDNA em mamíferos</u>	24
1.3	Princípios de variabilidade genética	25
1.4	Características polimórficas da região controle do mtDNA	27
1.4.1	<u>Heteroplasmia</u>	29
1.5	Técnicas aplicadas à análise genética do mtDNA	30
1.5.1	<u>Nomenclatura de polimorfismos encontrados na região controle do mtDNA</u>	34
1.6	O DNA mitocondrial como marcador de ancestralidade materna e sua importância para estudos populacionais, clínicos e forenses	36
1.6.1	<u>Haplogrupos mitocondriais</u>	37
1.6.2	<u>A filogenia do mtDNA e estudos de ancestralidade humana</u>	37
1.6.3	<u>Contribuições de estudos populacionais para a genética clínica</u>	40
1.6.4	<u>Aplicações do mtDNA humano no âmbito forense</u>	41
1.7	Bancos de dados populacionais e padrões de qualidade na análise de sequências de mtDNA	43
1.8	A diversidade da população brasileira	44
2	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo Geral	48
2.2	Objetivos Específicos	48
3	METODOLOGIA	49
3.1	Amostra estudada	49
3.2	Extração, amplificação e purificação do DNA mitocondrial	50
3.3	Reação de sequenciamento e eletroforese capilar	52
3.4	Análise dos dados genéticos	53
4	RESULTADOS	55
4.1	Caracterização dos haplótipos de origem materna da amostra maranhense	55
4.2	Distribuição dos haplogrupos mitocondriais na amostra maranhense	58

4.3	Comparação populacional entre a amostra maranhense e dados já publicados para a população brasileira	60
5	DISCUSSÃO	64
5.1	Índices de diversidade molecular da amostra maranhense	64
5.2	Análise de diferenciação entre a amostra do Maranhão e outras populações brasileiras	66
5.2.1	<u>Distâncias genéticas</u>	67
5.3	Linhagens maternas presentes na amostra maranhense	68
5.3.1	<u>Linhagens ameríndias</u>	68
5.3.2	<u>Linhagens africanas</u>	70
5.3.3	<u>Linhagens europeias e asiáticas</u>	73
5.4	Outras considerações acerca dos dados obtidos no presente estudo	74
	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A – Relação de amostras analisadas no presente estudo, juntamente com os seus respectivos haplogrupos mitocondriais, a frequência haplotípica (n) e os haplótipos de DNA mitocondrial encontrados	94
	APÊNDICE B – Matriz representativa do resultado do teste de não-diferenciação para as linhagens africanas.....	100
	APÊNDICE C – Matriz representativa do resultado do teste de não-diferenciação para as linhagens ameríndias.....	101
	APÊNDICE D – Matriz de distância genética F_{ST} entre Maranhão e três populações brasileiras (diagonal inferior) e o valor de p (diagonal superior).....	102
	APÊNDICE E – Filogenia dos haplogrupos derivados de L3, evidenciando as variações no mtDNA que os caracterizam.	103
	APÊNDICE F – Frequência das linhagens ameríndias em tribos da América do Sul e linhagens africanas encontradas em países da África por outros estudos.	104
	APÊNDICE G – Localização das tribos brasileiras citadas neste estudo	105
	APÊNDICE H – Trabalho apresentado no Congresso Internacional Interforensics, realizado em São Paulo (SP), em maio de 2019.....	106
	APÊNDICE I – Trabalho apresentado no XVI Congresso Nacional de Criminalística, realizado em Goiânia (GO), em outubro de 2019	107
	APÊNDICE J – Resumo submetido à Conferência Internacional <i>12th Haploid Markers</i> , a ser realizado em Budapeste, na Hungria.....	108

ANEXO A – Aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do HU-UFMA	109
ANEXO B – Aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do HUPE-UERJ	111

INTRODUÇÃO

Em seres eucariotos, o ácido desoxirribonucleico (DNA) é um polímero constituído por quatro diferentes nucleotídeos de desoxirribose, os quais se intercalam para formar duas fitas complementares. Estes nucleotídeos diferem na composição química da base nitrogenada, o que reflete no seu peso molecular. Assim, são agrupados em dois grupos de compostos: As purinas, moléculas de maior peso molecular, representadas por adenina ($C_5H_5N_5$) e guanina ($C_5H_5N_5O$); e as Pirimidinas, representadas por citosina ($C_4H_5N_3O$) e timina ($C_5H_6N_2O_2$). Para formar os pares de base (pb) que estruturam a cadeia do DNA, a adenina (A) é ligada a timina (T) através de duas ligações de hidrogênio, enquanto que a guanina (G) se liga a citosina (C) através de três ligações (ALBERTS et al., 2009). Combinações diferentes destes monômeros nas fitas de DNA codificam informações específicas e fundamentais para a manutenção da vida.

Os organismos eucariotos apresentam dois tipos diferentes de DNA, os quais possuem diferenças relacionadas principalmente a estrutura, localização na célula, herança parental e quantidade de informação genética. O DNA encontrado dentro do núcleo celular (nDNA) é constituído por bilhões de pares de bases (pb) organizados em uma dupla-fita linear e compactados em estruturas cromossômicas. É nesta molécula que se encontram as informações acerca da maior parte das proteínas que compõem o organismo. Enquanto isso, o DNA encontrado dentro das mitocôndrias (mtDNA) consiste em dupla-fita organizada em formato circular, composta por aproximadamente 16.569 pb (ANDERSON et al., 1981).

Apesar de pequeno, o genoma mitocondrial contém informações fundamentais em sua região codificante, as quais garantem a sustentação energética das células dos organismos eucariotos (ATTARDI; SCHATZ, 1988). A região não-codificante do mtDNA, composta por aproximadamente 1122 pb, contém três regiões onde a taxa de mutação é alta devido a um sistema de reparo ausente ou ineficiente, denominadas Regiões Hipervariáveis (HVR) (TSUTSUMI et al., 2006).

Como consequência do processo de fecundação de mamíferos, o nDNA possui origem biparental, enquanto que o padrão de herança genética do mtDNA é restrito à linhagem materna. Assim, como resultado de ser um genoma haploide, a ausência de eventos de recombinação torna o mtDNA altamente conservado entre gerações matrilineas. Essa característica, aliada ao fato de existir em sua estrutura regiões com alta taxa de mutação, oferece a possibilidade de se utilizar sua informação para distinguir diferentes matrilineagens (BUTLER, 2009). Com isso, a molécula de mtDNA vem sendo amplamente utilizada como um marcador para a inferência

de diversidade genética e origem ancestral de populações, sendo possível utilizar estas informações para aplicações na Ciência Forense, na Genética Populacional e no âmbito clínico.

No campo das Ciências Forenses, a construção de bases de dados de haplótipos de mtDNA possibilita a utilização dessa informação genética para o cálculo da frequência de um dado perfil haplotípico observado, determinando-se, assim, o peso estatístico de evidências. Para que essa informação possa ser utilizada no âmbito legal, a mesma precisa alcançar critérios de qualidade através de validação por ferramentas de controle, como as disponíveis na base de dados online *EDNAP mtDNA Population Database* (EMPOP) (PARSON; DÜR, 2007; YAO; BRAVI; BANDELT, 2004), uma plataforma de haplótipos e de análise de mtDNA humano que atualmente é referência neste sentido.

No aspecto filogenético, a possibilidade de utilizar a informação do mtDNA para caracterizar a ancestralidade matrilinear dos grupos humanos, mapear suas rotas de migração e provável distribuição no tempo e no espaço é de grande contribuição para a Antropologia Biológica no que diz respeito às suas bases históricas e evolutivas (ENDICOTT et al., 2009; FU et al., 2013; HEINZ et al., 2017; RICHARDS; SOARES; TORRONI, 2016).

O conhecimento acerca das diferentes contribuições genéticas de ancestrais de uma população também é importante para o contexto clínico à medida que a relação entre polimorfismos genéticos e o risco e a susceptibilidade a determinadas doenças vem sendo investigada (CRAWFORD; NICKERSON, 2005; SMART; BOLNICK; TUTTON, 2017).

Apesar da importância associada às aplicações do estudo da variabilidade do genoma mitocondrial, até o presente momento, existem poucos dados dessa natureza para a população brasileira (ALVES-SILVA et al., 2000; BARBOSA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; FRIDMAN et al., 2014; BERNARDO et al., 2014; CARDENA et al., 2013; SANCHES et al., 2014; SCHAAN et al., 2017, DOS REIS et al., 2019; SIMÃO et al., 2019). O quantitativo é ainda menor ao considerar o número de estudos relacionados à região controle completa do mtDNA (RC-mtDNA). Dentre estes estudos, a maioria está concentrada nas regiões Sudeste (DOS REIS et al., 2019; SIMÃO et al., 2018) e Sul brasileira (PALENCIA et al., 2010; POLETTO et al., 2019). Para a região Centro-Oeste, verifica-se um estudo, contemplando apenas o Distrito Federal (FREITAS et al., 2019). Para o Norte, existe apenas um estudo que caracteriza as linhagens maternas de amostras de indivíduos pertencentes aos Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Tocantins (NOGUEIRA et al., 2017).

Destaca-se que a maioria dos estudos não contemplam a análise de RC-mtDNA e/ou não foram avaliados por critérios de qualidade para aplicação forense (ALVES-SILVA et al., 2000; BARBOSA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; FRIDMAN et al., 2014; BERNARDO

et al., 2014; CARDENA et al., 2013; SANCHES et al., 2014; SCHAAN et al., 2017). Apesar disso, estes estudos são importantes contribuições para o conhecimento dos componentes genéticos matrilineos que compõem diferentes localidades do Brasil. Por exemplo, em relação à região Nordeste, verificam-se três contribuições, as quais contemplam a análise de HVR em amostras oriundas de todos os Estados nordestinos, excluindo o Estado do Maranhão (ALVES-SILVA et al., 2000; BARBOSA et al., 2008; SCHAAN et al., 2017).

Portanto, algumas localidades do país ainda não foram estudadas em relação ao genoma mitocondrial que compõe a sua população. Uma consequência dessa escassez de dados é que a estimativa das frequências haplotípicas destes locais fica restrita à uma base de dados deficiente em informações genéticas, o que afeta a precisão de análises importantes para os contextos clínico e forense. Nesse sentido, a expansão dos bancos genéticos de mtDNA tem potencial para garantir maior especificidade das informações genéticas para aplicação em estudos clínicos, populacionais e nos casos de identificação humana. Assim, estudos com este objetivo apresentam contribuição para a segurança, para a saúde, e para ampliar a compreensão acerca das questões históricas que se relacionam com os processos formação da população brasileira.

O presente estudo tem como proposta contribuir para a expansão da base de dados genéticos de mtDNA da população brasileira a partir da análise da RC-mtDNA de uma amostra de indivíduos do Estado do Maranhão, um dos estados do Nordeste para o qual ainda não há informações acerca deste marcador genético. Esse estudo está inserido no âmbito de um projeto de colaboração entre o Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) e os Serviços de Diabetes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Este projeto é composto por um total de quinhentas amostras de pacientes e de indivíduos saudáveis, nascidos no Estado do Maranhão e que estão sendo investigados em relação ao desfecho e complicações da Diabetes Tipo 1. Portanto, esse estudo também tem como meta contribuir com a caracterização da ancestralidade das amostras utilizadas em estudos clínicos.

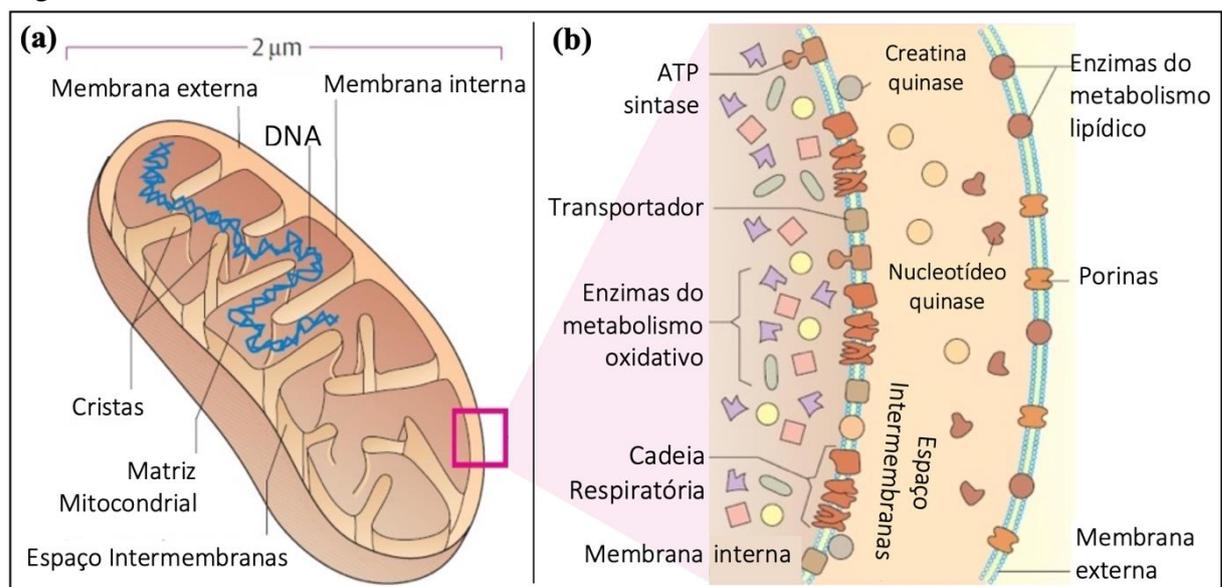
1 REVISÃO TEÓRICA

1.1 Origem, estrutura e funções das mitocôndrias

As mitocôndrias são pequenas organelas de tamanho micrométrico encontradas em todas as células nucleadas de organismos eucariotos. Sua estrutura é delimitada por duas membranas, as quais possuem funções estruturais, metabólicas e de manutenção (Figura 1a) (ALBERTS, 2009).

Do ponto de vista estrutural, a membrana externa delimita a organela, enquanto que a membrana interna forma invaginações para a matriz mitocondrial, formando as cristas mitocondriais (Figura 1a). Em caráter funcional, a membrana externa contém enzimas que atuam no metabolismo celular e proteínas do tipo porinas, as quais realizam a transferência de material localizado entre a mitocôndria, o citosol e o núcleo celular. A membrana interna, por sua vez, possui outros componentes vitais para a funcionalidade da organela, como elementos que participam do metabolismo oxidativo e da cadeia respiratória, e transportadores para garantir o tráfego de moléculas necessárias ao metabolismo (BOGENHAGEN, 2012).

Figura 1 – Estrutura mitocondrial.



Legenda: (a) – Ilustração representativa de uma mitocôndria de mamífero, enfatizando os principais componentes estruturais da organela; (b) – Ilustração representando os elementos encontrados região das membranas mitocondriais.

Fonte: Adaptado de: <https://alevelbiology.co.uk/notes/mitochondria-structure-and-functions/>. Acesso em 09 jan. 2020.

O espaço intermembranas e a matriz mitocondrial concentram enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo que ocorre na organela (Figura 1b). No interior da matriz mitocondrial está localizado o DNA mitocondrial (mtDNA) (Figura 1a), o qual pode estar organizado em uma estrutura denominada nucleóide (BOGENHAGEN, 2012).

Segundo a Teoria Endossimbiótica, a organização estrutural e funcional das mitocôndrias é resultado de uma relação simbiote entre organismos procariotos e eucariotos. Esta teoria é baseada nas grandes semelhanças que existem entre a estrutura, os elementos do código genético, o modelo e maquinaria de replicação/transcrição das mitocôndrias em relação aos organismos protistas (ZACHAR; SZATHMÁRY, 2017). Por exemplo, assim como em procariotos, o RNA mensageiro (mRNA) das mitocôndrias é policistrônico, ou seja, codificam mais de uma cadeia polipeptídica (MERCER et al., 2011). Além disso, esta teoria também é favorecida por análises filogenéticas realizadas em leveduras, as quais revelam que os genes envolvidos na manutenção e função desta organela contêm equivalências com o código genético de α -proteobactérias, bactérias, bacteriófagos e archeobactérias, além de possuir fragmentos específicos de organismos eucariotos (GRAY; BURGER; LANG, 2001).

De acordo com a mesma teoria, o processo evolutivo dos organismos eucariotos tornou as mitocôndrias organelas compactas e especializadas, que estão envolvidas em eventos fundamentais da célula, como processos de apoptose, de proliferação celular e, principalmente, de fosforilação oxidativa, oferecendo suporte energético para a célula por meio da formação de intermediários (ATP e GTP) (ALBERTS et al., 2009). Ainda, grande parte do genoma mitocondrial foi transferido para o núcleo da célula eucariótica, ocasionando uma redução no tamanho do genoma mitocondrial (WALLACE, 2013). Com esta redução, a região codificante do mtDNA contém apenas 37 genes, os quais codificam 13 polipeptídeos essenciais para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons do processo de fosforilação oxidativa. Os demais elementos necessários para as mitocôndrias são sintetizados pelo núcleo celular (GAMMAGE; FREZZA, 2019). Deste modo, a cooperação mitonuclear é fundamental para a subsistência da organela e para a realização de funções essenciais para a manutenção e sustentação de células eucarióticas.

Estima-se que cada célula somática humana contenha entre 100 a 10.000 organelas mitocondriais (MONTIER; DENG; BAI, 2009). Esta estimativa é bastante ampla pois é natural que as mitocôndrias presentes em diferentes tipos celulares de mamíferos variem em quantidade, tamanho, formato (MIETTINEN; BJÖRKLUND, 2017), sequência nucleotídica (JAZIN et al., 1996) e nível de expressão gênica (VAN DEN BOGERT et al., 1993). Estas variações parecem estar relacionadas ao nível de atividade metabólica dos tecidos biológicos

em um organismo em homeostase (HERBERS et al., 2019). Apesar destas variações serem naturais, doenças metabólicas também podem alterar estas características que são inerentes às mitocôndrias de diferentes tecidos biológicos (REZNIK et al. 2016).

1.2 O genoma mitocondrial humano e suas particularidades

O comprimento do mtDNA é de cerca de 5,4 μm , sendo 380 mil vezes menor do que o DNA presente no núcleo da célula (nDNA) (GARCIA et al., 2017). Apesar de ser uma molécula pequena, o mtDNA está presente em grande quantidade em cada célula eucariota. Dependendo do tecido biológico, cada organela mitocondrial de mamíferos pode conter entre uma a dez cópias deste mtDNA (KUKAT et al., 2011; MONTIER; DENG; BAI, 2009). Assim, mesmo com seu tamanho pequeno em relação ao nDNA, o mtDNA representa aproximadamente 1% do conteúdo de uma célula diploide humana (PIOVESAN et al., 2019).

Na molécula de DNA, a distribuição assimétrica do conteúdo de GC (Guanina-Citosina) resulta em uma fita de maior peso molecular, rica em Guanina e Adenina (fita H, do inglês *Heavy*) e uma fita mais leve (fita L, do inglês *Light*), rica em Citosina e Timina. No caso do mtDNA, o conteúdo de GC é estimado em 44,36%, sendo a maior proporção encontrada no organismo humano (PIOVESAN et al., 2019). Quanto à sua organização, durante os processos de replicação e transcrição da molécula, a fita H é a localizada mais externamente em relação à molécula circular, enquanto que a fita L é a mais interna ao círculo (BUTLER, 2009).

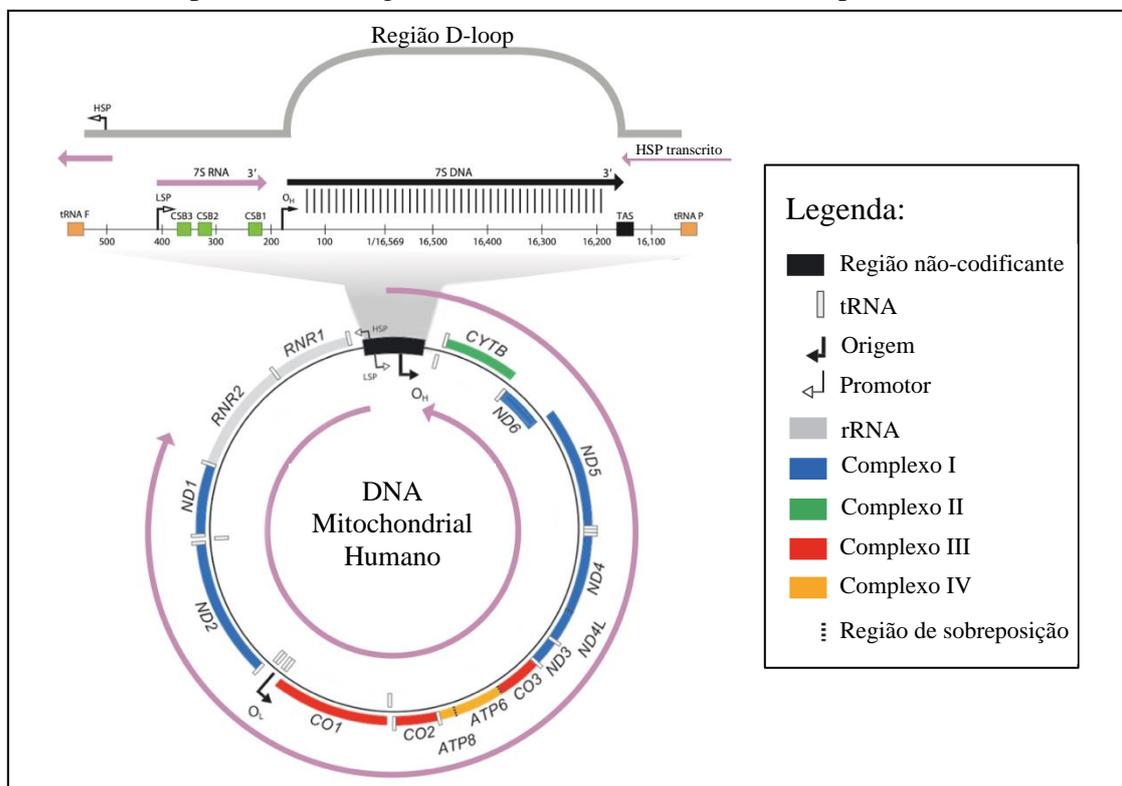
Em 1981, Anderson e colaboradores descreveram pela primeira vez a sequência do mtDNA, a qual foi reanalisada e corrigida em 1999 pelo mesmo grupo de pesquisadores (ANDREWS et al., 1999). A Sequência de Anderson ou, como ficou conhecida após a revisão, Sequência de Referência de Cambridge revisada (rCRS – do inglês, *revised Cambridge Reference Sequence*) possui 16.569 pb. Os sítios foram numerados tendo como referência a origem de replicação da fita H (OH) (Figura 2) (ANDREWS et al., 1999).

A nível genético, aproximadamente 93% do mtDNA é formado por regiões codificantes (CHINNERY; HUDSON, 2013). Dentre os 37 genes contidos na região codificante do mtDNA, somente 13 codificam peptídeos, os quais incluem a enzima ATP sintase e subunidades dos complexos I (NADH desidrogenase), II, III (citocromo b) e IV (citocromo c oxidase) da cadeia respiratória (SHOKOLENKO et al., 2009; GAMMAGE;

FREZZA, 2019), como pode ser observado na Figura 2. Os demais genes compreendem 22 RNAs transportadores (tRNA) e dois RNAs ribossomais (rRNA) (ANDERSON et al., 1981).

O restante deste genoma é compreendido por uma região não-codificante, chamada de Região Controle do mtDNA (RC-mtDNA), a qual é o foco das análises realizadas neste trabalho. Composta por aproximadamente 1112 pb, esta região possui suma importância para a manutenção do genoma e da célula, já que é neste segmento que estão localizados o sítio de iniciação da replicação da fita H (O_H), os promotores HSP (do inglês, *heavy strand promoter*) e LSP (*light strand promoter*) e o sítio de terminação da replicação (TAS), como apontados na Figura 2 (CHINNERY; HUDSON, 2013). Além disso, esta região possui uma característica única: a formação de uma região de tripla fita durante os processos de replicação e transcrição da molécula. Esta estrutura, chamada de *displacement loop* (D-loop), é formada pela síntese de um pequeno fragmento de DNA copiado da fita H, denominado 7S DNA, e está representado na Figura 2 (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016). Este fragmento ainda não possui função bem definida, mas acredita-se que tenha importância nos processos de replicação e transcrição do mtDNA (NICHOLLS; MINCZUK, 2014).

Figura 2 – Representação esquemática do mtDNA, evidenciando os elementos presentes na região controle e a estrutura do D-loop



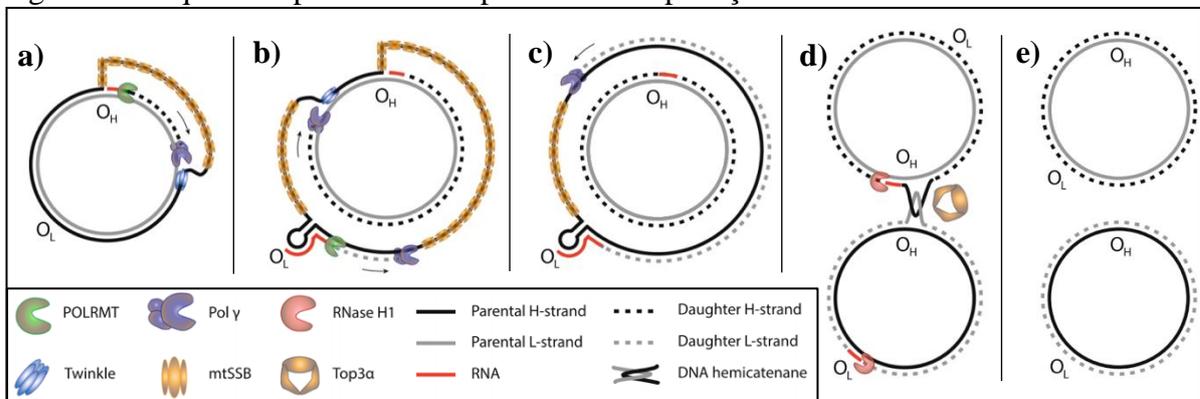
Fonte: Adaptado de GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; GAMMAGE; FREZZA, 2019.

1.2.1 Mecanismos de replicação e transcrição do genoma mitocondrial

No interior da matriz mitocondrial, o mtDNA está comumente associado a um complexo proteico denominado Fator de Transcrição Mitocondrial A (TFAM) (KUKAT et al, 2015). Ao se associar ao DNA, o complexo DNA-TFAM forma a estrutura do nucleóide, sendo responsável por controlar os níveis de compactação do DNA de acordo com a necessidade de replicação e transcrição (KOLEGAR et al, 2013; FARGE; FAKJENBERG, 2019). Deste modo, para que a replicação e a transcrição do mtDNA ocorram, o complexo DNA-TFAM deve estar minimamente descompactado nas regiões dos sítios de replicação/transcrição, de modo a deixá-los expostos às enzimas que irão iniciar os respectivos mecanismos.

A maquinaria da mitocôndria para o processo de replicação consiste nos elementos listados na legenda da Figura 3. De acordo com o estudo de Clayton (1982), o mecanismo de replicação do mtDNA inicia quando um primer transcrito por uma RNA polimerase (POLRMT) se anela a O_H e a DNA polimerase gama (Pol γ) se liga ao primer no sítio de origem da replicação. A partir disso, a helicase Twinkle vai expandindo a forquilha de replicação para que a Pol γ comece a realizar a extensão da nova fita pesada (H) (Figura 3a). Ao alcançar a região O_L , há a formação de um gancho que permite que o início síntese da fita reversa (L) após a ligação de outro primer sintetizado por POLRMT (Figura 3b). Assim que o processo de síntese de ambas as fitas é finalizado, o processo de replicação é encerrado, os primers são degradados, e ocorre a separação da recém-sintetizada molécula de mtDNA através da enzima Topoisomerase 3-alfa (Figura 3d) (CLAYTON, 1982).

Figura 3 – Esquema representando o processo de replicação do mtDNA de mamíferos



Legenda: (a) – Início da Replicação, iniciação da síntese da fita H; (b) – Iniciação da síntese da fita L; (c) – Com a replicação de ambas as fitas, o processo de síntese é finalizado; (d) – A remoção dos primers e a separação das fitas são realizadas através de enzimas; (e) – Término do processo de replicação, com o resultado final de duas moléculas semi-conservadas de mtDNA.

Fonte: Adaptado de: GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016.

Em mamíferos, o nível de replicação do mtDNA varia de acordo com o tipo de tecido e sua necessidade bioenergética, de modo que o número de cópias do genoma mitocondrial é maior em tecidos que possuem atividade metabólica mais elevada (HERBERS et al., 2018). Apesar de alvo de grandes discussões, como as apresentadas por Gammage e Frezza (2019), é teorizado que a taxa de replicação do mtDNA está relacionada com a manutenção do número de cópias em decorrência a uma resposta adaptativa aos danos gerados por estresse oxidativo ou a erros que podem ocorrer durante o processo de replicação do mtDNA devido à escassez de métodos de reparo (TORREGROSA-UMÑUMER et al., 2015; VAN HOUTEN; SANTA-GONZALEZ; CAMARGO, 2018; FOOTE et al., 2018). Estes fenômenos, apesar de naturais, podem ocasionar variações na sequência de mtDNA que se relacionam a doenças como Aterosclerose, Parkinson e Diabetes, por exemplo (YU; BENNET, 2014; CHAROUTE et al., 2018; GIANNOCCARO et al., 2017; DOS SANTOS PICANCO et al., 2018; SHARMA; SAMPATH, 2019).

1.2.2 O mecanismo de herança do mtDNA em mamíferos

É observado que mtDNA é transmitido em sua integralidade para os descendentes, mantendo as informações dos ascendentes maternos. Isto é atribuído à herança das mitocôndrias ocorrer de modo uniparental por via materna, diferentemente do padrão de herança biparental do nDNA. Existem diferentes hipóteses para este fenômeno, e a teoria mais aceita atualmente envolve ubiquitinação do mtDNA presente no espermatozoide durante o processo de fecundação (SUTOVSKY et al., 1999; LUO; SCHATTEN; SUN, 2013) e sua subsequente autofagia (NISHIMURA et al., 2006; LEVINE; ELAZAR, 2011; ZHOU et al., 2016, VAN HOUTEN; HUNTER; MEYER, 2016).

Devido ao caráter uniparental do mtDNA, os eventos de recombinação são ausentes. Assim, a carga genética mitocondrial é transmitida em blocos conservados, denominados haplótipos (CRAWFORD; NICKERSON, 2005; LUTZ-BONENGEL; PARSON, 2019). Deste modo, indivíduos relacionados maternalmente possuem o mesmo haplótipo, enquanto que diferentes haplótipos caracterizam diferentes linhagens maternas.

A herança uniparental materna característica do mtDNA torna possível realizar estudos de genealogia dos relativos maternos de indivíduos, definindo suas origens e as ramificações em cada geração matrilinea (BAASNER et al., 1998; LEVINE; ELAZAR, 2011; KIVISILD,

2015). Esta característica torna o mtDNA um marcador importante para análise da herança ancestral materna de uma população. Além disso, esta característica auxilia no mapeamento e gerenciamento de risco e susceptibilidade de doenças hereditárias. Estas aplicações são discutidas posteriormente neste trabalho.

Apesar das vantagens da aplicação nos âmbitos populacional e clínico, quando se trata do contexto forense, a herança uniparental faz com que a análise do mtDNA seja inapropriada para identificar indivíduos de uma mesma matrilinearidade, permitindo apenas a diferenciação de indivíduos não relacionados por via materna (BUTLER, 2009). Esta questão também será abordada posteriormente neste trabalho.

1.3 Princípios de variabilidade genética

Segundo Hartl (2008, p. 59), “[...] mutação é a fonte definitiva de variação genética”. No contexto genômico, mutação é uma alteração que ocorre ocasionalmente em uma sequência nucleotídica, tendo como referência a linhagem germinativa. Estas alterações nas sequências de mtDNA podem ocorrer durante a replicação celular devido ao estresse oxidativo, à exposição a agentes mutagênicos, ao envelhecimento, ou outros fatores (CALLOWAY et al., 2000; MAYNARD et al., 2015; ALVES et al., 2018).

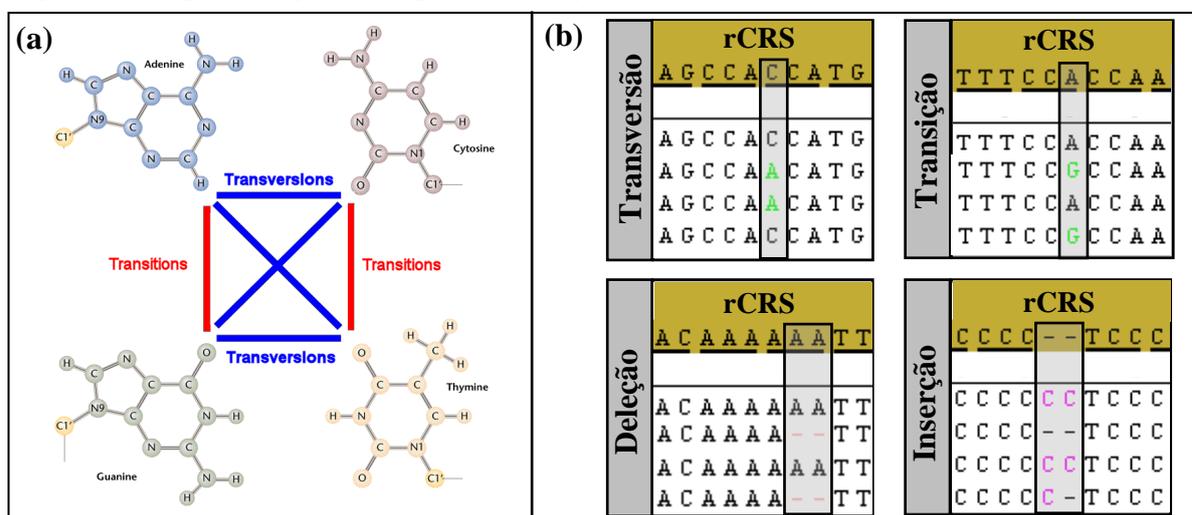
Em geral, as alterações genéticas podem ocorrer a nível genômico, afetando um conjunto de genes, a nível do cromossomo, causando mudanças em seu número ou tamanho, ou a nível molecular, alterando apenas uma base nitrogenada ou alterando uma sequência nucleotídica. As mutações podem modificar a sequência de aminoácidos em regiões codificantes, resultando em efeitos fenotípicos, ou ser uma mutação silenciosa, a qual não resulta em alteração nos aminoácidos (ALBERTS et al., 2009).

A nível molecular, as mutações podem ser classificadas de acordo com o tipo de alteração que ocorre na base nitrogenada de um sítio (Figura 4), podendo ser:

- a) Substituição, caracterizada por uma troca entre bases nucleotídicas em determinada posição. Essas substituições podem ser do tipo Transversão, onde uma base pirimidina substitui uma purina ou vice-versa, ou do tipo Transição, quando há mudança entre as pirimidinas ou entre as purinas (Figura 4a e 4b);
- b) Inserção, onde há adição de nucleotídeos a sequência (Figura 4b); ou
- c) Deleção, quando há exclusão de nucleotídeos da sequência (Figura 4b).

Dependendo do grau de fixação e da frequência em que uma variação genética existe em determinada população, uma mutação pode caracterizar um polimorfismo (KARKI et al., 2015). Em outras palavras, quando um padrão de alteração genética é observado em alta frequência no genoma de indivíduos que compõem uma população, este é considerado um polimorfismo. Por outro lado, se o mesmo padrão de alteração genética não aparecer em frequências tão elevadas em uma outra população, este é considerado uma variante gênica. Vale ressaltar que, em genética de populações, o termo “população” refere-se a um grupo de indivíduos de mesma espécie que compartilham uma área geográfica restrita e que haja potencial intercruzamento entre quaisquer membros de diferentes sexos (HARTL, 2008).

Figura 4 – Representação dos tipos de mutação de sítio único



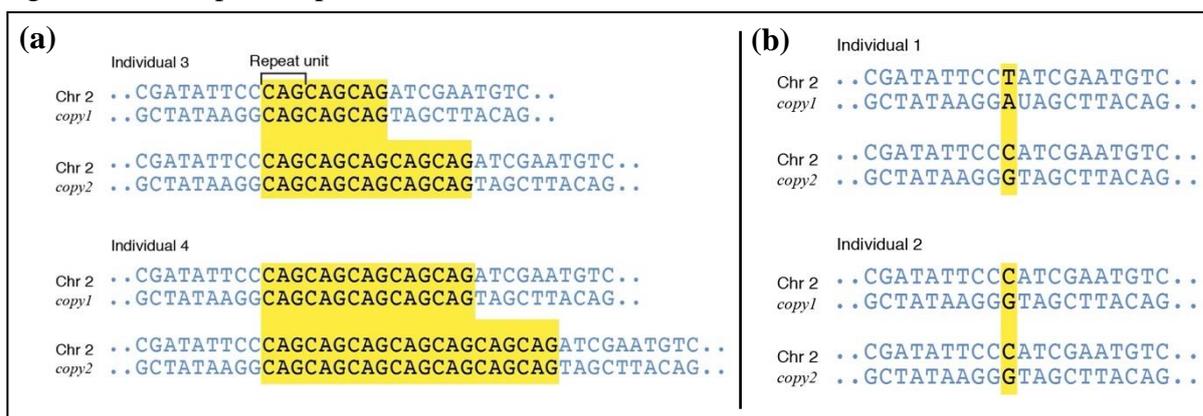
Legenda: (a) Representação esquemática dos tipos de substituições. Em azul, as transversões. Em vermelho, as transições. (b) Exemplos dos tipos de mutações em sequências genéticas. Software utilizado para gerar a imagem: SeqScape 3, Applied Biosystems.

Fonte: (a) WEB: https://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions_vs_Transversions.html. Acesso em 06 dez 2019; (b) A autora, 2020.

De acordo com Butler (2009), os polimorfismos podem ser classificados como:

- Polimorfismos de comprimento, onde variações ocorrem ao longo de uma região da sequência nucleotídica, podendo variar em número de repetições e/ou em número de bases alteradas. Por exemplo, os polimorfismos de repetições curtas em tandem (microsatélites ou STRs – do inglês, *Short Tandem Repeats*) possuem unidades de repetição que variam entre um e cinco pares de base (Figura 5a); e
- Polimorfismos de sequência, onde há substituição de uma base nitrogenada por outra em uma posição da sequência nucleotídica. Quando a substituição ocorre em somente uma base, são chamados de Polimorfismos de Nucleotídeo Único, popularmente chamados pelo acrônimo SNP (Figura 5b).

Figura 5 – Exemplos de polimorfismos



Legenda: (a) – Exemplo de polimorfismos de comprimento, representado pelos STRs; (b) – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), exemplos de polimorfismo de sequência.

Fonte: Adaptado de: *National Human Genome Research Institute*. WEB: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymorphism>. Acesso em 06 dez 2019.

1.4 Características polimórficas da região controle do mtDNA

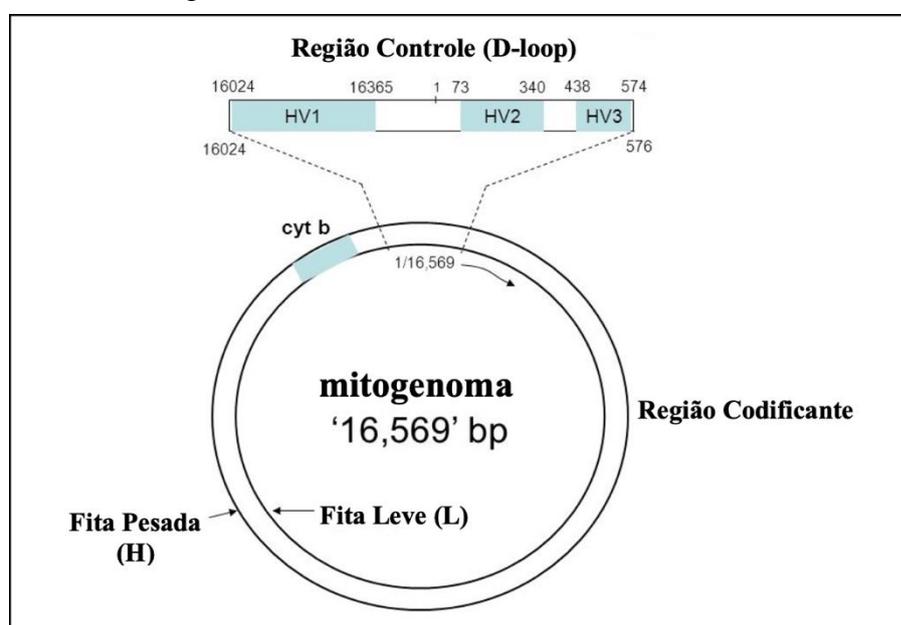
O mtDNA está sujeito a modificações frequentes em sua sequência nucleotídica decorrentes do mal funcionamento de elementos responsáveis pelos mecanismos de replicação celular, danos hidrolíticos, alquilação de bases, e ações de agentes mutagênicos. Deste modo, a taxa de mutação do mtDNA é alta em relação ao nDNA (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Existem discussões acerca dos fatores específicos que tornam o mtDNA mais susceptível a ocorrência de mutações, os quais ainda não foram totalmente elucidados. Por exemplo, acredita-se que, devido a função da mitocôndria no fornecimento de energia celular, o mtDNA está constantemente exposto a espécies reativas de oxigênio, as quais são produtos naturais do metabolismo energético da célula, e podem causar extensos danos oxidativos às fitas de mtDNA (ALEXEYEV et al., 2013). Além disso, níveis de variações causados ao mtDNA pode aumentar com o avanço da idade do indivíduo, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças (WALLACE, 2010; PARK; LARSSON, 2011. ZAPICO; UBELAKER, 2016. ZHANG et al., 2017).

Apesar de ser reconhecido que a taxa mutacional do mtDNA é alta em relação ao nDNA, há dificuldades em estabelecer um valor numérico pois existe variação na taxa de mutação ao longo do genoma mitocondrial (PARSONS et al., 1997; MISHMAR et al., 2003). Por exemplo, a RC-mtDNA não é codificante e, portanto, a maioria das alterações genéticas nesta região não prejudicam o funcionamento da organela. Por isso, as mutações são fixadas mais facilmente,

resultando em uma alta taxa mutacional nesta região. Por esta razão, a RC-mtDNA apresenta *hotspots* mutacionais (SOARES et al., 2009), os quais determinam três segmentos de DNA de elevada variabilidade genética, denominados Regiões Hipervariáveis (HVR – do inglês, *Hypervariable Region*), evidenciados na Figura 6 (BUTLER, 2009). O primeiro e maior segmento (HV1) contém 341 pb, abrangendo a posição 16024 até 16365, o segundo (HV2) contém 267 pb, abrangendo a posição 73 até a 340, e o terceiro (HV3), contém 136 pb, da posição 438 até a posição 574 (BUTLER, 2009).

Figura 6 – Esquema representando o mtDNA humano, evidenciando a região controle do mtDNA e HV1, HV2 e HV3



Fonte: Adaptado de: BUTLER, Forensic DNA Typing, 3ed., p.377. 2009.

O genoma mitocondrial é herdado via herança uniparental materna como um haplótipo (BAASNER et al., 1998). A alta taxa de mutação em RC-mtDNA e o acúmulo de mutações no decorrer do tempo possibilitam que diferentes linhagens maternas sejam identificadas, o que o torna um marcador de escolha para análises de ancestralidade materna (BAASNER et al., 1998). A maioria das variações entre indivíduos de diferentes matrilineagens são localizadas em HV1 e HV2. Porém, devido ao acaso, alguns indivíduos podem apresentar padrões idênticos de polimorfismos nestas regiões, resultando em haplótipos idênticos mesmo sem haver vínculo matrilinear entre eles. Assim, de modo aumentar o poder de distinção entre indivíduos de diferentes origens maternas, HV3 começou a ser utilizada na rotina de laboratórios (LUTZ et al., 2000). Porém, a presença de haplótipos idênticos em indivíduos não relacionados ainda é uma preocupação. Assim, no contexto forense, onde um maior nível de discriminação é

fundamental, é indicado realizar a análise da região controle completa do mtDNA (RC-mtDNA), a qual compreende as três regiões hipervariáveis e os fragmentos entre elas (Figura 6) (EDUARDOFF et al., 2017).

1.4.1 Heteroplasmia

O fenômeno da heteroplasmia é definido como a ocorrência de diferentes sequências de DNA em um mesmo indivíduo (LI et al., 2015). Este fenômeno pode ocorrer de forma natural no organismo, visto que pode ser resultado de mutações somáticas em algumas sequências de DNA das células (LI et al., 2015). Por isso, segmentos de mtDNA onde a taxa mutacional é maior, como em RC-mtDNA, são favorecidos para o surgimento de regiões heteroplásmicas.

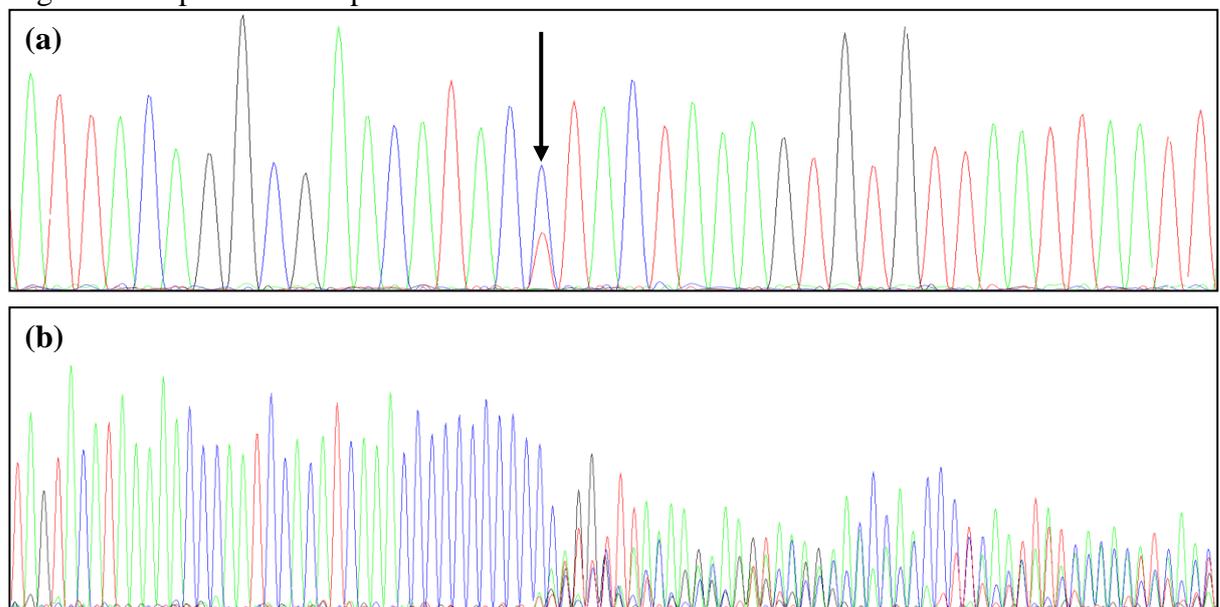
Por estar relacionado com a replicação do material genético, estudos relacionam idade avançada ao aumento e prevalência de genomas heteroplásmicos (ANDREW et al., 2011; ZHANG et al., 2017; GRADY et al., 2018; CALLOWAY et al., 2000). Devido a isso, descendentes de gravidez tardia tendem a possuir maior probabilidade de herdar perfis genéticos com heteroplasmia (TSUTSUMI et al., 2006; WOODS; KHRAPKO; TILLY, 2018).

De acordo com o tipo de mutação que ocorre na sequência de mtDNA, a heteroplasmia pode ser classificada como de posição ou de comprimento. A heteroplasmia de posição, também chamada de heteroplasmia de ponto, ocorre quando parte das moléculas de mtDNA apresentam substituição de nucleotídeos em determinada posição (BENDALL et al., 1996). Com isso, ao analisar os mtDNAs encontrados em uma amostra, esta substituição aparece como uma sobreposição de bases nucleotídicas em uma posição (Figura 7a). Diferentemente, a heteroplasmia de comprimento ocorre devido a presença de inserções ou deleções em algumas das moléculas de mtDNA presentes nas células, adicionando ou retirando bases nucleotídicas, de modo que isso altera o alinhamento das sequências (Figura 7b) (BENDALL; SYKES, 1995).

Devido a presença de heteroplasmia, diferentes sequências de DNA podem existir em uma mesma amostra. Deste modo, ao visualizar um perfil genético, este pode apresentar dois nucleotídeos diferentes em uma mesma posição do fragmento de DNA ou possuir diferentes tamanhos nas sequências de bases nucleotídica (BENDALL et al., 1996; STEWART et al., 2001). Assim, a presença de heteroplasmia pode ser um complicador na análise de sequências de mtDNA já que interfere na interpretação do perfil genético de indivíduos, dificultando na definição do perfil genético original existente.

Existem *hotspots* mutacionais na RC-mtDNA que, ao apresentarem variações genéticas, podem resultar em heteroplasmia. Um exemplo é a formação homopolímeros de citosina (região Poli-C ou *C-stretch*) que podem ocorrer entre as posições 16181 e 16194 em HV1, 302 e 316 em HV2, e 568 e 573 em HV3. Caso estas alterações das sequências nucleotídicas resultem em diferenças no tamanho de algumas moléculas de mtDNA presentes na amostra analisada, haverá desalinhamento das mesmas e a consequente observação de heteroplasmia de comprimento (Figura 7b) (HUNG et al., 2008; PARSON et al., 2014; STEWART et al., 2001).

Figura 7 – Tipos de heteroplasmia



Legenda: (a) – Heteroplasmia de posição, apontada pela seta preta. Neste caso, algumas moléculas de mtDNA do mesmo indivíduo apresentam uma citosina (pico em azul), enquanto outras apresentam uma timina (em vermelho). Por isso, ao analisar esta amostra, o resultado indica uma sobreposição de bases nucleotídicas na posição apontada pela seta preta; (b) – Heteroplasmia de comprimento. Observa-se o desalinhamento da sequência nucleotídica, exibindo um padrão de mistura de bases, a partir de certa posição da sequência de bases nucleotídicas.

Fonte: A autora, 2020.

1.5 Técnicas aplicadas à análise genética do mtDNA

Para análise de sequências de mtDNA, técnicas de biologia molecular são utilizadas com o auxílio de sondas específicas para amplificação e sequenciamento desta região. Para a estudos de ancestralidade materna, é analisada principalmente a região controle completa deste genoma (RC-mtDNA).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a base para o processamento de ácidos nucleicos. Desenvolvida por Kary Mullis em 1985, esta técnica parte do princípio de que ciclos com variações precisas de temperatura mimetizam o processo biológico de replicação do DNA, amplificando a quantidade deste material genético em uma amostra. Através da automatização das etapas de desnaturação, anelamento, e extensão do DNA *in vitro*, este método oferece a possibilidade de alcançar um alto número de cópias de DNA, mesmo quando a quantidade de material biológico é restrita (BUTLER, 2009).

Dentre os componentes a serem adicionados à reação, está a enzima DNA polimerase extraída da bactéria *Thermophilus aquaticus* e, portanto, estável em altas temperaturas. Além disso, oligonucleotídeos são utilizados como sondas que atuam como iniciadores (primers) senso (sentido 5' → 3') e antissenso (sentido 3' → 5') do processo de replicação ao se alinharem a regiões específicas das sequências de DNA em análise. No âmbito da análise do RC-mtDNA, os primers são especificamente desenhados para abranger esta região do genoma mitocondrial. Também são adicionados a esta reação desoxinucleotídeos fosfatados (dNTPs) para cada tipo de base nitrogenada (A, T, C, G), os quais são utilizados como substrato para formação de novas fitas do respectivo fragmento de DNA. Outros componentes, como tampões contendo concentrações iônica específicas, são adicionados para manter a estabilidade e o pH ótimo necessário ao melhor funcionamento reação de amplificação (ALBERTS et al., 2009). Atualmente, kits comerciais contendo todos estes elementos em mistura (à exceção dos primers) estão disponíveis no mercado.

Na primeira etapa de cada ciclo da técnica PCR, altas temperaturas desnaturam o DNA, separando as fitas complementares para serem utilizadas como sequências moldes. Na segunda etapa, os primers se anelam na região específica do segmento alvo, sinalizando para a enzima polimerase o sítio onde deve ser iniciada a replicação. Por fim, a terceira etapa é caracterizada pela enzima polimerase realizando a extensão da nova fita de DNA através da ligação dos dNTPs previamente adicionados a reação (ALBERTS et al., 2009). Estas três etapas são repetidas a cada ciclo, e o número de ciclos por reação de PCR pode variar de acordo com diferentes protocolos laboratoriais.

Após o processo de amplificação do material genético, para gerar o perfil de bases nucleotídicas contido nas sequências de mtDNA, é comum o uso da técnica de sequenciamento. Dentre os métodos atuais, o método de Terminação em Cadeia, também conhecido como Sequenciamento de Sanger em homenagem ao seu criador, é usualmente utilizado.

Descrito em 1977, o método de terminação em cadeia se baseia em uma reação de amplificação por PCR onde, além dos dNTPs, são adicionados nucleotídeos deficientes em um

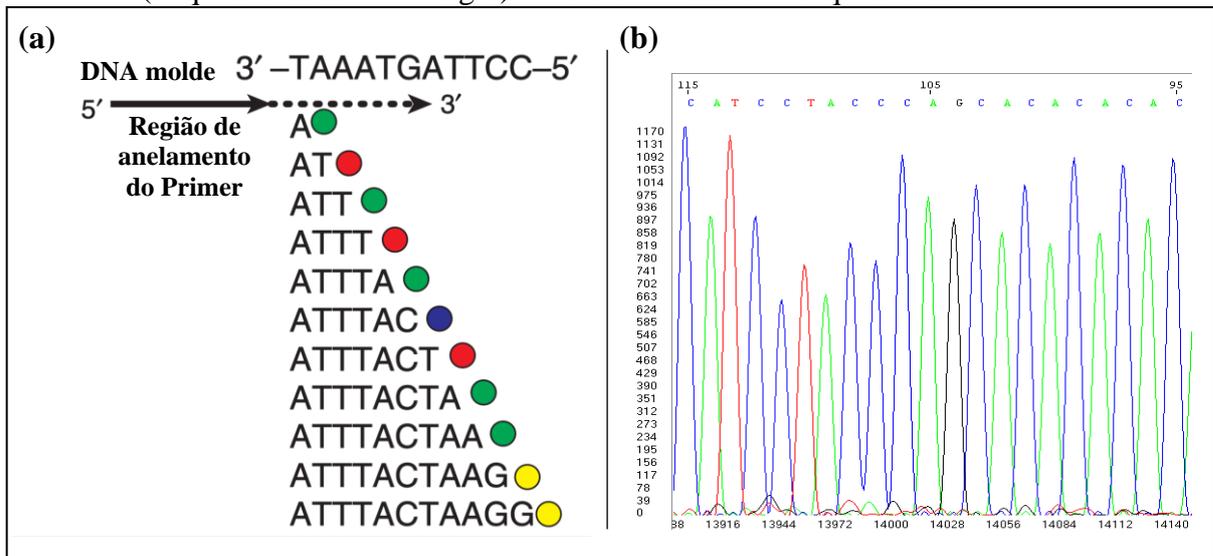
grupo hidroxila em sua extremidade 3', chamados dideoxinucleotídeos (ddNTP). Ao se ligarem às fitas, os ddNTP impedem a ligação de outros nucleotídeos, impossibilitando a extensão da polimerase até o final do fragmento de DNA. Deste modo, de acordo com a ligação dos ddNTPs em diferentes posições das várias fitas amplificadas, são formados fragmentos de DNA de tamanhos diferenciados (SANGER et al., 1977) (Figura 8a).

Para fins de detecção, cada ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) possui um marcador de fluorescência diferente dependendo da base que o constitui. Assim, ao final de cada ciclo da amplificação, são originados fragmentos de DNA de tamanhos variados e com a última base (extremidade 3') marcada com fluorescência (Figura 8a). Atualmente, para detectar estas bases modificadas, utiliza-se um sistema automatizado baseado no método de Eletroforese Capilar somado à detecção de fluorescência induzida por laser (BUTLER, 2009).

A eletroforese é uma técnica analítica em que a aplicação de um campo elétrico influencia na migração de moléculas de acordo com sua carga e tamanho. Devido a seu caráter ácido, as sequências de DNA migram do polo negativo (catodo) para o polo positivo (anodo), e as menores sequências alcançam o polo positivo mais rapidamente (HELLER, 2001). Na Eletroforese Capilar, os fragmentos do mtDNA de tamanhos díspares e marcados com fluorescência atravessam um capilar de diâmetro micrométrico (HELLER, 2001). A detecção das bases marcadas por fluorescência é feita durante esta migração, através da emissão de laser em um determinado ponto do capilar. Assim que um fragmento de mtDNA atravessa a região do laser, há excitação do fluoróforo e conseqüente emissão de fluorescência de comprimento de onda específico para cada base nitrogenada marcada (A, T, C ou G), o qual é captado por um detector (HELLER, 2001). A cada fragmento que atravessa o capilar, há uma nova detecção correspondente à base nitrogenada marcada (extremidade 3') de cada fragmento. Então, essa informação é compilada e transmitida a um computador (RUIZ-MARTINEZ et al., 1993).

Ao final do processo, toda a sequência de bases foi processada e formatada em um gráfico chamado Eletroferograma, onde o eixo Y representa a intensidade de fluorescência em unidades relativas de fluorescência (RFU – do inglês, *Relative Fluorescence Unit*), enquanto que o eixo X representa a posição da base no fragmento de DNA. O resultado aparece como curvas coloridas em sequência, em que cada uma delas representa uma base nitrogenada do fragmento de DNA (Figura 8b). De acordo com o comprimento de onda respectivo à fluorescência do ddNTP, cada base nitrogenada é representada por uma cor: Adenina em verde, Timina em vermelho, Citosina em azul, e Guanina que, por questão de contraste, é visualizada no eletroferograma por picos de cor preta, apesar do ddGTP emitir um comprimento de onda referente à cor amarela (Figura 8).

Figura 8 – Modelo esquemático representando o princípio do Método de Terminação em Cadeia (Sequenciamento de Sanger) e o resultado final do sequenciamento



Legenda: (a) – Organização de nova sequência de DNA após a amplificação com a adição dos terminadores de cadeia (ddNTPs); (b) – Eletroferograma demonstrando o resultado da sequência após a leitura da fluorescência emitida.

Fonte: (a) – Adaptado de: BUTLER, Forensic DNA Typing, 2ed., p.259. 2005; (b) – A autora, 2020.

Amostras com heteroplasmia geralmente necessitam de maior tratamento pois a sua presença dificulta a análise de sequências gênicas. Em razão disso, existem estratégias que podem ser utilizadas com o objetivo de resolver as dificuldades relacionadas a amostras que apresentam este fenômeno. Uma das estratégias é repetir a reação de amplificação por PCR com outro conjunto de primers, os quais podem apresentar melhor desempenho. Outro artifício consiste na realização de maior número de reações de sequenciamento utilizando primers que anelam em fragmentos menores que se sobrepõem na sequência de mtDNA. Assim, quando somados, correspondem a região completa a ser analisada (BUTLER, 2005; DUAN; TU; LU, 2018). A aplicação dessas estratégias melhora o resultado final e pode reduzir a dificuldade de análise que acompanha este fenômeno.

Atualmente, outros tipos de técnicas de sequenciamento vêm sendo aplicadas em genética populacional, principalmente para abranger todo o mtDNA. Por exemplo, o Sequenciamento Massivo Paralelo, também conhecido como Sequenciamento de Próxima Geração (NGS), vêm sendo cada vez mais utilizado para processamento do mtDNA em casos forenses (SHIH et al., 2018; BRANDHAGEN; JUST; IRWIN, 2020), estudos populacionais (SIMÃO et al., 2019) e em estudos sobre heteroplasmia (JUST; IRWIN; PARSON, 2015; SANTIBANES-KOREF et al., 2019), principalmente quando o objetivo da análise é o genoma mitocondrial completo. Apesar da maior precisão em determinar haplogrupos através do sequenciamento do mitogenoma (SIMÃO et al., 2019), a inferência de ancestralidade materna

através da análise da RC-mtDNA é considerada uma metodologia adequada para estudos em genética populacional e forense (BALLARD, 2016; SIMÃO et al., 2018; AMORIM; FERNANDES; TAVEIRA, 2019).

1.5.1 Nomenclatura de polimorfismos encontrados na região controle do mtDNA

De modo a atribuir uma linguagem universal para a representação de dados de sequências de mtDNA, foram postuladas algumas orientações sobre como relatar os polimorfismos encontrados (CARRACEDO et al., 2000; PARSON; BANDELT, 2007. PARSON et al., 2014; SWGDAM mtDNA *Interpretation Guidelines*, 2019). Esta prática permite o compartilhamento de informações genéticas entre pesquisadores através de bases de dados, por exemplo (PARSON; BANDELT, 2007; PARSON et al., 2014).

Como a rCRS foi a primeira sequência de mtDNA a ser descrita, esta é amplamente utilizada pela comunidade científica como referência para as análises do genoma mitocondrial (ANDREWS et al., 1999). Assim, perfis haplotípicos são obtidos a partir de comparações entre a sequência em análise e rCRS (PARSON et al., 2014). A partir destas comparações, são anotadas somente as posições em que ocorrem variações entre elas. Deste modo, é possível relatar o perfil haplotípico de indivíduos sem haver a necessidade de compartilhar todas as bases nitrogenadas que compõem o genoma ou fragmento do genoma analisado.

De modo geral e de acordo com as orientações atuais, para cada variação genética observada, a escrita desta notação deve iniciar com a posição em que a variação se encontra na sequência de mtDNA. Em seguida, deve-se especificar se esta variação corresponde à uma substituição, uma deleção ou uma inserção (PARSON et al., 2014).

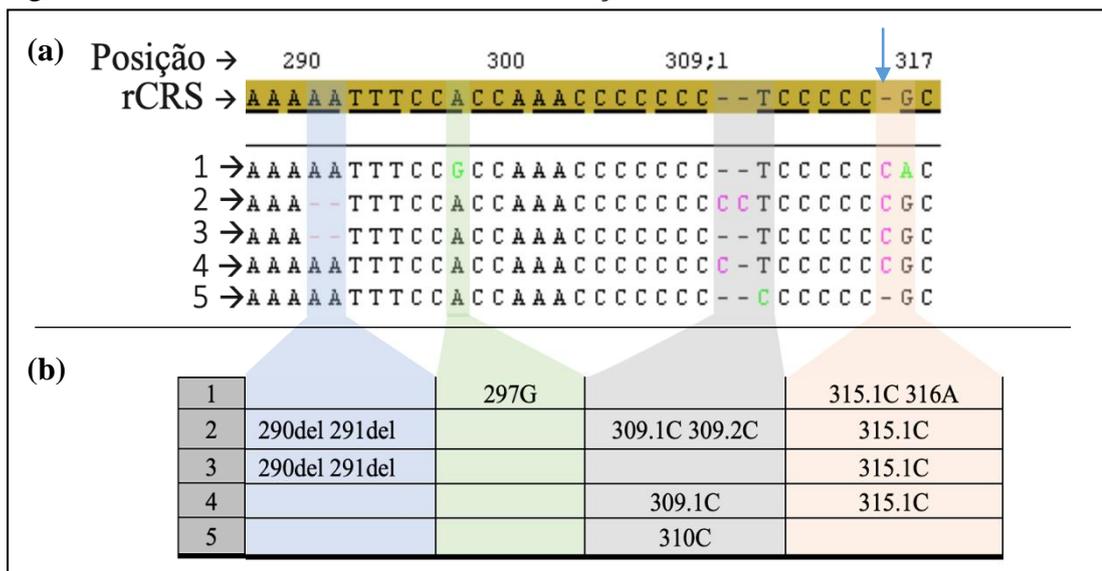
Caso a variação nucleotídica seja uma substituição, a notação deve ser o número que caracteriza a posição na sequência que ocorre a substituição, seguido da letra que caracteriza a base nucleotídica substituinte (PARSON et al., 2014). Por exemplo, na Figura 9, marcado em cor verde, nota-se que a primeira sequência nucleotídica possui uma substituição em relação à rCRS na posição a 297, onde há troca de uma base nitrogenada A para G. Por isso, esta variação deve ser relatada como 297G. As outras sequências da figura não possuem variação nesta posição específica, sendo coincidentes com rCRS e, portanto, não precisa haver anotação.

Em softwares utilizados para a análise de sequências gênicas, como o SeqScape 3 (*Applied Biosystems*), para manter o alinhamento das sequências de mtDNA, polimorfismos

como inserções ou deleções são representados por um sinal de hífen (-). No caso de deleções, o hífen é adicionado para indicar a posição em que houve deleção. Por exemplo, na Figura 9, marcado em cor azul, é possível visualizar que existem duas deleções subsequentes na segunda e na terceira sequência. Estas deleções devem ser relatadas como o número da posição onde elas ocorrem seguido de “del”, “DEL” ou manter o hífen. No caso deste exemplo, a nomenclatura seria “290del 291del”, “290del 291del”, ou “290- 291-” (PARSON et al., 2014).

Em casos de inserção, há adição de sítio extra na sequência nucleotídica. Deste modo, para manter o alinhamento das sequências, deve ser adicionado hífen nas sequências onde estas inserções não ocorrem, incluindo em rCRS (Figura 9, seta azul). A inserção é anotada como o número da posição da base nucleotídica anterior à inserção, seguido por “.1” para indicar a presença de uma inserção e a letra da base nitrogenada inserida (A, T, C ou G) (PARSON et al., 2014). Como exemplo, na Figura 9, marcado em cinza, a sequência quatro contém uma inserção de citosina (C) entre as posições 309 e 310, devendo ser nomeada, portanto, como “309.1C”. No caso de mais de uma inserção em sequência, deve-se adicionar “.1” para a primeira, “.2” para a segunda, “.3” para a terceira e assim consecutivamente. Na Figura 9, onde está marcado em cinza, a sequência número dois contém duas inserções de C e, portanto, deve ser nomeada “309.1C 309.2C”. Nas sequências em que não há inserções nesta posição, bem como rCRS, devem haver hífenes para manter o alinhamento (Figura 9a).

Figura 9 – Polimorfismos encontrados em relação a rCRS



Legenda: (a) – Disposição dos polimorfismos na sequência de mtDNA, alinhada a rCRS (posições 287 – 317). Software utilizado na imagem: SeqScape 3, Applied Biosystems; (b) – Nomenclatura utilizada para reportar as sequências de mtDNA de acordo com diferenças que apresentam em relação a rCRS.

Fonte: A autora, 2020.

A ocorrência de heteroplasmias também deve ser relatada, de modo que existem recomendações específicas para resolver, interpretar e reportar estes eventos heteroplásmicos em sequências de mtDNA (PARSON et al., 2014). Especificamente para os casos em que amostras apresentem heteroplasmia de posição, deve-se seguir a nomenclatura determinada pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a qual determina um código baseado nas letras do alfabeto para cada possibilidade de base nucleotídica na sequência de DNA (Quadro 1). Outros exemplos de nomenclaturas para posições específicas do mtDNA podem ser conferidos no documento “*SWGDM Mitochondrial DNA Nomenclature Examples Document, 2014*”.

Quadro 1 – Códigos estabelecidos pela IUPAC para representação de heteroplasmia em sequências de mtDNA

Código IUPAC	Base Correspondente	Código IUPAC	Base Correspondente
R	A ou G	H	A, C ou T
Y	C ou T	B	C, G ou T
M	A ou C	V	A, C ou G
K	G ou T	D	A, G ou T
S	C ou G	N	A, C, G ou T
W	A ou T		

Fonte: A autora, 2020. Baseado em *SWGDM Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Analysis by Forensic DNA Testing Laboratories*.

1.6 O DNA mitocondrial como marcador de ancestralidade materna e sua importância para estudos populacionais, clínicos e forenses

Devido a peculiaridades discutidas anteriormente, como altas taxas mutacionais, herança uniparental materna e alto número de cópias por célula, o mtDNA é reconhecido como um importante marcador no contexto de identificação humana e de ancestralidade materna. Assim, as informações obtidas a partir da análise da sequência de mtDNA possuem diferentes aplicabilidades, e podem contribuir para estudos populacionais, clínicos e forenses.

No âmbito da genética de populações, a análise do mtDNA e estudos deste marcador fornecem evidências biológicas acerca da filogenia humana. Em estudos clínicos, a análise de polimorfismos relacionados ao mtDNA pode fornecer de informações acerca do risco e susceptibilidade a doenças. No âmbito forense, as características particulares do mtDNA podem auxiliar na investigação da identidade de indivíduos.

1.6.1 Haplogrupos mitocondriais

Haplogrupos mitocondriais são ramos monofiléticos de haplótipos (TORRONI et al., 2000). Assim, no sentido evolutivo, indivíduos classificados em um mesmo haplogrupo pertencem a matrinhagens mais próximas do que aqueles que pertencem a outros haplogrupos.

Os haplogrupos são nomeados a partir de caracteres do alfabeto, em maiúsculo, para indicar o haplogrupo principal (também chamado de macrohaplogrupo), seguido de caracteres alfanuméricos para indicar suas subdivisões (subhaplogrupos), se houverem. Por exemplo, a rCRS é caracterizada como pertencente ao subhaplogrupo H2a2a1, estando inserida no macrohaplogrupo H, o qual é reconhecido por ser de origem ancestral europeia (ANDREWS et al. 1999). Assim, qualquer outra sequência analisada que possua um haplótipo similar a rCRS, também é classificada neste mesmo haplogrupo.

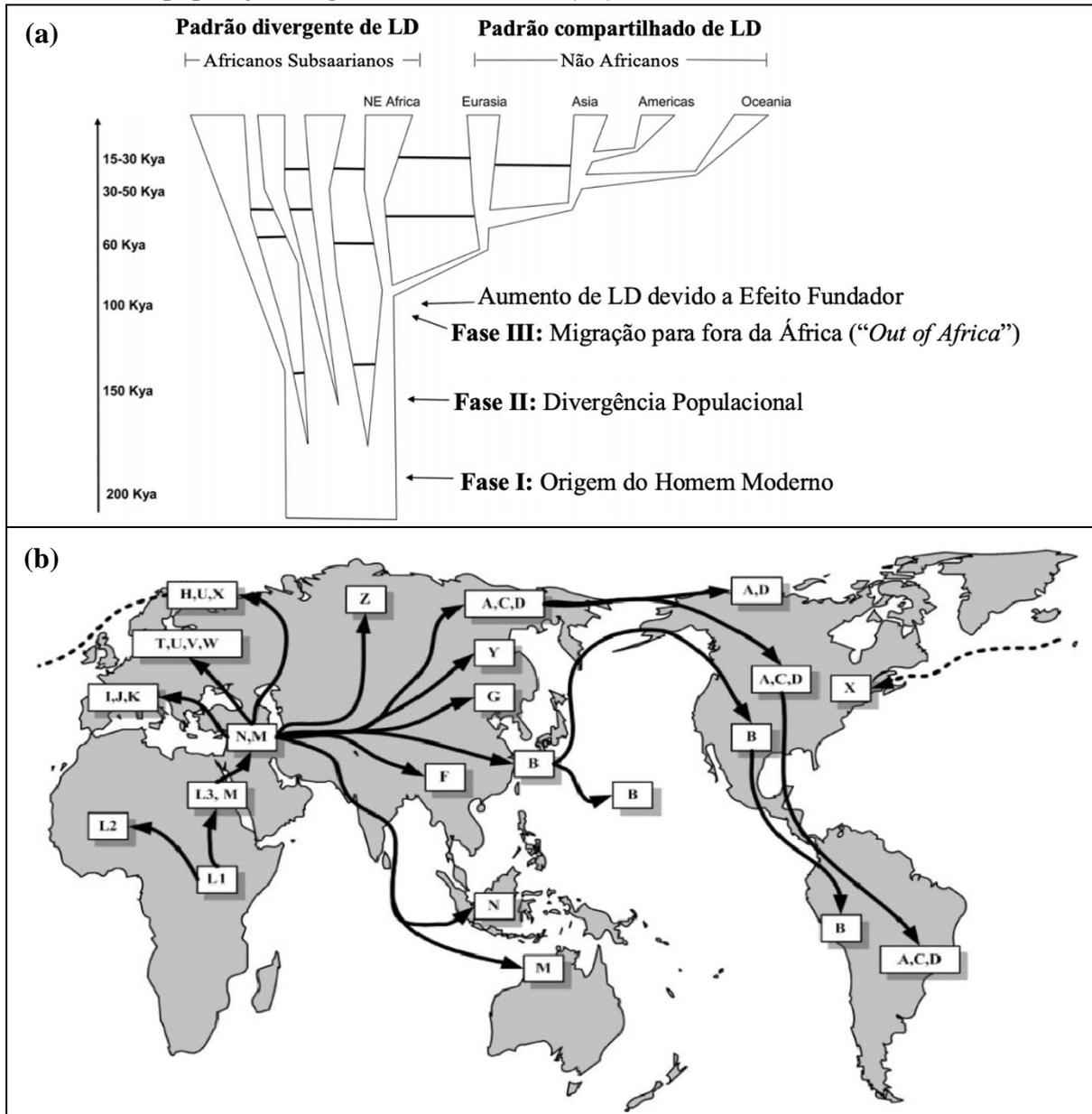
1.6.2 A filogenia do mtDNA e estudos da ancestralidade humana

O modelo sugerido pela teoria “*Out of Africa*” indica que a origem do homem moderno foi no continente africano (NEI, 1995; CAMPBELL; TISHKOFF, 2008). Segundo esta teoria, à medida que ancestrais foram migrando para além do continente africano, grupos de indivíduos foram se estabelecendo em outras regiões geográficas, formando novas populações a partir de uma amostra reduzida da população original (WATSON et al., 1997). Assim, a variação genética que constituiu cada nova população é originária de número reduzido de indivíduos precursores, o que denota um Efeito Fundador, o qual é um dos fenômenos característicos de deriva gênica.

Eventos populacionais como, por exemplo, deriva gênica, mutação, recombinação e seleção, estão relacionados a alterações no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (MISHMAR et al., 2003), e modificam a relação de não-aleatoriedade existente entre alelos de diferentes *loci* de uma população. Um parâmetro denominado Desequilíbrio de Ligação (LD, do inglês *Linkage Disequilibrium*) mede esta relação de não-aleatoriedade (HARTL, 2008). Como populações que possuem diferentes origens passaram por eventos populacionais distintos, este parâmetro varia entre elas. Deste modo, diferentes padrões de LD são acumulados durante o processo de formação das populações (CAMPBELL, TISHKOFF, 2010), de modo que

populações com origens diversas possuem padrões diferentes de LD. O esquema representado na Figura 10a demonstra os efeitos populacionais relacionados à teoria “*Out of Africa*”, evidenciando os diferentes padrões de LD encontrados entre populações africanas e outras populações.

Figura 10 – Esquemas demonstrando os movimentos migratórios e a formação de novas populações segundo a teoria “*Out of Africa*”



Legenda: (a) – Esquema ilustrando as ramificações da população ancestral africana para formação das populações de outros continentes, evidenciando o efeito gargalo e o aumento de LD associados a estes eventos. Kya: mil anos atrás; (b) – Distribuição dos macrohaplogrupos de mtDNA de acordo com as teorias migratórias. Fonte: (a) Adaptado de: CAMPBELL, TISHKOFF, 2010; (b) Adaptado de: ASUNCION, GOODRICH, 2013.

Através das análises filogenéticas do mtDNA, é possível compreender melhor a origem das populações humanas modernas. Mediante ao acúmulo de mutações que ocorreram com o avançar do tempo, as variações dos haplótipos do mtDNA relacionam-se com a movimentação e distribuição geográfica de indivíduos. À vista disso, conhecendo o padrão temporal e de acordo com comparações entre os haplogrupos mitocondriais conhecidos, foi possível encontrar um ancestral comum mais recente (MRCA – acrônimo para *Most Recent Common Ancestor*) e inferir a filogenia e a distribuição destes de acordo com os padrões migratórios ancestrais teorizados (Figura 10b, Figura 11). Assim, estima-se que o MRCA da linhagem materna do homem moderno viveu entre 100 e 200 mil anos atrás, na região da África Central, sendo denominado, portanto, “Eva Mitocondrial” (CANN et al., 1987; WATSON et al. 1997; INGMAN et al., 2000; HEINZ et al., 2017).

Através dos padrões de diferenças populacionais observados, estudos comparativos resultaram na separação de haplogrupos em ramos filogenéticos, como os que compõem a árvore representada na Figura 11. As primeiras linhagens mitocondriais humanas são as classificadas como pertencendo ao macrohaplogrupo L. Juntamente aos eventos migratórios, mutações foram ocorrendo ao longo do tempo, diferenciando e distanciando linhagens. Por exemplo, o macrohaplogrupo L, ao migrar para além da região africana, se subdividiu nos macrohaplogrupos N e M, os quais se ramificaram para Europa e Ásia, formando outros diferentes haplogrupos conforme as migrações foram ocorrendo (Figura 10b) (WITAS; ZAWICKI, 2004; PAKENDORF; STONEKING, 2005).

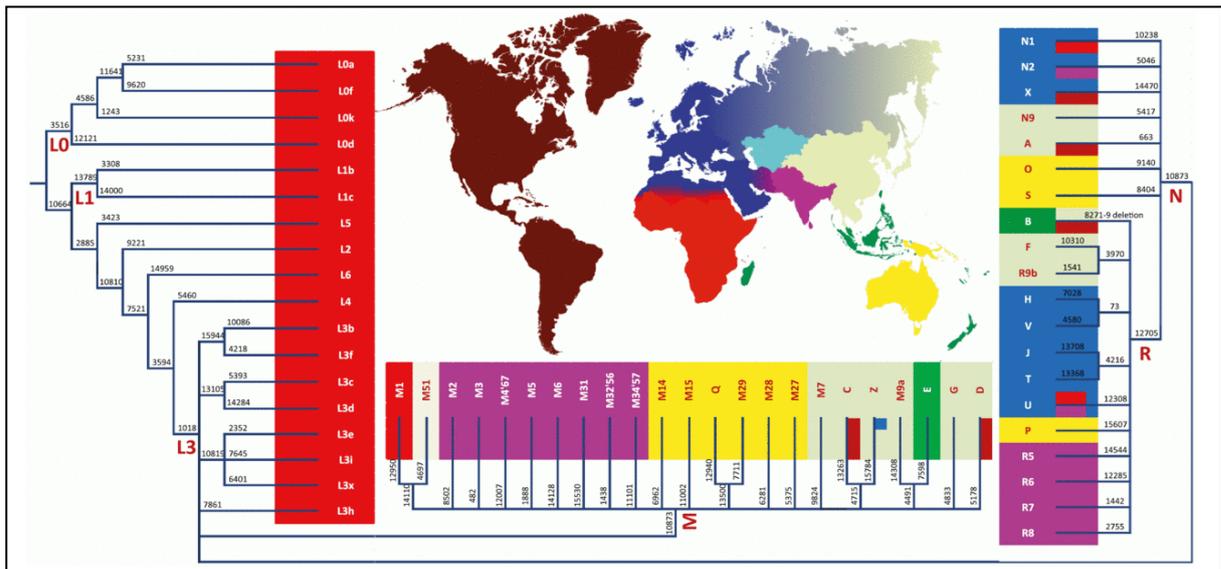
Para reunir informações das diferenças de diversidade e de distância gênica das populações com base na informação do mtDNA, pode-se recorrer às análises comparativas entre haplótipos de indivíduos de uma mesma população (análise intrapopulacional), e também em relação a grupos populacionais de diferentes localidades (análise interpopulacional).

Por meio da análise intrapopulacional, é possível inferir a frequência dos haplótipos observados e, com isso, estimar o nível de diversidade entre os indivíduos que formam a população estudada. Para obter estes resultados, considera-se alguns tipos de informações, como o número de sítios polimórficos presentes nas sequências analisadas. Estas informações auxiliam na compreensão da estrutura genética da população estudada. O parâmetro de não diferenciação, baseado em teste exato, também pode ser utilizado para a comparação de frequências de haplótipos e haplogrupos (MENDES-JUNIOR; SIMÕES, 2009).

Em relação às comparações interpopulacionais, pode-se utilizar o Índice de Fixação (F_{ST} – *Fixation index*) para calcular as distâncias entre populações. Este índice varia entre os valores zero e um, sendo um o maior valor de distanciamento, o que significa que não há relações ou

compartilhamento genético (HARTL, 2008). O parâmetro de não diferenciação, baseado em teste exato também pode ser utilizado para a comparação de frequências de haplótipos e haplogrupos (MENDES-JUNIOR; SIMÕES, 2009). Através das informações obtidas pela análise dos haplótipos, pela determinação dos haplogrupos e cálculos de distância, é possível inferir genealogia e possíveis origens geográficas ancestrais (KIVISILD, 2015) (Figura 11).

Figura 11 – Árvore contendo os haplogrupos mitocondriais principais e suas respectivas origens geográficas



Legenda: As cores correlacionam os haplogrupos presentes na árvore com a sua possível origem geográfica ancestral no mapa.

Fonte: KIVISILD, 2015.

Devido a constantes movimentos migratórios, mutações e outros eventos que alteram a diversidade populacional, estudos de ancestralidade devem ser produzidos com certa constância, já que a frequência haplotípica de cada população pode ser alterada com o avançar do tempo. Ainda, manter um banco de dados de informações genéticas atualizado se relaciona com a aplicabilidade da genética populacional aos campos da Genética Clínica e das Ciências Forenses.

1.6.3 Contribuições de estudos populacionais para a genética clínica

Danos gerados no mtDNA podem ocasionar variações na sequência de nucleotídeos que se relacionam a doenças, as quais são transmitidas pelas mães aos seus herdeiros. As

patologias vinculadas às alterações no genoma mitocondrial são classificadas em multissistêmicas, órgão-específicas ou as associadas a haplogrupos (STEWART; CHINNERY, 2015). Assim, no campo da Genética Clínica, o conhecimento das diferentes contribuições de linhagens ancestrais torna-se importante à medida que são encontrados relatos na literatura científica sobre associação de perfis ancestrais com a susceptibilidade a determinadas doenças.

A maioria das variações que estão relacionadas a doenças associadas ao mtDNA são consequência de alterações na região codificante, devido à mitocôndria participar de questões metabólicas da célula, de proliferação celular e controle apoptótico (ZONG; RABINOWITZ; WHITE, 2016; MOLNAR; KOVACS, 2017). No contexto das variações que são estudadas para definição de padrões de ancestralidade, tal informação contribui para análise da homogeneidade das amostras em estudos clínicos, visto que podem existir correlações entre as alterações fenotípicas relacionadas a doenças e a ancestralidade (LEAL et al. 2019).

Apesar do fenômeno de heteroplasmia ser um fenômeno de normal ocorrência em células e tecidos humanos (LI et al., 2010), a relação entre a presença de heteroplasmia em RC-mtDNA e a predisposição a doenças é teorizada, mas ainda não foi elucidada (ZHANG et al., 2019). Existem hipóteses que associam a presença de heteroplasmia a desregulação de genes mitocondriais (GUARDADO-ESTRADA et al., 2012), ao aumento na variação entre o número de cópias de mtDNA (KUMAR et al., 2017), bem como na diminuição do número de cópias (LEE et al., 2007). Essas questões podem estar relacionadas à alteração na eficiência da regulação da replicação do mtDNA (BENDALL; SYKES, 1995), por exemplo, resultando em uma proliferação celular exacerbada e diminuição de apoptose, os quais são fatores que acarretam em doenças.

1.6.4 Aplicações do mtDNA humano no âmbito forense

Como discutido anteriormente, características particulares do mtDNA o tornam uma ferramenta de potencial uso para a área das Ciências Forenses. Entre elas, o alto número de cópias por célula faz com que o mtDNA seja mais acessível do que o nDNA em condições em que houve degradação do material biológico. Além disso, seu pequeno tamanho e formato circular determinam que o mtDNA seja mais estável que o nDNA. Assim, estas características fazem com que o mtDNA esteja mais disponível do que o nDNA quando houverem condições ambientais hostis. Por isso, quando métodos baseados no uso do genoma autossômico,

características papiloscópicas ou antropológicas não podem ser aplicados devido a altos níveis de degradação ou quando houver quantidade exígua de material genético disponível, o mtDNA se torna a melhor opção para conseguir alguma informação sobre a identidade de indivíduos (BUDOWLE et al., 2003). Como exemplo, pode-se citar a aplicação de análises genéticas baseadas em mtDNA em casos de vestígios biológicos antigos (MERHEB et al., 2019), materiais biológicos submetidos a temperaturas extremas (BUŚ; NILSSON; ALLEN, 2016), e em casos onde as evidências são células anucleadas, como fios de cabelo sem bulbo (PARSON et al., 2015; SHIH et al., 2018). Portanto, a aplicação de metodologias baseadas na análise de mtDNA pode ser valiosa quando outras metodologias se mostram ineficazes, de modo que existem casos onde o genoma mitocondrial pode ser um dos únicos meios de se obter informações relevantes para a investigação forense.

Devido a estas particularidades, o mtDNA é comumente utilizado em casos de identificação de vítimas de desastres em massa (DVI – do inglês, *Disaster Victim Identification*) e identificação de desaparecidos quando há parentes relacionados maternalmente para servir como referência (BENDER; SCHNEIDER; RITTNER, 2000; ZIĘTKIEWICZ et al., 2012; AMORIM; FERNANDES; TAVEIRA, 2019). Como exemplo, podem ser citados os casos como o do atentado ao *World Trade Center*, ocorrido nos Estados Unidos em 2001, e da Tsunami, que ocorreu na Tailândia em 2004, em que algumas vítimas foram identificadas através de exames de mtDNA (GOODWIN; LINACRE; VANEZIS, 1999; BUDOWLE et al., 2003; DENG et al., 2005; GOODWIN, 2017). Outra aplicação do mtDNA envolve a análise de misturas de materiais genéticos de diferentes indivíduos, de modo que este método pode auxiliar na estimativa da quantidade de envolvidos através do uso de NGS (VOHR et al., 2017).

Por fim, apesar de fenômenos heteroplásmicos serem elementos complicadores durante o processamento e análise do mtDNA, a sua presença pode auxiliar em alguns casos de investigações forenses (BUDOWLE et al., 2003; AMORIM; FERNANDES; TAVEIRA, 2019). Por exemplo, os restos mortais do Czar Russo Nicholas II foram encontrados juntos de sua família, composta por ele, sua esposa e quatro filhos, sendo o mais novo do sexo masculino, e a equipe que trabalhava em sua casa. A análise do mtDNA foi particularmente útil neste caso pois a determinação da identidade do Czar foi realizada através da presença de uma heteroplasmia de posição compartilhada entre ele e seus relativos maternos, enquanto que seus herdeiros, empregados e esposa não possuíam (IVANOV et al., 1996).

Apesar dos exemplos anteriores, a aplicação deste marcador se torna limitada no âmbito de identificação humana já que a herança matrilinear conservada define um haplótipo, de modo que os indivíduos relacionados maternalmente compartilham da mesma sequência de mtDNA

(BUTLER, 2009). Assim, para ser apresentada como evidência em casos que envolvam identificação de indivíduos, a análise do mtDNA deverá ser respaldada por cálculos estatísticos que ponderem o grau de diferenciação entre indivíduos de matrinhagens diferentes em uma mesma população.

Através do cálculo de RMP (acrônimo para *Random Match Probability*, que usualmente é traduzido para Probabilidade de Coincidência Aleatória) pode-se inferir a diversidade das sequências de mtDNA de dada população. Calculado através da soma do quadrado das frequências haplotípicas, este método permite inferir a probabilidade de encontrar aleatoriamente, na população analisada, dois indivíduos não relacionados matematicamente que compartilham o mesmo haplótipo. (PRIETO et al., 2011). Deste modo, é possível utilizar este resultado para aferir matematicamente o peso de uma evidência obtida através da análise do mtDNA. Porém, como o resultado do cálculo de RMP é condicionado às particularidades genéticas de cada população, existe a necessidade de um banco de dados que contenha um número razoável de amostras para a população em questão. Isso demonstra a importância de bases de dados de mtDNA específicas para cada população e do uso desta ferramenta no âmbito de identificação humana.

1.7 Bancos de dados populacionais e padrões de qualidade na análise de sequências de mtDNA

Atualmente, existem diversos recursos e bases de dados que contêm informações relativas a sequências de mtDNA para aplicações populacionais e forenses. Dentre eles, a ferramenta online *Phylotree mt* é baseada em um algoritmo que estabelece relações filogenéticas de acordo com as variantes identificadas no mtDNA, identificando haplogrupos e servindo como base de consulta pública sobre as variações genéticas que os definem (VAN OVEN; KAYSER, 2009). Esta ferramenta considera sequências observadas tanto em estudos populacionais quanto forenses, e é atualizada constantemente. Atualmente, de acordo com o website phylotree.org, esta base de dados contempla mais de 24 mil sequências de mtDNA (phylotree.org).

Na interface entre genética populacional e forense, encontra-se a base de dados online EMPOP (*European DNA Profiling – EDNAP – Mitochondrial DNA Population Database*). Esta é uma base de dados online (<https://empop.online/>) que foi desenvolvida com o objetivo

de exercer a função de controle de qualidade e padronização do uso de mtDNA no âmbito forense, e se tornou um confiável repositório de amostras de referência de diferentes populações (PARSON; DÜR, 2007). Através deste repertório de amostras de diferentes localidades, a EMPOP se baseia em métodos de parcimônia para correlacionar haplótipos, de modo a encontrar o MRCA e o haplogrupo ao qual uma amostra pertence. Para alcançar este resultado, uma estimativa de máxima verossimilhança entre amostras é realizada através de um método matemático (RÖCK et al., 2013), o qual se baseia nos haplogrupos descritos na base de dados *Phylotree*. Outra ferramenta da EMPOP, chamada “*Haplogroup Browser*”, permite a visualização destes haplogrupos, relacionando-os com a sua distribuição geográfica.

Durante a análise de sequências de mtDNA, existem diferentes situações que podem implicar na redução da qualidade dos resultados. Parte desta perda de qualidade pode estar associada a manipulação indevida de amostras, o que promove contaminação das sequências. Além disso, falhas no alinhamento resultam na designação incorreta das variantes, interferindo na interpretação de resultados. Assim, para que haja uma padronização de metodologias, foram produzidas orientações e recomendações para garantir que tais perdas sejam evitadas e as análises de sequências de mtDNA serem mais equiparáveis, de modo a assegurar a qualidade das análises realizadas (CARRACEDO et al., 2000; PARSON; BANDELT, 2007; PARSON et al., 2014; GUSMÃO et al., 2017; SWGDAM mtDNA *Interpretation Guidelines*, 2019).

Com a finalidade de auxiliar pesquisadores, ferramentas computacionais foram desenvolvidas para avaliar se as análises das sequências de mtDNA estão respeitando os padrões recomendados internacionalmente (PARSON; BANDELT, 2007; PARSON et al., 2014; GUSMÃO et al., 2017; SWGDAM mtDNA *Interpretation Guidelines*, 2019). Atualmente, além de atuar como base de dados de sequências de mtDNA, a EMPOP também oferece ferramentas importantes para controle de qualidade de sequências de mtDNA, como EMPCheck e Network, que checam informações e a qualidade das amostras (ZIMMERMANN et al., 2014). Por exemplo, com o auxílio destas ferramentas, é possível avaliar se a nomenclatura dos haplótipos e o alinhamento das sequências estão corretos (RAKHA et al., 2016). Além da EMPOP, outras ferramentas que auxiliam no alinhamento de sequências também estão disponíveis online, como *Haplosearch* (FREGEL; DELGADO, 2011) e *mtDNAProfiler* (YANG et al., 2013).

1.8 A diversidade da população brasileira

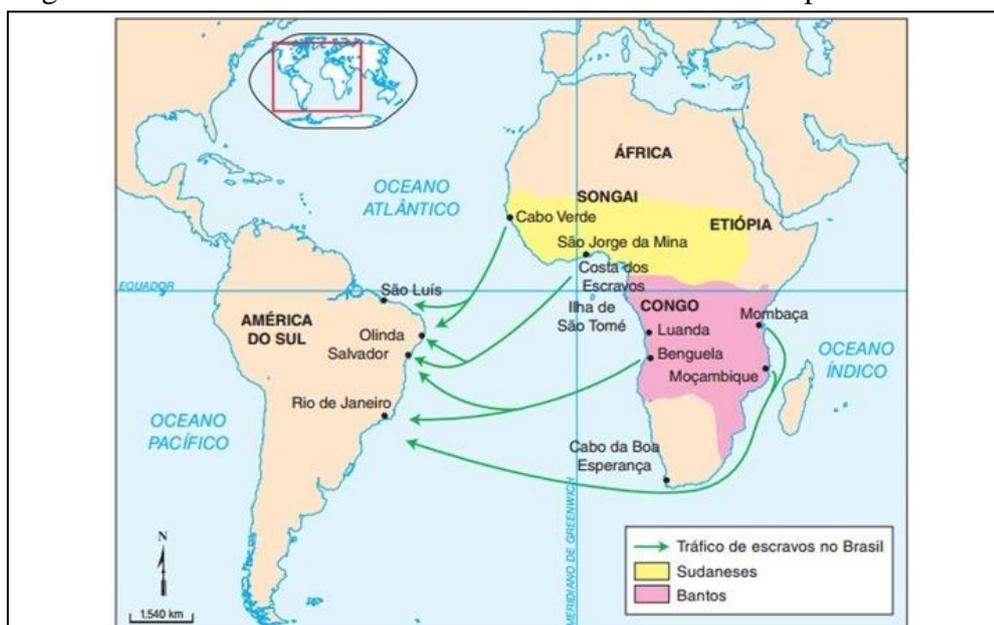
O Brasil possui uma população bastante heterogênea. Isso se deve principalmente aos eventos de migração que compuseram a história do país, ocorridos principalmente durante o período colonial.

Anteriormente à colonização portuguesa, a população brasileira era composta por nativos americanos. A teoria mais aceita atualmente acerca do povoamento inicial das Américas defende que as migrações humanas ocorreram através do Estreito de Bering há cerca de 25 mil anos (FAGUNDES et al., 2008; PEDERSEN et al., 2016). De acordo com esta teoria, ao chegar ao continente, os primeiros americanos se dividiram. Ao se separarem enquanto migravam, estes indivíduos foram dando origem a novos grupos, formando a população nativa de cada país, incluindo a do Brasil (MORENO-MAYAR et al., 2018). Este cenário mudou a partir do século XVI, com as grandes navegações e a consequente colonização do país pelos portugueses. Além dos portugueses, relatos históricos indicam que outros países da Europa, como França e Holanda, invadiam as terras brasileiras, também contribuindo para a heterogeneidade da população brasileira (PAPAVERO; VIERTLER, 2002; GRANGER, 2012).

A heterogeneidade genética brasileira foi consolidada a partir do século XVI, com as grandes navegações e a consequente colonização do continente americano por europeus. Sabe-se que a colonização brasileira não foi pacífica. Apesar do povo nativo ter sido maioria no início da colonização, os indígenas foram vítimas de violência e doenças, de modo que houve uma drástica redução na população nativa (ARRUTI, 1995; BARROSO JÚNIOR, 2013). Além disso, a mão-de-obra utilizada para exploração dos recursos naturais foi atribuída principalmente a escravos de origem africana. Assim, a migração forçada trouxe o componente africano para o país (MARQUESE, 2006). Após o período colonial, migrações europeias com destino ao Brasil continuaram ocorrendo periodicamente no decorrer do século XIX e início do século XX, principalmente para as regiões Sul e Sudeste (LEVY, 1974; LORENZ, 2008).

Devido aos eventos históricos supracitados, a formação genética da população brasileira tornou-se resultado da congruência de três grandes ancestralidades: a Ameríndia, formada pela população indígena nativa do Brasil; a Europeia, advinda de Portugal, França, Holanda, Itália e Alemanha; e a Africana, decorrente do envio de negros africanos como trabalhadores escravos para a colônia (GIOLO et al., 2012; SANTOS et al., 2016). Estudos baseados na análise de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) corroboram com este padrão de herança ancestral no Brasil, tanto em nível nacional quanto regional (MANTA et al., 2013). Apesar disso, existem algumas diferenças no grau de contribuição de cada grupo ancestral para a formação da população de cada região geográfica brasileira, como consequência de sua herança histórica particular (PENA et al., 2011; KEHDY et al., 2015; SOUZA et al., 2019).

Figura 12 – Rotas marítimas do tráfico de escravos africanos para o Brasil

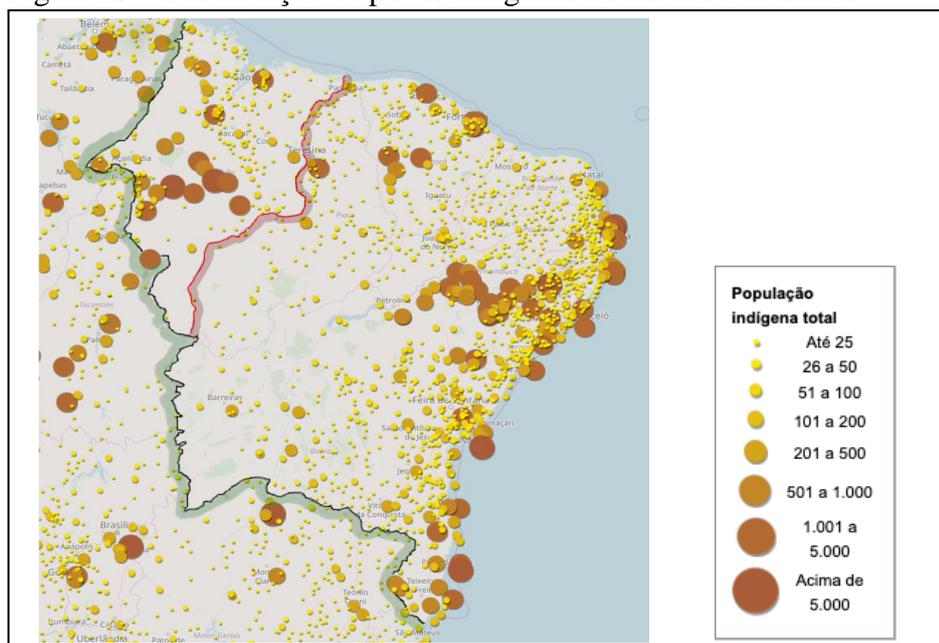


Fonte: CAMPOS; DOLHNIKOFF. Atlas: História do Brasil. Scipione. São Paulo. 2000.

Os principais locais de desembarque no país eram cidades portuárias do nordeste e sudeste do Brasil (Figura 12) (SOARES, 1998; BARROSO JÚNIOR, 2013). Mais especificamente no caso da região Nordeste, a composição da população atual é resultado de grande miscigenação desde o início do período colonial. Devido a sua localização costeira, eventos de migração foram concentrados nesta região. Os portos da região Nordeste foram o ponto de entrada não só dos europeus, mas também de escravos trazidos da África, principalmente de origem Subsaariana (Figura 12) (BARROSO JÚNIOR, 2013).

No Estado do Maranhão, a capital São Luís foi uma das principais localidades de entrada no país (CHAMBOULEYRON, 2006) (Figura 12). Os últimos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Censo Demográfico 2010) demonstraram que a composição étnica do Estado do Maranhão é predominante de autodeclarados pardos (68,8%), seguida de brancos (24,9%), negros (5,5%) e amarelos e indígenas (0,7%). Apesar da fração de autodeclarados índios ser a menor dentre as etnias, dados do mesmo Instituto demonstram que há uma vasta distribuição indígena no Maranhão, bem como na região nordeste brasileira, como pode ser visualizado na Figura 13.

Figura 13 – Distribuição de povos indígenas no nordeste brasileiro



Legenda: O Nordeste está demarcado em verde e o Maranhão, demarcado em vermelho.
 Fonte: Adaptado de IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://indigenas.ibge.gov.br/mapas-indigenas-2>. Data de acesso: 21 jan. 2020.

Apesar de haverem dados históricos e demográficos, existem poucos estudos sobre a herança genética ancestral de cada Estado Brasileiro, principalmente relacionado à herança materna (mtDNA). Por exemplo, em relação à região Nordeste, um dos únicos trabalhos referentes a esta Região apresenta dados de mtDNA para todos os Estados nordestinos, excluindo o estado do Maranhão (SCHAAN et al., 2017). A população do Estado do Maranhão foi pouco estudada (CARVALHO et al., 2008). Assim, a importância deste estudo está em investigar melhor a herança ancestral materna de indivíduos nascidos no Maranhão, seguindo recomendações metodológicas internacionais. Deste modo, as aplicações dos resultados apresentados neste trabalho incluem a contribuição com questões históricas e demográficas deste local, bem como a possibilidade de utilizar os dados genéticos obtidos para auxiliar em questões das áreas Clínica e Forense.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a variabilidade genética e o perfil de ancestralidade matrilinear com base na análise da região controle do DNA mitocondrial de uma amostra de indivíduos do Estado do Maranhão, com a perspectiva de contribuir para a construção de uma base de dados populacional e forense deste local.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar as variações na sequência nucleotídica e a presença de heteroplasmia em RC-mtDNA da amostra estudada;
- b) Caracterizar a diversidade nucleotídica e haplotípica da amostra estudada, baseando-se na análise do RC-mtDNA;
- c) Avaliar a aplicabilidade deste marcador molecular para identificação humana no âmbito da população estudada;
- d) Determinar os haplogrupos e a origem ancestral materna da amostra estudada; e
- e) Relacionar os dados obtidos para a amostra maranhense com os dados da literatura para a região nordeste brasileira, bem como para outras localidades do país, através de cálculos de F_{ST} e de probabilidade de não-diferenciação.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostra estudada

No presente estudo foi utilizado um total de 151 amostras biológicas de indivíduos não relacionados, do sexo masculino e nascidos no Estado do Maranhão. As amostras são provenientes de sangue total, coletado entre os anos de 2012 e 2016 e armazenadas nos próprios tubos de coleta de sangue com EDTA ou em cartões FTA[®].

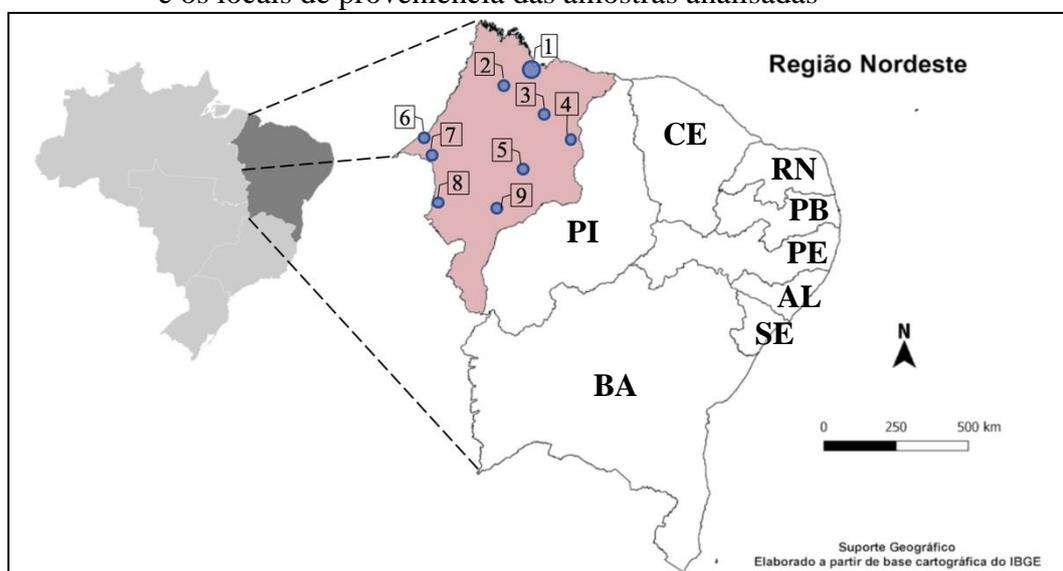
Esta pesquisa foi desenvolvida no âmbito dos projetos “Análise de biomarcadores de predisposição genética e ancestralidade para Diabetes Mellitus tipo 1 e suas complicações crônicas para o Estado do Maranhão”, sob a responsabilidade da Dra. Rossana Santiago de Sousa Azulay, do Serviços de Diabetes do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA), e do Estudo Multicêntrico de Diabetes Mellitus do tipo 1, no âmbito do projeto “Estratégias de rastreamento e diagnóstico das complicações crônicas microvasculares do diabetes em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 associado a análise de biomarcadores de predisposição genética e ancestralidade para a doença e suas complicações crônicas”, sob responsabilidade da Prof.^a Dra. Marília de Brito Gomes, sendo desenvolvido com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Como complementação, amostras do projeto “DNA mitocondrial: Identificação de linhagens maternas na população Brasileira”, sob a responsabilidade da Dra. Tatiana Lucia Santos Nogueira, do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), foram cedidas para esse estudo por meio de colaboração com o Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ, onde o presente estudo foi desenvolvido.

As coletas foram realizadas em nove localidades do Maranhão (Figura 14). A maior parte da amostra utilizada neste estudo foi obtida de uma amostra inicial de 474 indivíduos da cidade de São Luís do Maranhão, constituída de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 dos ambulatórios do HU-UFMA (n= 33) e indivíduos controle provenientes do banco de sangue do Centro de Hematologia – Hemomar, (n = 105). Adicionalmente, amostras de militares do Exército brasileiro (n = 13) provenientes de outras oito cidades do Maranhão foram adicionadas a este quantitativo, dentre elas São Vicente, Coroatá, Caxias, Tuntum, Açailândia, Imperatriz, Estreito e São Raimundo das Mangabeiras.

Em todas as coletas realizadas, os participantes assinaram consentimento individual

informado, concordando com a sua participação nos estudos, sob condições estritamente confidenciais. O uso das amostras biológicas foi autorizado para fins de pesquisa, conforme aprovado em comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA), através do parecer de número 2.441.473 - CAAE: 59795116.9.0000.5086, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto – CEP HUPE/UERJ, sob o número de parecer 1.542.187 - CAAE: 53563115.2.1001.5259 (Anexos A e B).

Figura 14 – Mapa evidenciando a região nordeste brasileira, o Estado do Maranhão e os locais de proveniência das amostras analisadas



Legenda: O Estado do Maranhão, em rosa, e os locais de proveniência das amostras analisadas são representados pelos círculos azuis, onde 1 – São Luís (n=142), 2 – São Vicente (n=1), 3 – Coroatá (n=1), 4 – Caxias (n=2), 5 – Tuntum (n=1), 6 – Açailândia (n=1), 7 – Imperatriz (n=1), 8 – Estreito (n=1) e 9 – São Raimundo das Mangabeiras (n=1). PI – Piauí; CE – Ceará; RN – Rio Grande do Norte; PB – Paraíba; PE – Pernambuco; AL – Alagoas; SE – Sergipe; BA – Bahia.

Fonte: A autora, 2020. Adaptado de <https://mapchart.net/>.

3.2 Extração, amplificação e purificação do DNA mitocondrial

O DNA foi extraído pelo método resina quelante Chelex 100 (Bio-Rad) e amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), juntamente com primers desenhados especificamente para abranger a região controle do mitogenoma (Quadro 2 e Figura 15a) (CHAITANYA et al., 2016; CAVALCANTI et al., 2017; POLETTTO et al., 2019; DOS REIS et al., 2019). Os reagentes utilizados nas reações de amplificação por PCR estão listados no

Quadro 3.

Quadro 2 – Lista dos primers utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento, sua orientação e sequência de bases nucleotídicas

Primer	Orientação	Aplicação	Sequência (5' – 3')
L15900	Senso	Amplificação e Sequenciamento	TAA ACT AAT ACA CCA GTC TTG TAA ACC
L16555	Senso	Sequenciamento	CCC ACA CGT TCC CCT TAA AT
H639	Antissenso	Amplificação e Sequenciamento	GGG TGA TGT GAG CCC GTC TA
H159	Antissenso	Sequenciamento	AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGA ATC

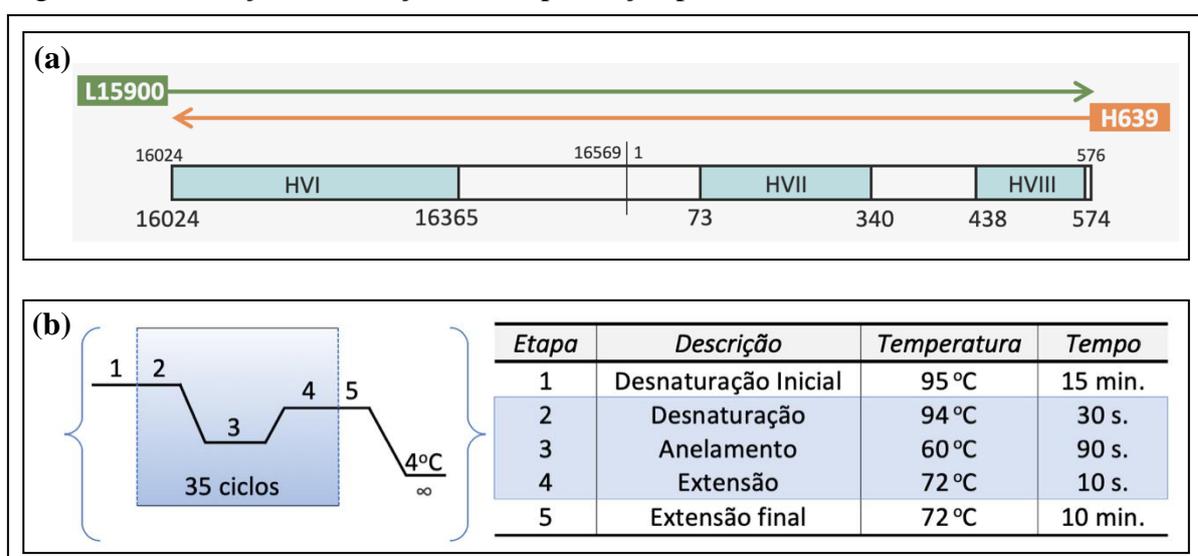
Fonte: CHAITANYA et al., 2016; CAVALCANTI et al., 2017; POLETTTO et al., 2019; DOS REIS et al., 2019.

Quadro 3 – Reagentes utilizados nas reações de amplificação por PCR e as devidas quantidades utilizadas por amostra

Reagentes para a Reação de PCR	Volume por amostra
Tampão Qiagen Multiplex 2x	2,5 µl
Mistura de Primer (L15900 + H639) Concentração: 2,5 µM	0,5 µl
Água deionizada	1,5 µl
DNA extraído (Concentração 1 ng/µl)	0,5 µl
TOTAL	5 µl

Fonte: A autora, 2020.

Figura 15 – Condições das reações de amplificação por PCR



Legenda: (a) – Posição de anelamento dos primers e sentido de sua extensão; (b) – Etapas do termociclador.

Fonte: A autora, 2020.

As reações foram submetidas à amplificação por PCR em termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições de temperatura, tempo e ciclagem que foram empregadas no termociclador estão listadas na Figura 15b.

A amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de Agarose 1,2% utilizando marcador de massa molecular *Low mass DNA ladder* (50 pb, Promega, Madison, USA) para avaliação dos produtos de PCR (amplicons). Para eliminar os resíduos da reação de amplificação, tais como nucleotídeos, primers não-incorporados e tampão de reação, os amplicons foram purificados através do uso da enzima ExoSAP-IT (Applied Biosystems).

3.3 Reação de sequenciamento e eletroforese capilar

Após a purificação, o kit comercial *Big Dye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems) foi utilizado para as reações de sequenciamento, seguindo o protocolo encontrado no Quadro 4. Para todas as amostras, foi utilizado um par de primers senso e antissenso (L15900 e H639), de modo a abranger toda a extensão de RC-mtDNA, conforme demonstrado na Figura 16a. Para amostras em que foi observado a presença de heteroplasmia de comprimento, foram utilizados mais dois primers internos (L16555 e H159), em reações separadas. Deste modo, os primers internos se anelam em regiões onde não houve cobertura devido à heteroplasmia, como mostrado na Figura 16b. Deste modo, as informações obtidas pelos primers externos e internos se complementam, abranger toda a extensão de RC-mtDNA.

Terminado o preparo da reação de sequenciamento, os tubos foram submetidos a etapas de calor e resfriamento por meio de um termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). As condições de temperatura, tempo e ciclagem estão listadas na Figura 16c.

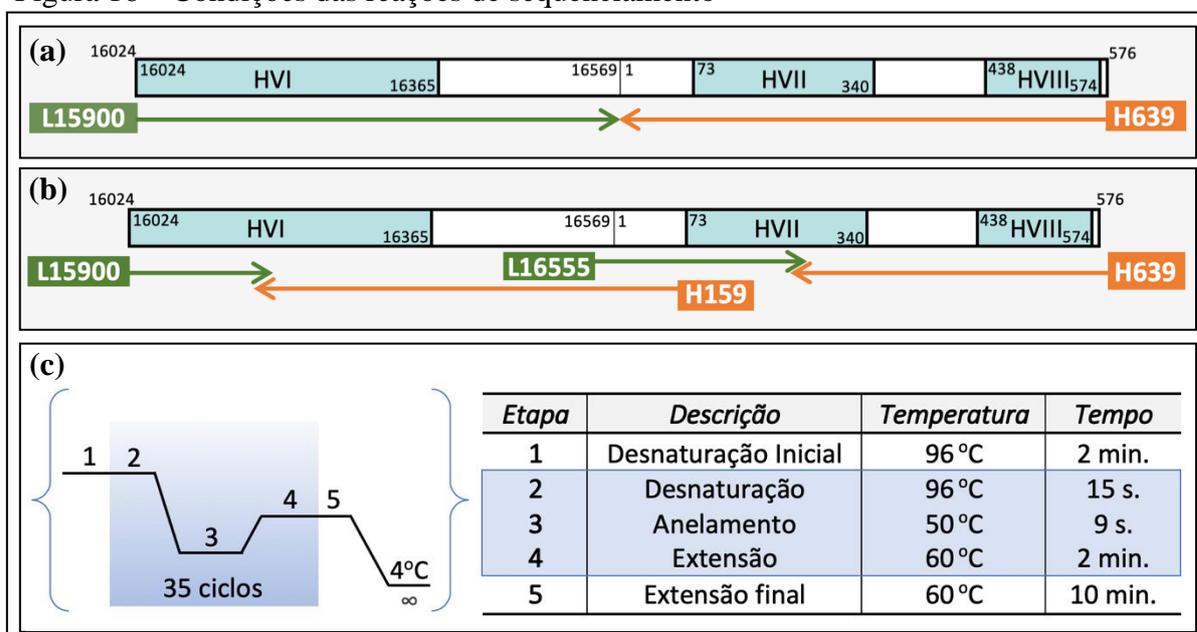
Colunas de resina Sephadex (GE Healthcare Life Sciences) foram utilizadas para purificação das amostras sequenciadas, de modo a remover os resíduos deste último processo, tais como nucleotídeos, vestígios de fluorescência, primers não-incorporados e tampão de reação. Ao produto purificado da reação de sequenciamento foram adicionados 10 µL do reagente Formamida altamente deionizada (Hi-Di, do inglês *Highly deionized*) (Applied Biosystems). Por fim, as amostras foram aplicadas em placa de 96 poços (Applied Biosystems) e submetidas à Eletroforese Capilar com detecção de fluorescência induzida por laser utilizando-se a plataforma *Applied Biosystems™ 3500 Series Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Quadro 4 – Reagentes utilizados nas reações de sequenciamento e as devidas quantidades utilizadas por amostra

Reagentes	Volume do reagente para reação com primer H639	Volume do reagente para reação com outros Primers
Big Dye Terminator v3.1	1 µl	0,5 µl
Tampão 5x Primer	0,5 µl	0,75 µl
Concentração: 2,5 µM	0,5 µl	0,5 µl
Água deionizada	2 µl	2,25 µl
Produto de PCR purificado	1 µl	1 µl
TOTAL	5 µl	5 µl

Fonte: A autora, 2020.

Figura 16 – Condições das reações de sequenciamento



Legenda: (a) – Primers utilizados em amostras que não possuíam heteroplasmia de comprimento. Esquema demonstra a posição de anelamento dos primers e sentido de sua extensão; (b) – Primers utilizados em amostras que apresentaram heteroplasmia de comprimento, juntamente com esquema demonstrando a posição de anelamento dos primers e sentido de sua extensão; (c) – Etapas do termociclador.

Fonte: A autora, 2020.

3.4 Análise dos dados genéticos

A análise das sequências de mtDNA foi feita com base em ferramentas computacionais, de acordo com as atuais diretrizes da ISFG (PARSON et al., 2014) e SWGDAM (SWGDAM mtDNA *Interpretation Guidelines*, 2019).

Os eletroferogramas foram analisados usando o programa *SeqScape® Software v2.5 (Applied Biosystems)*, comparando as sequências da região controle do mtDNA das amostras estudadas com a sequência referência de Cambridge revisada (rCRS) (ANDREWS et al., 1999). Esta sequência está disponível no GenBank sob a numeração NC_012920.1.

Para determinar os haplogrupos mitocondriais, foi utilizada a base de dados populacional EMPOP mtDNA *database v4/R12* (PARSON; DÜR, 2007. HUBER; PARSON; DÜR, 2018). Ainda, todas as amostras foram submetidas a um rigoroso controle de qualidade através de ferramentas disponibilizadas na EMPOP, *Phylogenetic Alignment* e *EMPcheck*.

Os haplótipos foram convertidos em sequências nucleotídicas e alinhados com rCRS através da ferramenta online HaploSearch (FREGEL; DELGADO, 2011).

O programa de computador Arlequin (versão 3.5.2.2) foi utilizado para realizar as análises intrapopulacionais, como os cálculos das diversidades nucleotídica e haplotípica, RMP, número médio de diferenças pareadas (NMDP), cálculos de diferenciação populacional ($\alpha=95\%$) e outras inferências quantitativas (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005. EXCOFFIER; LICHER, 2010).

Os resultados obtidos para a amostra do Maranhão foram comparados com os resultados de outros estudos que analisaram outras localidades do país. Estes estudos descreveram a ancestralidade materna de Estados do nordeste brasileiro (SCHAAN et al., 2017; ALVES-SILVA et al., 2000; BARBOSA et al., 2008), do Rio de Janeiro (BERNARDO et al., 2014; SIMÃO et al., 2018), do Espírito Santo (SANCHES et al., 2014; DOS REIS et al., 2019), de São Paulo (PRIETO et al., 2011), de Brasília (FREITAS et al., 2019), de Santa Catarina (PALENCIA et al., 2010) e do Paraná (POLETTTO et al., 2019), além da região sudeste brasileira como um todo (FRIDMAN et al., 2014) e da região Norte (NOGUEIRA et al., 2017).

O software Arlequin (versão 3.5.2.2) também foi utilizado para realizar comparações estatísticas acerca das distribuições das linhagens ameríndias e africanas entre as amostras maranhenses e de diferentes estudos, e para o cálculo de F_{st} . O F_{st} foi realizado através da análise de sequências nucleotídicas de RC-mtDNA entre Maranhão, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina, com número de permutações de 10.100. O teste estatístico utilizado foi baseado na probabilidade de não-diferenciação das amostras analisadas com limiar de significância (α) de 0,05 e número de permutações de um milhão. Assim, assumindo que a hipótese nula representa a não-diferenciação, o valor retornado pelo programa maior que o limiar de significância indica que não há diferenciação entre as amostras comparadas, enquanto que um valor menor sugere diferenciação. A correção de Bonferroni foi aplicada nos testes com a finalidade de evitar erros estatísticos do tipo 1.

4 RESULTADOS

Este estudo permitiu a elaboração de uma base de dados com 151 haplótipos provenientes da análise da RC-mtDNA de indivíduos nativos do Estado do Maranhão (Apêndice A). Ao longo deste estudo, os dados obtidos foram apresentados nos eventos científicos Interforensics (São Paulo, SP, maio de 2019 – Apêndice H) e XXV Congresso Nacional de Criminalística (Goiânia, GO, outubro de 2019 – Apêndice I). Ainda, um resumo deste estudo foi submetido ao evento 12th *Haploid Markers Conference* (Budapeste, Hungria, 2020 – Apêndice J).

4.1 Caracterização dos haplótipos de origem materna da amostra maranhense

No presente estudo foi analisada a RC-mtDNA de 151 indivíduos nativos do Estado do Maranhão. Na análise das sequências, foram identificados 144 diferentes haplótipos (Tabela 1). Dentre os haplótipos que foram compartilhados por mais de um indivíduo, cinco sequências eram diferentes (3,3% da amostra total). Verificou-se também que os dois haplótipos mais frequentes encontrados na amostra de indivíduos maranhenses são compartilhados entre três indivíduos cada.

Por meio de análise realizada através do software Arlequin, foram identificadas 227 diferentes variações nucleotídicas dentre as sequências analisadas, as quais correspondem a 209 sítios polimórficos (Tabela 1). Dentre estas variações, a maioria corresponde a substituições, que compõem 201 possibilidades de diferenças em relação à rCRS, enquanto que as outras 26 denotam inserções ou deleções (Tabela 1). O fenômeno de heteroplasmia foi bastante frequente na amostra de indivíduos maranhenses, sendo encontrado em 42,4% das amostras analisadas. A região HV3 foi a que apresentou maior concentração de polimorfismos que podem estar relacionados à heteroplasmia de comprimento, havendo 51% das amostras que apresentaram o polimorfismo caracterizado pela deleção de blocos de dinucleotídeo AC em até três repetições entre as posições 513 e 524 (Tabela 2). Quinze amostras apresentaram heteroplasmia de posição, sendo mais frequente a heteroplasmia envolvendo os nucleotídeos Citosina e Timina (IUPAC: Y), presente em 4% das amostras maranhenses.

Tabela 1 – Caracterização da amostra maranhense de acordo com os parâmetros listados para RC-mtDNA e para cada segmento de desta região

Parâmetro	RC	HV1	HV2	HV3	Fora de HVR
<i>Tamanho amostral</i>	151	151	151	151	151
<i>Haplótipos únicos</i>	144	108	95	31	-
<i>Sítios polimórficos</i>	209	98	56	28	27
<i>Variações nucleotídicas</i>	227	109	60	29	29
<i>Substituições</i>	201	107	49	16	29
• <i>Transições</i>	174	93	43	15	22
• <i>Transversões</i>	27	14	6	1	6
<i>Indels</i>	26	2	11	13	0

Nota: Resultados obtidos através de análise utilizando o software Arlequin.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 2 – Número de amostras que apresentam polimorfismos entre as posições listadas.

	HV1	HV2	HV3
<i>Polimorfismo entre as posições 16184 e 16193 (Poli-C)</i>	49	-	-
<i>Polimorfismo entre as posições 303 e 315 (Poli-C)</i>	-	2	-
<i>Polimorfismo entre as posições 513-524 (Poli-AC)</i>	-	-	9
<i>Polimorfismo entre as posições 513 e 524 (Del-AC)</i>	-	-	77
<i>Polimorfismo entre as posições 568-573 (Poli-C)</i>	-	-	4

Nota: Resultados provenientes de contagem manual feita através do software SeqScape, através de comparação entre as sequências analisadas com rCRS. Cada sequência pode apresentar polimorfismos em mais de uma posição. As posições específicas foram listadas pois estas são regiões onde os polimorfismos que resultam em heteroplasmia de comprimento são mais comumente observados. Porém, cabe ressaltar que a presença destes polimorfismos não necessariamente resulta em heteroplasmia de comprimento.

Fonte: A autora, 2020.

As informações acerca da diversidade molecular da RC-mtDNA são encontradas na Tabela 3. A diversidade haplotípica encontrada para a amostra de indivíduos maranhenses foi $0,999211 \pm 0,000001$. A probabilidade de dois indivíduos desta amostra, selecionados aleatoriamente, compartilharem o mesmo haplótipo é 0,74%.

Os índices de diversidade encontrados na amostra maranhense estão listados nas próximas tabelas, juntamente com os resultados de outros Estados e Regiões Brasileiras advindos de outros estudos da literatura científica, os quais analisaram RC-mtDNA (Tabela 3) ou HVR (Tabela 4) (PALENCIA et al., 2010; SANCHES et al., 2014; FRIDMAN et al., 2014; SCHAAN et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2017; POLETTTO et al., 2019; SIMÃO et al., 2018; DOS REIS et al., 2019; FREITAS et al., 2019).

Tabela 3 – Índices de diversidade molecular obtidos para a análise de RC-mtDNA da amostra referente ao Estado do Maranhão em comparação com dados de outros estudos para estados brasileiros

Local	Diversidade Haplótipica	NMDP	Diversidade Nucleotídica	RMP (%)
MA N=151	0,9992 ± 0,0000	17,941915 ± 8,007058	0,015807 ± 0,007809	0,74
SC N=80	0,9930 ± 0,0035	15,003481 ± 6,7796	0,0132 ± 0,0066	1,93
PR N=122	0,9976 ± 0,0016	16,1710 ± 7,2570	0,0143 ± 0,0071	1,06
RJ N=205	0,9994 ± 0,0006	18,59077 ± 8,273874	*	0,24
ES N=97	0,9994 ± 0,0016	17,4896 ± 7,8374	0,0155 ± 0,0077	1,09
DF N=306	0,9988	*	*	*

Legenda: *Dados não informados pelos autores

Fonte: MA – Este estudo, 2020; SC – PALENCIA et al., 2010; PR – POLETTTO et al., 2019; RJ – SIMÃO et al., 2018; ES – SANCHES et al., 2014; DF – FREITAS et al., 2019.

Os valores de diversidade haplotípica, NMDP e diversidade nucleotídica do Estado do Maranhão estão entre os maiores encontrados dentre os Estados brasileiros listados. Quanto ao valor de RMP, este só é menos discriminativo quando comparado ao valor encontrado para o Rio de Janeiro (Tabela 3) e para o Sudeste (Tabela 4).

Os índices de diversidade observados por este estudo para a amostra de indivíduos nativos do Estado do Maranhão também foram apresentados na Tabela 4 juntamente com os resultados obtidos por Schaan e colaboradores (2017) para a região nordeste brasileira, na qual o Maranhão está localizado geograficamente. Cabe informar que o estudo de Schaan e colaboradores analisou somente HVR e, portanto, para realizar uma comparação párea, os resultados de índices de diversidade apresentados na Tabela 4 para o Maranhão são baseados apenas na análise de HVR. Em relação aos valores de NMDP e de diversidade nucleotídica, a amostra referente a indivíduos do Maranhão apresenta maior NMDP, e o Nordeste maior diversidade nucleotídica. Apesar disso, a diversidade haplotípica observada para a região nordeste e a encontrada no presente estudo foi praticamente a mesma, em torno de 99,8%.

Tabela 4 – Índices de diversidade molecular obtidos ao analisar HVR da amostra maranhense em comparação com dados de outros estudos para regiões brasileiras

Local	Diversidade Haplótipica	NMDP	Diversidade Nucleotídica	RMP (%)
MA N=151	0,9988 ± 0,0010	16,464636 ± 7,373524	0,021693 ± 0,010753	0,79
NE N=767	0,998 ± 0,0004	11,041	0,1006	*
SE N=290	0,9966 ± 0,0010	14,8942 ± 6,6820	0,0133 ± 0,0066	0,68

Legenda: *Dados não informados pelos autores.

Fonte: MA – A autora, 2020; NE – SCHAAN et al., 2017; SE – FRIDMAN et al., 2014.

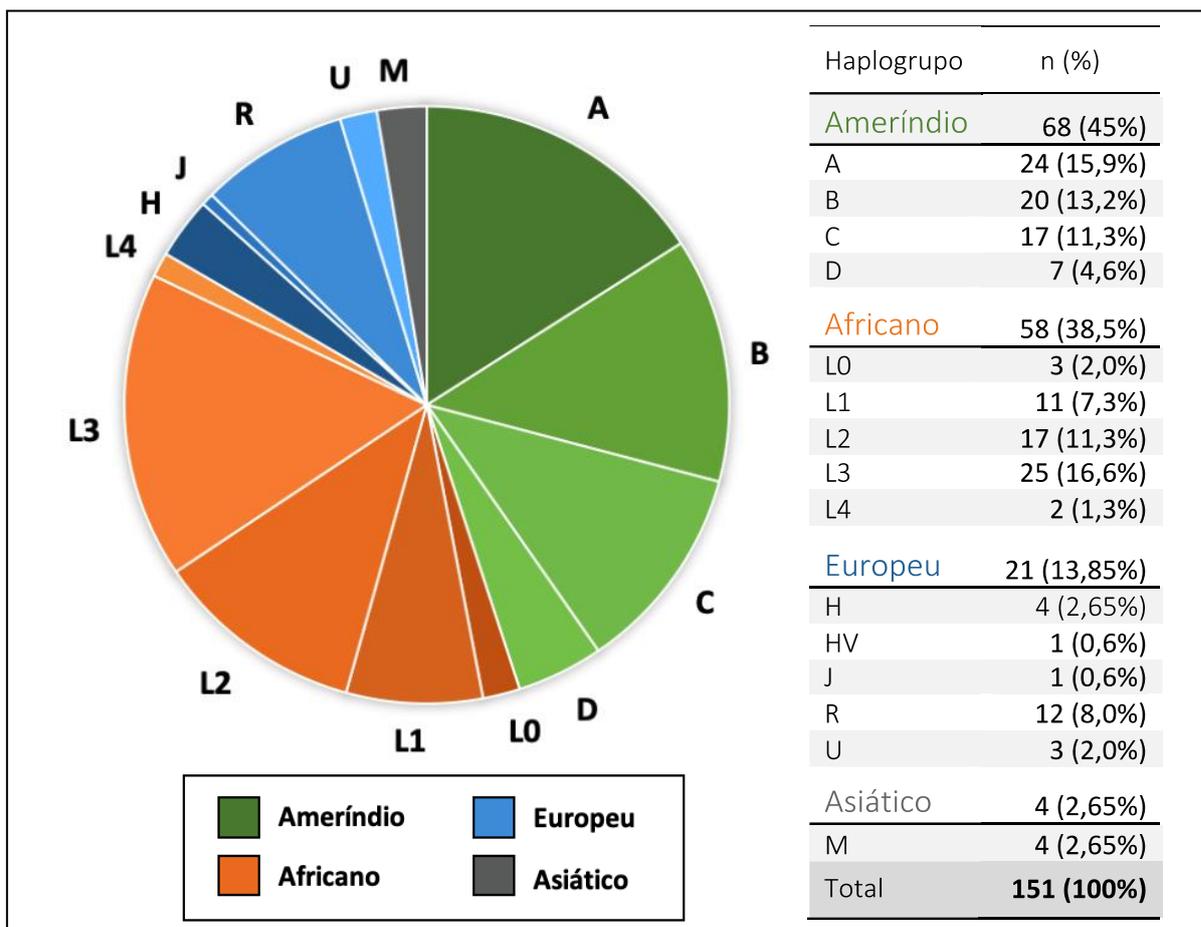
4.2 Distribuição dos haplogrupos mitocondriais na amostra maranhense

Nas 151 amostras analisadas para RC-mtDNA para a amostra de indivíduos do Estado do Maranhão, foram identificados 69 haplogrupos distintos cuja distribuição é apresentada no Gráfico 1. A ancestralidade ameríndia é predominante, configurando 45% do total de indivíduos analisados. Elevada contribuição africana também foi observada, representada por 38,5% dos indivíduos. As contribuições europeia e asiática são menores, evidenciadas em 13,85% e 2,65% dos indivíduos, respectivamente.

Em relação aos indivíduos que compõem a fração africana (n=58), 44 apresentaram haplogrupos distintos. O subhaplogrupo L2a1 foi o mais frequente, estando presente em seis indivíduos não relacionados matematicamente, caracterizando 10% das amostras desta ancestralidade (Tabela 6). Apesar disso, o haplogrupo L3 compõe a maioria dos indivíduos de ancestralidade materna africana (43%), enquanto que o haplogrupo L2 é o segundo mais observado nesta amostra de indivíduos (29%) (Tabela 6). Além disso, para a amostra total do Maranhão (n=151), o haplogrupo L3 foi o mais frequente (16,5%) (Gráfico 1).

Para os indivíduos pertencentes a ancestralidade materna ameríndia (n=68), o macrohaplogrupo A foi o mais frequente, presente em 24 indivíduos desta linhagem (35%) (Tabela 5), o que corresponde a 15,9% da amostra total de indivíduos maranhenses (Gráfico 1). Apesar disso, o haplogrupo mais frequente para a ancestralidade materna ameríndia foi o B4b, encontrado em 15 indivíduos (22%), seguido pelo haplogrupo A2+(64), presente em 14 amostras (21%) (Tabela 5).

Gráfico 1 – Macrohaplogrupos de mtDNA que constituem a amostra maranhense



Fonte: A autora, 2020.

Tabela 5 – Haplogrupos de mtDNA de origem ameríndia encontrados na amostra maranhense

Haplogrupo	n	Frequência dentro das linhagens ameríndias (n=68)	Haplogrupo	n	Frequência dentro das linhagens ameríndias (n=68)
A	24	35%	C	17	25%
A2	5	7%	C1	2	3%
A2+(64)	14	21%	C1+16311	1	1%
A2+(64)+@153	5	7%	C1b	7	10%
B	20	29%	C1b2	3	4%
B2	2	3%	C1b8	2	3%
B2b3a	2	3%	C1d	1	1%
B2i1	1	1%	C1d+194	1	1%
B4b	15	22%	D	7	10%
			D1	2	3%
			D1f	1	1%
			D1f1	2	3%
			D4h2	1	1%
			D4h3a	1	1%

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 6 – Haplogrupos de mtDNA de origem africana encontrados na amostra maranhense

Haplogrupo	n	Frequência dentro das linhagens africanas (n=58)	Haplogrupo	n	Frequência dentro das linhagens africanas (n=58)
L0	3	5%	L3	25	43%
L0a1b	1	2%	L3	1	2%
L0a2a2	1	2%	L3b1a	1	2%
L0d1b1c	1	2%	L3b1a9a	1	2%
L1	11	19%	L3b3	2	3%
L1b	1	2%	L3d1b	1	2%
L1b1a+189	2	3%	L3d2	1	2%
L1b1a10	1	2%	L3d3a	1	2%
L1c1'2'4'5'6	1	2%	L3e1	1	2%
L1c1a2	1	2%	L3e1a	1	2%
L1c1c	1	2%	L3e1a3b	1	2%
L1c2a1a	1	2%	L3e1b2	1	2%
L1c3a	1	2%	L3e2	1	2%
L1c3b	1	2%	L3e2a1	1	2%
L1c4	1	2%	L3e2b	1	2%
L2	17	29%	L3e2b+152	1	2%
L2a1	6	10%	L3e3	3	5%
L2a1+16189+(16192)	1	2%	L3e4a	4	7%
L2a1a2	1	2%	L3f1b1	1	2%
L2a1c+16086	1	2%	L3k1	1	2%
L2a1c1	1	2%	L4	2	3%
L2a1f3	1	2%	L4b2	1	2%
L2b2	3	5%	L4b2b1	1	2%
L2b2a	1	2%			
L2b3c	1	2%			
L2d+16129	1	2%			

Fonte: A autora, 2020.

De acordo com a ferramenta *Haplogroup Browser*, da base de dados EMPOP, até o momento do presente estudo, dos 151 haplótipos analisados, 65 não possuem correspondência com outros haplótipos armazenados nesta base de dados (data da última análise: 05 jan. 2020).

4.3 Comparação populacional entre a amostra maranhense e dados já publicados para a população brasileira

No presente estudo, os haplótipos definidos para uma amostra da população do Maranhão foram estratificados nas linhagens Africana, Europeia, Asiática e Nativo Americana com base na definição dos haplogrupos. A Tabela 7 reúne as frequências de cada haplogrupo

encontrado para a amostra de indivíduos maranhenses em relação com as frequências dos haplogrupos encontrados por outros estudos para outras regiões brasileiras (Norte, Sudeste, Centro-oeste, Sul e Nordeste) e alguns outros Estados do nordeste do Brasil (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Alagoas). Apesar de existirem dados acerca dos Estados Paraíba, Sergipe e Bahia (SCHANN *et al.*, 2017), estes não foram considerados devido ao baixo tamanho amostral.

Com o objetivo de avaliar padrão de diferenciação, as distribuições das frequências dos haplogrupos africanos e ameríndios foram comparadas utilizando-se o teste exato de Fisher entre a amostra de indivíduos do Maranhão, de outros estados nordestinos e outras regiões brasileiras.

Ao comparar a distribuição das linhagens ameríndias entre a amostra de indivíduos do Maranhão e as cinco regiões do Brasil, verificou-se diferenciação somente entre o Maranhão e a região Norte ($p=0,00019 \pm 0,0001$; $\alpha = 0,0009$), enquanto que nenhuma diferenciação foi observada entre esse Estado e as regiões Nordeste ($p = 0,97834 \pm 0,0005$), Sudeste ($p = 0,27854 \pm 0,0040$), Centro-oeste ($p = 0,62392 \pm 0,0033$) e Sul ($p = 0,10411 \pm 0,0022$). Todos os resultados deste teste estão representados em uma tabela em formato de matriz no Apêndice C.

Em relação a distribuição das linhagens africanas, ao comparar a amostra de indivíduos do Maranhão e três regiões do Brasil (Nordeste, Sul e Sudeste), verificou-se que não há diferenciação entre o Maranhão, Sudeste ($p = 0,05851 \pm 0,0020$) e Nordeste ($p = 0,00633 \pm 0,0005$; $\alpha = 0,00139$). Porém, diferenciação foi observada entre o Maranhão e a região Sul ($p < 0,00139$). Todos os resultados deste teste estão representados em uma tabela em formato de matriz no Apêndice B. As regiões Norte e Centro Oeste do Brasil não foram consideradas neste teste pois não foi possível obter dados para estas regiões na literatura atual.

Os resultados obtidos para o Maranhão também foram comparados com dados disponíveis para outros Estados pertencentes a região nordeste brasileira.

Ao realizar esta comparação utilizando-se o teste exato para o componente ameríndio, foi verificada a não diferenciação entre o Maranhão e Piauí ($p = 0,06836 \pm 0,0016$), Ceará ($p = 0,20835 \pm 0,0023$), Rio Grande do Norte ($p = 0,48945 \pm 0,0037$), Alagoas ($p = 0,63287 \pm 0,0030$) e Pernambuco ($p = 0,00290 \pm 0,0002$; $\alpha = 0,0009$) (Apêndice C).

Para o componente africano, não foi observada diferenciação entre as distribuições das linhagens maternas do Maranhão em comparação com Piauí ($p=0,06836 \pm 0,0016$), Ceará ($p=0,20835 \pm 0,0023$), Rio Grande do Norte ($p=0,01069 \pm 0,0007$; $\alpha = 0,00139$) e Pernambuco ($p=0,01870 \pm 0,0006$; $\alpha = 0,00139$) (Apêndice B). O Estado de Alagoas apresentou diferenciação em relação ao Maranhão ($0,00012 \pm 0,0001$; $\alpha = 0,00139$) (Apêndice B).

A análise de diferenciação baseada nas frequências dos haplogrupos europeus e asiáticos não foi realizada, pois algumas das linhagens encontradas no Maranhão não foram observadas em outras localidades, e vice-versa.

A estatística do F_{ST} com base nos haplótipos de RC-mtDNA também foi empregada para avaliar possíveis diferenças entre a amostra de indivíduos do Maranhão e Estados do Sudeste, como Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo, e entre a amostra de indivíduos do Maranhão e Estados do Sul, como Santa Catarina e Paraná. Valores menores do que 1% foram observados entre o Maranhão e Estados do Sudeste. Para os Estados do Sul, o valor de distância do Maranhão em relação ao Paraná foi maior do que 1%, e em relação à Santa Catarina, maior do que 3%. Os valores de p para o F_{ST} entre o Maranhão e os outros Estados foram menores do que o limiar de significância estipulado ($p < 0,05$). Os resultados deste teste estão representados em uma tabela em formato de matriz no Apêndice D.

Tabela 7 – Frequência (%) dos haplogrupos de mtDNA observados na amostra do Maranhão, em regiões do Brasil e outros Estados do Nordeste

Linhagem	Maranhão N = 151	Norte N = 116	Sudeste N = 1071	Centro-Oeste N = 306	Sul N = 202	Nordeste N = 755	Piauí N = 174	Ceará N = 52	Rio Grande do Norte N = 276	Pernambuco N = 64	Alagoas N = 169
Ameríndia	45,00	57,75	26,14	33,34	38,11	43,05	52,30	52,00	45,20	28,20	33,30
A	15,9	9,48	7,47	12,09	9,40	14,97	23,60	13,50	13,40	14,10	10,70
B	13,2	12,93	9,15	9,48	12,87	12,05	9,20	13,50	15,20	7,80	10,10
C	11,3	25,86	7,28	7,19	12,87	11,79	12,60	21,20	13,00	1,60	10,10
D	4,6	9,48	2,24	4,58	2,97	4,24	6,90	3,80	3,60	4,70	2,40
Africana	38,50	36,21	37,35	49,02	12,38	37,48	36,20	30,70	35,10	40,70	43,20
L0	2,00	*	3,64	*	1,98	2,78	2,90	3,80	4,30	-	-
L1	7,30	*	9,05	*	2,97	9,01	9,20	9,60	4,30	14,10	14,80
L2	11,30	*	8,60	*	5,45	11,26	10,90	7,70	12,70	7,80	11,80
L3	16,60	*	15,50	*	1,98	14,30	13,20	9,60	13,40	18,80	16,60
L4	1,30	*	0,56	*	-	-	-	-	-	-	-
L5	-	*	-	*	-	0,13	-	-	0,40	-	-
Europeia	13,85	6,02	35,39	16,67	48,55	16,82	9,80	7,70	16,00	31,30	21,40
H	2,65	1,72	10,36	5,88	17,82	9,67	4,60	7,70	9,10	20,30	10,70
V	-	-	0,74	0,65	1,00	0,40	-	-	-	1,60	1,20
HV	0,60	0,86	3,08	-	-	0,80	1,70	-	1,10	-	-
Pre-HV	-	-	-	-	1,49	-	-	-	-	-	-
Pre-V	-	-	-	-	1,49	0,13	-	-	-	-	0,60
R	8,00	0,86	4,95	2,29	3,96	-	-	-	-	-	-
I	-	0,86	1,41	-	1,98	0,13	0,60	-	-	-	-
J	0,60	-	2,91	1,31	1,98	1,32	-	-	2,50	1,60	1,20
JT	-	-	-	-	-	0,13	0,60	-	-	-	-
K	-	-	1,68	1,96	4,45	0,80	0,60	-	1,10	3,10	-
T	-	-	3,83	1,31	5,45	1,19	0,60	-	0,70	1,60	2,40
U	2,00	0,86	5,13	2,94	7,43	1,72	1,10	-	0,70	3,10	4,10
X	-	-	0,37	0,33	0,50	0,13	-	-	0,40	-	-
W	-	0,86	0,93	-	1,00	0,40	-	-	0,40	-	1,20
Asiática	2,65	-	1,02	0,98	1,00	2,12	1,80	5,70	3,70	-	-
S	-	-	-	-	-	0,27	0,60	-	0,40	-	-
G	-	-	-	-	-	0,13	0,60	-	-	-	-
N	-	-	0,65	0,65	1,00	0,66	0,60	1,90	1,10	-	-
M	2,65	-	0,37	0,33	-	1,06	-	3,80	2,20	-	-
NI	-	-	0,10	-	-	0,53	-	-	-	-	2,40

Legenda: NI – frequências dos haplogrupos não identificados. Em negrito estão as maiores frequências observadas na ancestralidade; *Dados não informados pelos autores.

Fonte: Maranhão – A autora, 2020; Norte – NOGUEIRA et al., 2017; Nordeste (exceto os Estados do Maranhão, Sergipe e Bahia) – SCHAAN et al., 2017; Sudeste – FRIDMAN et al., 2014; BERNARDO et al., 2014; SANCHES et al., 2014; SIMÃO et al., 2018; DOS REIS et al., 2019; Sul – PALENCIA et al., 2010; POLETTO et al., 2019; Centro-Oeste – FREITAS et al., 2019.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou sequências de RC-mtDNA de 151 amostras provenientes do Maranhão, de modo a avaliar a variabilidade genética e a origem ancestral materna dentre os indivíduos que compõem a população deste Estado. Para a análise da variabilidade genética desta amostra maranhense, foram caracterizados os índices de diversidade molecular, tais como índices de diversidade haplotípica e nucleotídica, o número médio de diferenças pareadas (NMDP) entre diferentes sequências de mtDNA, e a probabilidade de coincidência aleatória entre dois indivíduos (RMP). Estes índices foram comparados com outras populações do Brasil, através de dados obtidos em outros estudos. Para a análise de ancestralidade materna da amostra maranhense foram definidos os haplogrupos mitocondriais cujas frequências foram comparadas com as encontradas por outros estudos em outras populações brasileiras.

Em relação à população do Maranhão, destaca-se que, até o momento, não existem dados na literatura referentes à totalidade ou parte da região controle do mtDNA. Isto torna este estudo relevante, uma vez que contribui para o aumento da robustez de bases de dados de linhagem matrilinea com aplicações em estudos populacionais e forenses.

5.1 Índices de diversidade molecular da amostra maranhense

De acordo com os resultados, todos os índices de diversidade molecular analisados para a amostra do Maranhão apresentaram-se elevados. Na análise da diversidade haplotípica, um dos parâmetros que se relacionam com a diversidade molecular, resultados semelhantes foram observados entre as populações do Rio de Janeiro (SIMÃO et al., 2018) e Espírito Santo (SANCHES et al., 2014). Em relação aos Estados das regiões Sul e Centro-Oeste, os resultados de diversidade haplotípica foram superiores para a amostra do Maranhão (Tabela 3). Estes achados sugerem uma menor variabilidade genética nas regiões Centro-oeste e Sul do Brasil quando comparadas àquelas nas regiões Nordeste e Sudeste, em relação à linhagem matrilinear.

Na análise da região HVR, onde vinte sete sítios polimórficos da RC-mtDNA não foram incluídos na análise (Tabela 1), o valor de diversidade haplotípica da amostra do Maranhão se mantém elevado, tal como observado por Schaan e colaboradores (2017) para o Nordeste e por Fridman e colaboradores (2014) para o Sudeste Brasileiro (Tabela 4).

Para a amostra maranhense, o número de haplótipos únicos foi de 144 em 151 haplótipos analisados na amostra maranhense, correspondendo a 95,3% (Tabela 1). Este parâmetro também se relaciona com a diversidade de uma população. Em comparação, dados encontrados por Fridman e colaboradores (2014) para 290 indivíduos da região Sudeste indicaram a presença de 79,3% de haplótipos únicos, justificando o menor valor de diversidade haplotípica encontrado para essa localidade (Tabela 4). Apesar disso, deve-se considerar que o estudo da região Sudeste analisou aproximadamente o dobro de amostras em relação ao presente estudo para a amostra maranhense.

O resultado do cálculo de RMP indicou que, para a amostra maranhense, a chance de encontrar aleatoriamente dois indivíduos não relacionados matematicamente é menor do que 1% com o uso desse marcador molecular. Esse baixo valor de RMP indica elevado poder de discriminação e está em conformidade com a alta diversidade indicada pelos índices de diversidade haplotípica. Este resultado é particularmente importante para o contexto de identificação humana, já que indica o poder informativo acerca da utilização do mtDNA para uso forense. Em comparação com os resultados obtidos para outras localidades brasileiras, o valor de RMP obtido para a amostra estudada só foi mais alto do que o observado na região Sudeste (FRIDMAN et al., 2014) e para o Estado do Rio de Janeiro (SIMÃO et al., 2018) (Tabelas 3 e 4).

A alta diversidade verificada em todas as regiões supracitadas, incluindo a do presente estudo, pode ser explicada como resultado da alta mistura de populações com diferentes origens maternas, resultantes da miscigenação de povos africanos, ameríndios e europeus que acompanhou a formação histórica do Brasil, conforme sugerido por outros autores (PALENCIA et al., 2010; SANCHES et al. 2014; SCHAAN et al., 2017; SIMÃO et al., 2018).

Os Estados pertencentes às regiões Sudeste e Nordeste foram pontos de desembarque de europeus e africanos desde o período colonial, de modo que, desde o século XVI, houve grande confluência de indivíduos de diferentes linhagens para estas localidades brasileiras. Não obstante, a razão para a diversidade molecular para RC-mtDNA encontrada no Sudeste ser mais elevada do que a do Maranhão e Nordeste pode estar relacionada ao histórico elevado de migração, decorrente dos períodos de seca nordestinos e programas de incentivo migratório. Estes eventos históricos levaram grande parcela dos nordestinos a emigrarem para outras localidades do Brasil, principalmente para o Sudeste, entre as décadas 1950 e 2000 (AMARAL, 2013), o que contribuiu para alterar a variabilidade genética entre as duas regiões brasileiras.

Dessa forma, os resultados apresentados nas Tabelas 1, 3 e 4 suportam a existência de alta heterogeneidade em relação às linhagens matrilineares entre amostras representativas de

diversos locais do país, demonstrando a alta complexidade da composição genética da população brasileira, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste.

5.2 Análise de diferenciação entre a amostra do Maranhão e outras populações brasileiras

Em relação às frequências dos haplogrupos ameríndios, a amostra maranhense apresenta valores significativos de diferenciação somente em relação a região Norte do país. Este resultado indica que a distribuição das linhagens ameríndias encontradas é distinta entre a amostra do Maranhão e esta região, o que pode estar associado a discrepância entre o número de indígenas existentes nestas localidades. A região Norte do país contém a maior parcela de indivíduos autodeclarados índios, enquanto que a região Nordeste fica em segundo lugar neste quesito (FUNAI, 2014). Em conformidade com o resultado anterior, a região Nordeste também apresentou diferença significativa em relação à região Norte (Apêndice C). Há de se ressaltar que a região Nordeste possui a maior parcela de índios vivendo em cidades, havendo mais de cem mil indígenas nas regiões urbanas. O Maranhão é o Estado com a terceira maior população indígena no Nordeste brasileiro, atrás da Bahia e Pernambuco (FUNAI, 2014).

Para as linhagens africanas, a amostra maranhense apresentou valores significativos de diferenciação das frequências dos haplogrupos somente em relação a região Sul do país e o Estado do Alagoas, localizado na região Nordeste (Apêndice B).

Estes dados são corroborados por registros históricos, os quais evidenciam a elevada presença africana no litoral nordestino durante o período de escravidão no Brasil em comparação com a região Sul, a qual apresenta registros mais expressivos da colonização europeia, reflexo da migração de alemães, russos, italianos e portugueses, ocorrida principalmente durante o século XIX (SOUCHAUD; FUSCO, 2012).

Apesar de Estados nordestinos como Pernambuco e Alagoas apresentarem maior contribuição genética matrilinear relacionada ao macrohaplogrupo L, os resultados estatísticos relacionados ao teste exato de não-diferenciação populacional indicaram diferenças significativas apenas entre Alagoas e a amostra referente ao Maranhão. Em conformidade, a região Nordeste como um todo também apresentou diferenças significativas em relação ao Estado Alagoas (Apêndice B). Este resultado pode ser justificado por dois estudos que indicam que Alagoas é o Estado nordestino que apresenta o maior valor percentual de linhagem africana (Tabela 7) (BARBOSA et al., 2008; SCHAAN et al., 2017).

5.2.1 Distâncias genéticas

Neste estudo foi calculado o nível de distanciamento populacional levando em consideração dados de haplótipos para a RC-mtDNA, de modo a fazer inferência acerca da filogenia entre a amostra do Maranhão e de outros estados do Brasil, como São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina e Paraná.

Através da análise de F_{ST} verificou-se que os valores de distância entre a amostra referente ao Estado do Maranhão e Estados do Sudeste (RJ, SP e ES) foram baixos, indicando que há maior proximidade entre as populações que compõem esses estados. Resultados encontrados por Simão e colaboradores (2018) corroboram com esta observação ao reportar que valores de F_{ST} menores do que 1% foram encontrados entre Estados do Sudeste e do Nordeste.

Apesar dos baixos valores de distância encontrados entre a amostra do Maranhão e Estados do Sudeste, os valores de diferenciação relacionados às comparações par-a-par de F_{ST} foram significativos entre a amostra maranhense a amostras do Rio de Janeiro e São Paulo. Este resultado pode estar relacionado à contribuição europeia, visto que o contingente de linhagens europeias encontrados na amostra do Maranhão é de 13,85%, enquanto que para o Rio de Janeiro foi 22% (SIMÃO et al., 2018) e para São Paulo, 43,8% (PRIETO et al., 2011).

Assim como os resultados discutidos anteriormente, este resultado corrobora dados históricos, visto que as cidades de São Luís (Maranhão) e Rio de Janeiro (RJ) foram pontos de desembarque de rotas marítimas de tráfico de escravos até o século XIX, as quais faziam ligação entre a África e o litoral brasileiro (SOARES, 1998; BARROSO JÚNIOR, 2013). Apesar de a maioria dos escravos trazidos ao Brasil terem sido do sexo masculino, a quantidade de mulheres vindas da África ainda era significativa, alcançando 44,1% no Estado do Maranhão entre os anos 1785 e 1824 (MOTA; BARROSO, 2017). Portanto, estes eventos históricos contribuíram para a formação atual da população do Maranhão e de Estados do Sudeste, principalmente Rio de Janeiro, a qual é resultado de grande miscigenação desde o início do período colonial. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados por Simão e colaboradores (2018) em que, na análise baseada na região HV1, foram verificados baixos valores de distância entre Rio de Janeiro e Estados do Nordeste Brasileiro.

Os resultados de F_{ST} entre a amostra referente ao Maranhão e Estados do Sul, como Santa Catarina e Paraná, indicaram um maior distanciamento entre as localidades supracitadas. Estas informações também são coerentes com dados históricos brasileiros do período colonial,

o qual foi marcado por baixa taxa de migração de mulheres europeias para o Nordeste (MARQUESE, 2006). Os resultados de Simão e colaboradores (2018) também indicaram distanciamento significativo entre Rio de Janeiro e Estados do Sul, o que mais uma vez sugere uma maior proximidade entre o sudeste e o nordeste brasileiros.

5.3 Linhagens maternas presentes na amostra maranhense

No que diz respeito à origem ancestral da amostra de indivíduos do Maranhão, a análise dos haplótipos e a caracterização dos haplogrupos indicaram altas contribuições ameríndias e africanas. Apesar de a fração ameríndia ter sido a mais alta, a parcela africana também apresentou elevada frequência na amostra maranhense. Em contraposição, as linhagens europeias e asiáticas compõem as menores parcelas desta amostra (Gráfico 1). Estas informações também são coerentes com dados históricos brasileiros do período colonial, marcado por tráfico de escravos e baixa taxa de migração de mulheres europeias (MARQUESE, 2006.). Ainda, a migração asiática para o Brasil teve início no século XX (BELTRÃO; SUGAHARA; KONTA, 2006), o que justifica a menor contribuição desta linhagem.

5.3.1 Linhagens ameríndias

A herança materna majoritariamente ameríndia observada na amostra do Maranhão pode ser justificada pela presença de populações indígenas no litoral atlântico da região nordeste brasileira (Censo Demográfico, 2010). Dentre os macrohaplogrupos principais que caracterizam esta ancestralidade, foram encontrados A, B, C e D.

A presença de descendentes de ameríndios na população brasileira está associada aos habitantes nativos da América. De acordo com a teoria *Out of Africa*, os povos indígenas distribuídos pelo continente americano são derivados de populações vindas da Ásia, através da passagem pelo Estreito de Bering, e que no decorrer de alguns mil anos, se dispersaram pela América. Dentre os haplogrupos advindos da Ásia, pode-se citar principalmente A2, B2, C1, D1 e D4 (LORENZ; SMITH, 1996; DERENKO et al., 2010; BRANDINI et al., 2018). Segundo Tamm e colaboradores (2007), estes foram os ancestrais Beringianos fundadores, os quais

contribuíram com diversos subhaplogrupos que povoaram o continente americano.

Dentre as linhagens ameríndias encontradas na amostra de indivíduos maranhenses, a mais frequente foi B4b, exibido em 22% das amostras ameríndias. O macrohaplogrupo B apresentou frequência elevada na amostra maranhense, com a presença das linhagens B2, B2b, B2i e B4b (Tabela 4). Este macrohaplogrupo também foi encontrado em frequência elevada nas regiões Sudeste e Sul, e também no Estado do Rio Grande do Norte (Tabela 7). Povos indígenas que apresentam este macrohaplogrupo em elevada frequência são os Tupis, da tribo Aché (90%), Urubu-Kaapor (33%) e os povos Jêan, como as tribos Kubenkokre (100%) e Xavante (84%) (Apêndices F-a e G) (MARRERO et al., 2007; SILVA et al., 2002; FAGUNDES et al., 2008; INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2018).

O macrohaplogrupo A foi encontrado em maior frequência na amostra do Maranhão, e também foi observado com frequência elevada no Centro-oeste por Freitas e colaboradores (2019) e na maioria dos Estados do Nordeste (PI, PE e AL) por Schaan e colaboradores (2017). O haplogrupo A2 apresentou frequência elevada na amostra maranhense. Apesar da alta frequência, foram observadas apenas três diferentes linhagens referentes a A2 (Tabela 5 e Apêndice E). Este haplogrupo é encontrado em frequência elevada nos povos indígenas localizados ao norte do país, como na família linguística Tupi-Guarani (85%), nas tribos Poturujuara (45%), Wajãpi (75%), e do povo Jêan, na tribo Krahô (50%) (Apêndices F-a e G) (MARRERO et al., 2007; SILVA et al., 2002; FAGUNDES et al., 2008; INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2018).

O haplogrupo C1 é bastante difundido na América e seus subhaplogrupos possivelmente surgiram no início das migrações para o sul do continente (ACHILLI et al., 2008). Apesar disso, este não foi o haplogrupo de maior frequência na amostra maranhense. Este macrohaplogrupo também é encontrado com frequência elevada entre os povos tupi Parakanã (46%), localizados no Pará, povos Kaingang-Jêan (49%) e povos Jêan (67%) (Apêndices F-a e G) (MARRERO et al., 2007; SILVA et al., 2002; FAGUNDES et al., 2008; INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2018). Dentre os subhaplogrupos de C1 que foram observados no Maranhão, estão C1b e C1d, os quais diferem pela presença das variações 493G e 16051G na sequência de mtDNA (Apêndice E). Destes haplogrupos, C1b foi mais frequente no Maranhão, sendo encontrado também no México, Equador, Colômbia e principalmente no Peru (GÓMEZ-CARBALLA et al., 2016).

O macrohaplogrupo D foi o menos frequente na amostra maranhense, bem como nas demais regiões do Brasil. Este macrohaplogrupo é encontrado em alta frequência nos povos tupis, da tribo Suruí (87%), Gavião (82%), Zoró (64%) e Munduruku (62%) (Apêndices F-a e

G) (MARRERO et al., 2007; SILVA et al., 2002; ACHILLI et al., 2008; FAGUNDES et al., 2008). Dentre estes povos, os povos Gavião-Pykopjê são localizados especificamente no Maranhão (WARD et al., 1996; SALAS et al., 2009), enquanto que os outros formam tribos ao norte e centro-oeste do país (INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2018). Dentro do haplogrupo D4, os subhaplogrupos D4h2 e D4h3a foram encontrados na amostra maranhense. Estes subhaplogrupos são bastante raros na América (LLAMAS et al., 2016), visto que são característicos do Japão, do grupo étnico indígena Ainu (ADACHI et al., 2018), e da China (PEREGO et al., 2009). O subhaplogrupo D4h3 foi encontrado em restos humanos remanescentes do Alasca, datado de aproximadamente dez mil anos, e é atribuído como um subhaplogrupo fundador dos povos americanos, presente principalmente na costa do pacífico ao norte do continente (KEMP et al., 2007; PEREGO et al., 2009) e raramente encontrados em populações atuais.

Especificamente localizado no Estado do Maranhão, o povo indígena predominante é o Guajajara, da família Tupi-Guarani, sendo um dos povos indígenas mais numerosos do país, composto por mais de 27 mil indígenas (INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2018). Os Guajajara se assemelham aos povos Parakanã e Suruí, localizados no Estado do Pará (Apêndice G), os quais apresentam grande frequência dos macrohaplogrupos C e D, respectivamente (Apêndice F) (MARRERO et al., 2007), conforme já discutido. Contudo, não foram encontrados estudos populacionais na literatura científica acerca da linhagem materna que compõe os povos Guajajara. Há apenas o registro de um estudo em que se analisou algumas amostras de fósseis de indivíduos pertencentes a esta tribo, onde a análise de HV1 indicou a presença de haplogrupos ameríndios, como C1 e D, e africanos, L1 e L3, de modo que foi sugerido que houve miscigenação entre estas linhagens em algum momento da história (LEITE et al., 2014).

No que diz respeito a distribuição das diferentes linhagens ameríndias encontradas nas amostragens relativas aos Estados nordestinos, análises referentes às amostras do Maranhão e do Piauí indicaram maior frequência do macrohaplogrupo A, enquanto que o Rio Grande do Norte apresentou maior frequência de indivíduos pertencentes ao macrohaplogrupo B, e o Ceará, ao macrohaplogrupo C (Tabela 7).

5.3.2 Linhagens africanas

As linhagens africanas também estão presentes em alta frequência na amostra

maranhense. Estas são representadas pelo macrohaplogrupo L, o qual é dividido em sete haplogrupos de acordo com as variações no haplótipo que os define, sendo numerados de L0 a L6. Na amostra maranhense foi detectada a presença dos haplogrupos entre L0 e L4. Ainda, é importante destacar a presença de um grande número de diferentes haplogrupos de mtDNA encontrados dentre os indivíduos estudados, de modo que, apesar de possuírem a mesma origem ancestral, 44 pertencem a haplogrupos distintos (Tabela 6). Esta observação reforça a presença de alta variação de linhagens africanas na amostra maranhense.

Dentre os haplogrupos maternos que tipificam a ancestralidade africana, o de maior frequência na amostra maranhense foi L3. Do mesmo modo, dados de Schaan e colaboradores (2017) indicaram que este é o haplogrupo mais frequente em outros Estados nordestinos como Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Alagoas. Ainda, L3 mais recorrente a sudoeste do continente africano (Apêndice F-b) (SALAS et al., 2002; CABRERA et al., 2018). Dentre os subhaplogrupos africanos encontrados na amostra maranhense, L3e foi o mais frequente. Este subhaplogrupo é característico principalmente do sudoeste do continente africano, em populações Bantu (BANDELT et al., 2001; SALAS et al., 2002).

O haplogrupo L3 apresenta suma importância no quesito das migrações humanas. Este é o haplogrupo mais recente em questão de ancestralidade materna africana, tendo sua origem estimada em 60 a 75 mil anos (SALAS et al., 2002). De acordo com a base de dados *PhyloTree* (mtDNA *tree build* 17; VAN OVEN et al., 2009), o haplogrupo L3 é o ancestral comum de M e N, os quais são antecessores de outras linhagens, como as fundadoras do continente americano A2, B2, C1, D1 e D4 (Apêndice E).

O haplogrupo L2 é o segundo mais abundante dentre os haplogrupos maternos encontrados na amostra maranhense. Este também é bastante frequente na África Subsaariana, destacando-se o Sudeste e Centro-oeste deste continente (Apêndice F-b). O subhaplogrupo L2a é bastante difundido na África, também encontrado na costa oeste e no sudeste do continente (SALAS et al., 2002; SILVA et al., 2015). A análise da amostra maranhense apresentou elevada frequência deste subhaplogrupo. Outro subhaplogrupo encontrado foi L2b. Em termos de localização geográfica, estes subhaplogrupos são bastante comuns no sudeste e leste africano, em Moçambique e Uganda, majoritariamente em povos de origem Nilota e Bantu (SALAS et al., 2002; GOMES et al., 2015).

O haplogrupo L1 tem como localização a região central e oeste do continente africano para L1b, e sudoeste para L1c (Apêndice F-b) (SALAS et al., 2002). L1b é mais observado em Senegal, Burkina Faso e Camarões, por exemplo, enquanto que L1c é frequente na Angola (SALAS et al., 2004; PLAZA et al., 2004). Dentre as populações que apresentam estes

subhaplogrupos estão os Pigmeus e Bantu (QUINTANA-MURCI et al., 2008; PLAZA et al., 2004).

O haplogrupo L0 é o haplogrupo de origem mais antiga, datado em 140-160 mil anos (MISHMAR et al., 2003), sendo derivado diretamente do MRCA do humano moderno. Relacionados a L0, os subhaplogrupos encontrados na amostra maranhense foram L0a1 e L0a2 e L0d, os quais são mais frequentes no sudeste do continente africano, relacionado a povos Bantu e do Nilo (Apêndice F-b) (SALAS et al., 2002; GOMES et al., 2015; ROSA; BREHM, 2011).

Por último, o haplogrupo L4 é pouco frequente na população africana, sendo mais observado ao leste deste continente (Apêndice F-b). Este também foi o haplogrupo que apresentou menor frequência dentre as linhagens africanas encontrada na amostra referente a indivíduos do Maranhão, sendo representada pelo subhaplogrupo L4b em dois indivíduos. Do mesmo modo, este também é o haplogrupo africano que apresenta menor frequência no restante do Brasil, sendo encontrado somente na amostra maranhense e na região sudeste brasileira. Portanto, a contribuição materna africana para a formação do Estado do Maranhão reforça que há provável relação ancestral de indivíduos maranhenses com povos da África subsaariana.

Em relação à distribuição dos haplogrupos africanos, as amostras referentes ao Maranhão e ao Sudeste apresentam distribuições similares quanto a linhagem africana. Em ambos, o haplogrupo L3 é o mais frequente, evidenciando contribuições advindas principalmente do sudoeste da África (BANDELT et al., 2001; ROSA; BREHM, 2011). O haplogrupo L4 também foi observado na amostra maranhense e na região sudeste do Brasil, enquanto que as demais localidades não apresentaram a presença deste haplogrupo (Tabela 7). Uma hipótese que pode ser cogitada é que esta relação de paridade entre a ancestralidade africana existente no Maranhão e no Sudeste é um resultado da época da escravatura, já que navios negreiros que seguiam a rota marítima da Mina desembarcavam tanto na cidade do Rio de Janeiro (RJ) quanto em São Luís (MA) (SOARES, 1998; BARROSO JÚNIOR, 2013). Para o Maranhão, especificamente, as principais rotas marítimas eram a da Guiné e Mina (CHAMBOULEYRON, 2006). Estas localidades estão relacionadas às regiões sudoeste e centro-oeste do continente africano, onde são observadas altas frequências dos haplogrupos L3 e L1c (BANDELT et al., 2001; SALAS et al., 2002; SALAS et al., 2004; ROSA; BREHM, 2011; GOMES et al., 2015; HEINZ et al., 2017). A alta frequência de L2a na amostra maranhense pode ser decorrente da Rota de Moçambique que tinha como principal destino o Rio de Janeiro, mas que desembarcava no Nordeste, inclusive no Maranhão (CAPELA, 2005). Outra questão que pode ser levada em consideração é a migração que existiu no último século

entre as regiões Nordeste e Sudeste, onde a emigração do Nordeste foi favorecida por fenômenos de seca e programas de incentivo a migração (AMARAL, 2013).

Apesar da parcela ameríndia ser majoritária no Nordeste, conforme discutido anteriormente, Estados mais ao sul desta região apresentam maior componente materno africano (SCHAAN et al., 2017). Por exemplo, no Pernambuco e em Alagoas, a maior contribuição genética matrilinea observada está relacionada ao macrohaplogrupo L (Tabela 7). A elevada presença africana nestas localidades pode ser justificada não somente devido às migrações relacionadas ao histórico de escravidão, mas também pela presença indígena no Brasil ter sofrido regressão após eventos decorrentes da colonização. Dados históricos indicam elevada taxa de mortalidade da população indígena no país após a sua colonização pelos europeus, associados principalmente a doenças e confrontos (NEWSON, 1993; SILVA, 2003).

5.3.3 Linhagens europeias e asiáticas

Em relação as outras linhagens ancestrais encontradas na amostra maranhense, a presença de contribuição materna europeia e asiática se manteve baixa, em conformidade com o observado para outros Estados do nordeste brasileiro.

Para a linhagem europeia, o macrohaplogrupo R foi identificado na amostra referente ao Maranhão como o macrohaplogrupo de origem europeia mais frequente (Tabela 7). Apesar de estar presente em alta frequência nesta amostra, este macrohaplogrupo não foi encontrado em outros Estados Nordestinos, mas foi observado em todas as outras Regiões do país (Tabela 7). Dentre estas regiões, o macrohaplogrupo R foi encontrado em maior proporção na região Sudeste (Tabela 7). Esta observação contribui para a hipótese já discutida acerca da possível relação entre os ancestrais que contribuíram para a formação da população maranhense e do sudeste brasileiro. Apesar disso, a amostra do Maranhão analisada no presente estudo apresenta a peculiaridade de baixa frequência do macrohaplogrupo H, enquanto que outras regiões brasileiras, a exceção do Norte, apresentam elevada frequência do mesmo (Tabela 7).

Os haplogrupos encontrados na amostra maranhense são vastamente distribuídos pelo continente Europeu, havendo dificuldade em atribuir uma origem geográfica mais específica.

Dentre as linhagens europeias encontradas para a amostra maranhense, R0 foi o haplogrupo mais frequente. Este haplogrupo é bastante frequente em Portugal, apesar de menos frequente que o macrohaplogrupo H (MARQUES et al., 2015).

O macrohaplogrupo H é bastante difundido na Europa, sendo observado em alta frequência na Albânia, Reino Unido, Espanha, França (SIMONI et al., 2000) e em Portugal (MARQUES et al., 2015). Este macrohaplogrupo também apresenta elevada frequência na América do Norte (TORRONI; WALLACE, 1994; TORRONI et al., 1996). Para a amostra maranhense, observou-se a presença dos haplogrupos H, HV e H1C. O haplogrupo H é o mais comum encontrado na Europa, e sua distribuição é bastante ampla em todo o continente, sendo bastante frequente em Portugal (MARQUES et al., 2015) e na Áustria (BRANDSTÄTTER et al., 2007). Na região da Europa, o haplogrupo HV é encontrado com maior frequência na Finlândia (HEDMAN et al., 2007), na Alemanha (BRANDSTÄTTER et al., 2006) e na Holanda (CHAITANYA et al., 2016). O haplogrupo H1c é menos frequente nos países europeus, mas foi observado na Áustria (BRANDSTÄTTER et al., 2007), Portugal (MARQUES et al., 2015) e Holanda (CHAITANYA et al., 2016).

Outros macrohaplogrupos mitocondriais de origem europeia encontrados foram J e U. O macrohaplogrupo J é amplamente distribuído em todo o continente europeu, principalmente no Reino Unido, Dinamarca, Islândia, no norte da Alemanha (TORRONI et al., 2000; SIMONI et al., 2000) e na Áustria (BRANDSTÄTTER et al., 2007). Apesar disso, na amostra maranhense, foram encontrados indivíduos pertencentes ao subhaplogrupo de J1b, o qual não foi observado em estudos acerca da população europeia, mas é encontrado em altas frequências em populações Árabes (ABU-AMERO et al., 2008).

Por outro lado, o macrohaplogrupo U é encontrado em menor frequência na Europa, em comparação às demais linhagens europeias. Dentre os encontrados na amostra maranhense analisada neste estudo, estão os haplogrupos U5a e U5b, os quais foram observados na Alemanha (BRANDSTÄTTER et al., 2006), na Holanda (CHAITANYA et al., 2016) e na Áustria (BRANDSTÄTTER et al., 2007), e U6, o qual é observado em alta frequência nas Ilhas Canárias (Espanha) e na costa norte da África, principalmente na região da Argélia (SECHER et al., 2014).

Quanto a contribuição asiática, esta não foi encontrada na região Norte do país, e apresenta-se reduzida nas demais regiões brasileiras, variando entre 1 e 2,6%. A frequência destas linhagens também foi baixa na amostra referente ao Estado do Maranhão. Esta observação pode ser relacionada a recente migração asiática para o Brasil, a qual teve início no século XX (BELTRÃO; SUGAHARA; KONTA, 2006).

5.4 Outras considerações acerca dos dados obtidos no presente estudo

Acerca da questão clínica, como retratado na literatura científica atual, a presença de heteroplasmia pode estar associada a questões relacionadas a saúde humana (STEWART; CHINNERY, 2015). Estudos também evidenciam a questão da associação entre as alterações fenotípicas relacionadas a doenças e a ancestralidade (LEAL et al. 2019). Apesar disso, há grande discussão acerca da aplicabilidade destas relações que vêm sendo feitas entre a análise da RC-mtDNA e patologias, já que existe a possibilidade de estas associações serem espúrias (SAMUELS et al., 2006; SALAS et al., 2014). Por esta razão, este tipo de associação não foi realizado neste estudo. Apesar disso, pode-se comentar a presença de alto percentual de heteroplasmia na amostra analisada no presente estudo. Este resultado pode indicar que este fenômeno é bastante frequente na população maranhense.

A ausência de bases de dados adequadas com informação acerca das linhagens maternas do Maranhão é resultante da exiguidade de informações genéticas relacionadas a dados populacionais. Portanto, ressalta-se a importância dos dados genéticos obtidos neste estudo, de modo a agregar maiores informações a bases de dados populacionais, principalmente de localidades que ainda não estão disponíveis nestes bancos genéticos. Como, até o presente momento, não haviam fontes de dados sobre a contribuição materna deste Estado, este resultado poderá contribuir para a ampliação de bases de dados como a EMPOP. A contribuição está baseada no fato de que, até o momento da última análise, 43% das amostras que compõem o presente estudo não possuem correspondência com haplótipos armazenados nesta base de dados.

É válido mencionar que a contribuição ancestral materna para Estados brasileiros ainda necessita de continuidade de estudos. Por exemplo, Paraíba, Sergipe e Bahia são Estados que ainda não estão bem descritos quanto às linhagens maternas na literatura científica. Assim, para compreender melhor a caracterização ancestral nordestina, são necessários maiores estudos acerca da linhagem mitocondrial que compõe estes locais. Apesar disso, é evidente que existe uma importante contribuição materna ameríndia e africana na formação da população nordestina, a qual está possivelmente relacionada a presença de numerosas tribos indígenas e a migração forçada de africanos decorrente de tráfico de escravos.

Assim, através da comparação da amostra maranhense com outros Estados do país, torna-se evidente que a população brasileira possui características heterogêneas entre si, expressa através das contribuições africana, europeia e ameríndia perante a ancestralidade materna em diferentes regiões brasileiras. Ao Norte, pode-se observar marcada contribuição

ameríndia. No Nordeste, esta fração ameríndia se torna um pouco menos evidente, contrastando com a presença africana. Na região centro-oeste, um único estudo sugeriu a predominância da ancestralidade africana. Enquanto isso, as regiões sul e sudeste apresentam contribuições variadas entre as linhagens africana e europeia. Estas diferenças perante as regiões brasileiras são correlacionadas com a dimensão continental do país e a identidade histórica de cada localidade.

Os dados obtidos no presente estudo são preliminares. O banco de amostras referente a esta pesquisa conta com aproximadamente 500 amostras de indivíduos nascidos no Maranhão. Portanto, há perspectiva de realização de mais análises utilizando-se maior número de amostras, com a finalidade de aumentar o nível informativo acerca das linhagens maternas que compõem o Estado e também para constituir a base de dados EMPOP.

CONCLUSÃO

- a) Em termos de variabilidade populacional, os dados genéticos obtidos através da análise da amostra maranhense indicaram altos valores de diversidade molecular. Estes índices estão relacionados à miscigenação que acompanha a história da formação da população local desde o período colonial brasileiro;
- b) O valor da probabilidade de coincidência aleatória (RMP) indicou que a chance de dois indivíduos apresentarem haplótipos maternos idênticos ao acaso é baixa, de modo que este marcador molecular pode ser aplicável para identificação humana no âmbito desta população;
- c) Em relação a origem ancestral materna, este estudo indicou elevada contribuição indígena nas amostras referentes à população estudada. A contribuição matrilinear africana também foi expressiva. As frequências das linhagens maternas europeia e asiática foram menos evidentes;
- d) Os resultados de análise de diversidade para as amostras do Estado do Maranhão estão entre os maiores valores descritos para as localidades brasileiras, sendo menor apenas em relação aos valores encontrados para o Rio de Janeiro e sudeste brasileiro;
- e) As informações acerca dos cálculos de F_{ST} e de probabilidade de não-diferenciação indicaram que a população estudada do Maranhão apresenta maior distanciamento genético de linhagens maternas com a Região Sul e menor em relação a região Sudeste.

REFERÊNCIAS

- ABU-AMERO, K. K. et al. Mitochondrial DNA structure in the Arabian Peninsula. *BMC Evol Biol.*, v. 8, p. 45, 2008.
- ACHILLI, A. et al. The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. *PLoS On*, v. 3, n. 3, p. e1764, 2008.
- ADACHI, N. et al. Ethnic derivation of the Ainu inferred from ancient mitochondrial DNA data. *Am J Phys Anthropol*, v. 165, n. 1, p. 139–148, 2018.
- ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5. 3d. Porto Alegre. Artmed, 2009.
- ALEXEYEV, M. et al. The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, v. 5, n. 5, p. 1-17, 2013
- ALVES, S, N. L. et al. N-terminal acetylation modulates Bax targeting to mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 95, p. 35-42, 2018.
- ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*, v. 67, n. 2, p. 444-61, 2000.
- AMARAL, E. F. L. Brazil: internal migration. *The Encyclopedia of Global Human Migration*. 2013.
- AMORIM, A.; FERNANDES, T.; TAVEIRA, N. Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*, v. 13, n. 7, p. e7314, 2019.
- ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, v. 290, p. 457-465, 1981.
- ANDREWS, R.M. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, v. 23, n. 2, p.147, 1999.
- ANDREW, T. et al. A twin study of mitochondrial DNA polymorphisms shows that heteroplasmy at multiple sites is associated with mtDNA variant 16093 but not with zygosity. *PLoS On*, v. 6, n. 8, p. e22332, 2011.
- ARRUTI, J. M. A. Morte e vida do Nordeste indígena: a emergência étnica como fenômeno histórico regional. *Revista Estudos Históricos*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 15, p. 57-94, 1995. Disponível em: <<http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/reh/article/view/1995>>. Acesso em: 06 de janeiro de 2020.
- ASUNCION, A. U.; GOODRICH, M. T. Nonadaptive Mastermind Algorithms for String and Vector Databases, with Case Studies. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering*, v. 25, n.1, p. 131 – 144, 2013.
- ATTARDI, G.; SCHATZ, G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, v. 4, p. 289-333, 1988.

- BAASNER, A. et al. Polymorphic sites in human mitochondrial DNA control region sequences: population data and maternal inheritance. *Forensic Sci Int.* v. 98, n. 3, p. 169-78, 1998.
- BALLARD, D. Analysis of Mitochondrial Control Region Using Sanger Sequencing. *Methods Mol Biol*, v. 1420, p. 143-55, 2016.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.*, v. 13, p. 729-744, 2004.
- BANDELT, H. J. et al. Phylogeography of the human mitochondrial haplogroup L3e: a snapshot of African prehistory and Atlantic slave trade. *Ann. Hum. Genet.*, v. 65, n. 6, p. 549-563, 2001.
- BARBOSA, A.B. et al. Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas state, north-eastern Brazil. *J Forensic Sci*, v. 53, n. 1, p. 142-6, 2008.
- BARROSO JÚNIOR, R. S. No turbilhão da diáspora atlântica: o estado do Maranhão e Piauí e as etnias africanas (1770-1800). In: FILHO, B. S. (org.). *Entre Dois Mundos: Escravidão e Diáspora Africana*. São Luís: EDUFMA, 2013.
- BELTRÃO, K. I.; SUGAHARA, S; KONTA, R. Trabalhando no Brasil: características da população de origem japonesa segundo os censos entre 1980 e 2000. In: ENCONTRO NACIONAL DE ESTUDOS POPULACIONAIS, 15, 2006, Caxambu. Anais, 2006. p. 1-20.
- BENDALL, K. E.; SYKES, B. C. Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet*, v. 57, n. 2, p. 248-56, 1995.
- BENDALL, K. E. et al., Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet.*, v. 59, n. 6, p. 1276-87, 1996.
- BENDER, K.; SCHNEIDER, P. M.; RITTNER, C. Application of mtDNA Sequence Analysis in Forensic Casework for the Identification of Human Remains. *Forensic Sci Int.*, v. 113, n. 1-3, p. 103-107, 2000.
- BERNARDO, S. et al. mtDNA ancestry of Rio de Janeiro population, Brazil. *Mol Biol Rep*, v. 41, n. 4, p. 1945-50, 2014.
- BOGENHAGEN, D. F. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta*, v.1819, n. 9-10, p. 914-20, 2012.
- BRANDHAGEN, M. D.; JUST, R.S.; IRWIN, J.A. Validation of NGS for mitochondrial DNA casework at the FBI Laboratory. *Forensic Sci Int Genet*, v. 4, p. 1-27, 2020.
- BRANDINI, S. et al. The Paleo-Indian Entry into South America According to Mitogenomes. *Mol Biol Evol.*, v. 35, n. 2, p. 299-311, 2018.
- BRANDSTÄTTER, A. et al. DNA control region sequences from southern Germany (Ulm). *Int J Legal Med.*, v. 120, n. 5, p. 310-314, 2006.

- BRANDSTÄTTER, A. et al. Generating population data for the EMPOP database - an overview of the mtDNA sequencing and data evaluation processes considering 273 Austrian control region sequences as example. *Forensic Sci Int.*, v. 166, n. 2-3, p. 164-75, 2007.
- BUDOWLE, B. et al. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v. 4, p. 119-41, 2003.
- BUŚ, M. M.; NILSSON, M.; ALLEN, M. Analysis of mitochondrial DNA from a burned, ninhydrin-treated paper towel. *J Forensic Sci.*, v. 61, n. 3, p. 828-832, 2016.
- BUTLER, J. M. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2. Ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005
- BUTLER, J. M. *Fundamental of Forensic DNA Typing*. Burlington: Elsevier Academic Press, 2009.
- BUTLER, J. M. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. Burlington: Elsevier Academic Press, 2014
- CABRERA, V. M. et al. Carriers of mitochondrial DNA macrohaplogroup L3 basal lineages migrated back to Africa from Asia around 70,000 years ago. *BMC Evol Biol*, v. 18, p. 98, 2018.
- CALLOWAY, C. D. et al. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *Am J Hum Genet*, v. 66, n. 4, p. 1384-97, 2000.
- CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, v. 325, n. 6099, p. 31-36, 1987
- CAMPBELL, M. C.; TISHKOFF, S. A. African Genetic Diversity: Implications for Human Demographic History, Modern Human Origins, and Complex Disease Mapping. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, v. 9, p. 403-433, 2008.
- CAPELA, J. Mozambique-Brazil: cultural and political influences caused by the slave trade. In: CURTO, J. C.; SOULODRE-LAFRANCE, R. (org.). *Africa and the Americas: Interconnections During the Slave Trade*. Africa World Press. 2005. p. 241-257.
- CARDENA, M. M. et al. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS On.*, v. 8, n.4, p. e62005, 2013.
- CARRACEDO, A. et al. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int*, v. 10, n. 2, p. 79-85, 2000.
- CARRACEDO, A. et al. Publication of population data for forensic purposes. *Forensic Sci Int Genet*, v. 4, n. 3, p. 145-7, 2010.

- CARVALHO, B. M. et al. Mitochondrial DNA mapping of social-biological interactions in Brazilian Amazonian African-descendant populations. *Genet. Mol. Biol.*, v. 31, n. 1, p. 12-22, 2008.
- CAVALCANTI, P. et al. A mini-primer set in a multiplex PCR fashion covering the MTDNA control region from submerged skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet*, v. 6, p. e469-e470, 2017.
- CHAMBOULEYRON, R. Escravos do Atlântico equatorial: tráfico negreiro para o Estado do Maranhão e Pará (século XVII e início do século XVIII). *Rev. Bras. Hist.*, v. 26, n. 52, p. 79-114, 2006.
- CHAITANYA, L. et al. High-quality mtDNA control region sequences from 680 individuals sampled across the Netherlands to establish a national forensic mtDNA reference database. *Forensic Sci Int Genet*, v. 21, p. 158-67, 2016.
- CHAROUTE, H. et al. Novel variants of mitochondrial DNA associated with Type 2 diabetes mellitus in Moroccan population. *Mitochondrial DNA Part A*, v. 29, n. 1, p. 9-13, 2018.
- CHINNERY, P.F.; HUDSON, G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull*, v. 106, n. 135-59, 2013.
- CLAYTON, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, v. 28, n. 4, p. 693-705, 1982.
- CENSO DEMOGRÁFICO 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>> Data de acesso: 14 maio 2019.
- CRAWFORD, D. C.; NICKERSON, D.A. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*, v. 56, p. 303-20. 2005.
- DERENKO, M. et al. Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in northern Asia. *PLoS On.*, v. 5, n. 12, p. e15214, 2010.
- DA SILVA, M. C. G. Alta Guiné e Maranhão: tráfico atlântico e rotas comerciais na segunda metade do século XVIII. In: ENCONTRO ESCRAVIDÃO E LIBERDADE NO BRASIL MERIDIONAL. 4º. 2009. Paraná (Curitiba). [s.n.], 2009. p. 1-16. Disponível em: <<http://www.escravidaoeliberdade.com.br/site/images/Textos4/mariacelestegomesdasilva.pdf>>. Acesso em: 31 jan. 2020.
- DE FANTI, S. et al. Massive parallel sequencing of human whole mitochondrial genomes with Ion Torrent technology: an optimized workflow for Anthropological and Population Genetics studies. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.*, Nov;28(6):843-850, 2017.
- DENG, Y. J. et al. Preliminary DNA identification for the tsunami victims in Thailand. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, v. 3, n. 3, p. 143-157, 2005.
- DOS REIS, R. S. et al. A view of the maternal inheritance of Espírito Santo populations: The contrast between the admixed and Pomeranian descent groups. *Forensic Sci Int Genet*, v. 40, p. 175-181, 2019.

- DOS SANTOS PICANCO, L. C. et al. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Curr Med Chem*, v. 25, n. 26, p. 3141-3159, 2018.
- DUAN, M; TU, J.; LU, Z. Recent Advances in detecting mitochondrial DNA heteroplasmic variations. *Molecules*, v. 23, n. 2, p.323-341, 2018.
- EDUARDOFF, M. et al. Optimized mtDNA Control Region Primer Extension Capture Analysis for Forensically Relevant Samples and Highly Compromised mtDNA of Different Age and Origin. *Genes*, v. 8, n. 10, p. e237, 2017.
- ENDICOTT, P. et al. Evaluating the mitochondrial timescale of human evolution. *Trends Ecol Evol*, v. 24, n. 9, p. 515-21, 2009.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, v. 1, n. 47–50, 2007.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, v. 10, n. 3, p. 564-7, 2010.
- FAGUNDES, N. J. R. 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*, v. 82, n. 3, p. 583–592, 2008.
- FARGE, G.; FALKENBERG, M. Organization of DNA in Mammalian Mitochondria. *Int JMol Sci.*, v. 20, n. 11, p. e2770, 2019.
- FOOTE, K. et al. Restoring mitochondrial DNA copy number preserves mitochondrial function and delays vascular aging in mice. *Aging Cell*, v. 17, n. 4, p. e12773. 2018.
- FREGEL, R.; DELGADO S. HaploSearch: a tool for haplotype-sequence two-way transformation. *Mitochondrion*, v. 11, n. 2, p. 366-7, 2011.
- FREITAS, J. M. et al. Mitochondrial DNA control region haplotypes and haplogroup diversity in a sample from Brasília, Federal District, Brazil. *Forensic Sci Int Genet*, v.40, p. e228-e230, 2019.
- FRIDMAN, C. et al. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil. *Int J Legal Med*, v. 128, n. 4, p. 589-93, 2014.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO (FUNAI). Índios no Brasil: Quem São. [S.I] [2014?]. Disponível em: <<http://www.funai.gov.br/index.php/indios-no-brasil/quem-sao?start=4#>> Acesso em: 02 fev. 2020.
- FU, Q. et al. A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. *Curr Biol*, v. 23, n. 7, p. 553-559, 2013.

GAMMAGE, P. A.; FREZZA, C. Mitochondrial DNA: the overlooked oncogenome? *BMC Biol*, v. 17, n. 1, p. 53, 2019.

GARCIA, I. et al. The little big genome: the organization of mitochondrial DNA. *Front Biosci*, v. 22, p. 710-721, 2017.

GIANNOCCARO, M. P. et al. Mitochondrial DNA and primary mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 32, n. 3, p. 346-363, 2017.

GIOLO, S. et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet*, v. 20, p. 111–116, 2012.

GOMES, V. et al. Mosaic maternal ancestry in the Great Lakes region of East Africa. *Hum Genet.*, v. 134, n. 9, p. 1003-1027, 2015.

GÓMEZ-CARBALLA, A. et al. Revealing Latitudinal Patterns of Mitochondrial DNA Diversity in Chileans. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 20, p. 81-88, 2016.

GOODWIN, W. H. The use of forensic DNA analysis in humanitarian forensic action: The development of a set of international standards. *Forensic Sci Int*, v. 278, p. 221–227, 2017.

GOODWIN, W.; LINACRE, A.; VANEZIS, P. The use of mitochondrial DNA and short tandem repeat typing in the identification of air crash victims. *Electrophoresis*, v. 20, n. 8, p. 1707-11, 1999.

GRADY, J. P. et al. mtDNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease. *EMBO Mol Med*, v. 10, n. 6, p. e8262, 2018.

GRANGER, S. O contestado franco-brasileiro: desafios e consequências de um conflito esquecido entre a França e o Brasil na Amazônia. *Revista Cantareira*, Ed.17, 2012.

GRAY, M.W.; BURGER, G.; LANG, B.F. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol*, v. 2, n. 6, 2001.

GUARDADO-ESTRADA, M. et al., The Amerindian mtDNA haplogroup B2 enhances the risk of HPV for cervical cancer: de-regulation of mitochondrial genes may be involved. *J Hum Genet.*, v. 57, n. 4, p. 269-76, 2012.

GUSMÃO, L. et al. Revised guidelines for the publication of genetic population data. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 30, p. 160-163, 2017.

GUSTAFSSON, C.M.; FALKENBERG, M.; LARSSON, N.G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, v. 2, n. 85, p. 133-60, 2016.

HARTL, D. L. *Princípios de Genética de População*. 3. Ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2008.

HEDMAN, M. et al. Finnish Mitochondrial DNA HVS-I and HVS-II Population Data. *Forensic Sci Int*, v. 172, n. 2-3, p. 171-178, 2007.

HEINZ, T. et al. Updating the African human mitochondrial DNA tree: Relevance to forensic and population genetics. *Forensic Sci Int Genet*, v. 27, p. 156-159, 2017.

HELLER, C. Principles of DNA separation with capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 22, n. 4, p. 629-43, 2001.

HERBERS, E. et al. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. *Mitochondrion*, v. 44, p. 85-92, 2019.

HUBER, N.; PARSON, W.; DÜR, A. Next generation database search algorithm for forensic mitogenome analyses. *Forensic Sci Int Genet*, v. 37, p. 204-214, 2018.

HUNG, W. Y. et al. Tandem duplication/triplication correlated with poly-cytosine stretch variation in human mitochondrial DNA D-loop region. *Mutagenesis*, v. 23, n. 2, p. 137-42, 2008.

INGMAN, M. et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, v. 408, n. 6813, p. 708-13, 2000.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. *Programa Povos Indígenas No Brasil*. Fany Pantaleoni Ricardo. Disponível em: <<https:pib.socioambiental.org>>. Data de acesso: 08 fev. 2020.

IVANOV, P. L. et al. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet*, v. 12, n. 4, p. 417-20, 1996.

JAZIN, E. E. et al. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci*, v. 93, n. 22, p. 12382-7, 1996.

JUST, R. S.; IRWIN, J. A.; PARSON, W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet*, v. 18, p. 131-9, 2015.

KARKI, R. et al. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*, v.8, p. 37-44, 2015.

KEHDY, F. S. et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci*, v. 112, n. 28, p. 8696-701, 2015.

KEMP, B. M. et al. Genetic Analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *Am J Phys Anthropol.*, v. 132, n. 4, p. 605-621, 2007.

KIVISILD, T. Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investig Genet.*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2015.

KOLESAR, J. E. et al. Two-dimensional intact mitochondrial DNA agarose electrophoresis reveals the structural complexity of the mammalian mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.*, v. 41, n. 4, p. e58, 2013.

KUKAT, C. et al. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci*, v. 108, n. 33, p. 13534-9, 2011.

KUKAT, C. et al. Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci*, v.112, n. 36, p.11288-93, 2015.

KUMAR, B. et al. Association of mitochondrial copy number variation and T16189C polymorphism with colorectal cancer in North Indian population. *Tumour Biol*, v. 39, n. 11, p. 1-7, 2017.

LEAL, L. F. et al. Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations. *Sci Rep*, v. 9, n. 1, p. 3209, 2019.

LEE, H. C. et al. Heteroplasmic mutation of mitochondrial DNA D-loop and 4,977-bp deletion in human cancer cells during mitochondrial DNA depletion. *Mitochondrion*, v. 7, p. 157–163, 2007.

LEITE, D. et al. Paleogenetic Studies in Guajajara Skeletal Remains, Maranhão State, Brazil. *Journal of Anthropology*, p. 1-8, 2014.

LEVINE, B.; ELAZAR, Z. Development. Inheriting maternal mtDNA. *Science*, v. 334, n. 6059, p. 1069-70, 2011.

LEVY, M. S. The role of international migration on the evolution of the Brazilian population (1872 to 1972). *Rev Saúde Pública*, v. 8, n. Suppl, p. 49-90, 1974.

LI, M. et al. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete mitochondrial DNA genomes. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 87, p. 237–249, 2010.

LI, M. et al. Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *PNAS*, v. 112, n. 8, p. 2491-2496, 2015.

LLAMAS, B. et al. Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. *Sci Adv.*, v. 2, n. 4, p. e1501385, 2016.

LORENZ, J. G.; SMITH, D. G. Distribution of four founding mtDNA haplogroups among Native North Americans. *Am J Phys Anthropol*, v. 101, n. 3, p. 307-23, 1996.

LORENZ, S. Processos de purificação: expectativas ligadas à migração alemã para o Brasil (1880-1980). *Espaço Plural*, ano IX, n. 19, p. 29-38, 2008.

LUO, S. M.; SCHATTEEN, H.; SUN, Q. Y. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J Genet Genomics*, v. 40, n. 11, p. 549-56, 2013.

LUTZ, S. 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*, n.113, v. 1-3, p. 97-101, 2000.

- LUTZ-BONENGL, S.; PARSON, W. No further evidence for paternal leakage of mitochondrial DNA in humans yet. *Proc Natl Acad Sci*, v. 116, n. 6, p. 1821-1822, 2019.
- MANTA, F. S. et al. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol*, v. 40, n. 1, p. 94-8, 2013.
- MARQUES, S. L. et al. DNA genetic diversity-An update and a phylogenetic revision. *Forensic Sci Int Genet.*, v.15, p. 27-32, 2015.
- MARQUESE, R. B. A dinâmica da escravidão no Brasil: resistência, tráfico negro e alforrias, séculos XVII a XIX. *Novos estud. - CEBRAP*, São Paulo, n. 74, p. 107-123, 2006.
- MARRERO, A. R. et al. Demographic and Evolutionary Trajectories of the Guarani and Kaingang Natives of Brazil. *Am. J. Phys. Anthropol*, v. 132, p. 301-310, 2007.
- MAYNARD, S. et al. DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v.5, n. 10, 2015.
- MENDES-JUNIOR, C. T.; SIMÕES, A.L. Mitochondrial DNA Variability Among Eight Tikuna Villages: Evidence for an Intra-tribal Genetic Heterogeneity Pattern. *Am. J. Phys. Anthropol*. v. 140, p. 526–531, 2009.
- MERHEB, M. et al. Mitochondrial DNA, a Powerful Tool to Decipher Ancient Human Civilization from Domestication to Music, and to Uncover Historical Murder Cases. *Cells*, v. 8, n. 5, p. e433, 2019.
- MERCER, T. R. et al. The human mitochondrial transcriptome. *Cell*, v. 146, n. 4, p. 645-58, 2011.
- MIETTINEN, T. P.; BJÖRKLUND, M. Mitochondrial Function and Cell Size: An Allometric Relationship. *Trends Cell Biol*, v. 27, n. 6, p. 393-402, 2017.
- MISHMAR, D. et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci*, v. 100, n. 1, p. 171-6, 2003.
- MOLNAR, M. J.; KOVACS, G. G. Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol*, v. 145, p. 147-155, 2017.
- MONTIER, L. L. C.; DENG, J. J.; BAI, Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics*, v. 36, n. 3, p. 125–131, 2009.
- MOTA, A. S.; BARROSO, D. S. Economia e demografia da escravidão no Maranhão e no Grão-Pará: uma análise comparativa da estrutura da posse de cativos (1785-1850). *Rev. Hist.*, São Paulo, n. 176, p. a07815, 2017.
- MORENO-MAYAR, J. V. et al. Early human dispersals within the Americas. *Science*, v. 362, n. 6419, p. eaav2621, 2018.

- MORENO-MAYAR, J. V. et al. Terminal Pleistocene Alaskan genome reveals first founding population of Native Americans. *Nature*, v. 553, p. 203–207, 2018.
- MOUSAVIZADEH, K. et al. Usage of mitochondrial D-loop variation to predict risk for Huntington disease. *Mitochondrial DNA*, v. 26, n. 4, p. 579-82, 2015.
- NISHIMURA, Y. et al. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc Natl Acad Sci*, v. 103, n. 5, p. 1382-7, 2006.
- NICHOLLS, T. J.; MINCZUK, M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol*, v. 56, p. 175-81, 2014.
- NEI, M. Genetic support for the out-of-Africa theory of human evolution. *PNAS*, v. 92, n. 15, p. 6720-6722, 1995.
- NEWSON, L. A. The Demographic Collapse of Native Peoples of the Americas, 1492 – 1650. *Proceedings of the British Academy*, n. 81, p. 247-288, 1993.
- NOGUEIRA, T. L. S. et al. mtDNA control region analysis of North Brazilian population. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 6, p. e169-e170, 2017.
- PAKENDORF, B. STONEKING, M. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, v. 6, p. 165-183, 2005.
- PALENCIA, L. et al., Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input. *Int J Legal Med*, v. 124, n. 4, p. 331-6, 2010.
- PAPAVERO, C. G. *Mantimentos e víveres: o domínio colonial holandês no Brasil*. 2002. 377. Dissertação de Mestrado em Antropologia Social. - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- PARK, C. B.; LARSSON, N. G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*, v. 193, n. 5, p. 809-18, 2011.
- PARSON, W.; BANDELT, H. J. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*, v. 1, n. 1, p. 13-9, 2007.
- PARSON, W.; DÜR, A. EMPOP--a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 1, n. 2, p. 88-92, 2007.
- PARSON, W. et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet*, v. 13, p. 134-42, 2014.
- PARSON, W. et al. Massively parallel sequencing of complete mitochondrial genomes from hair shaft samples. *Forensic Sci Int Genet*, v. 15, p. 8-15, 2015.
- PARSONS, T. J. et al. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DANN control region. *Nat Genet.*, v. 15, n. 4, p. 363-8, 1997.

PEDERSEN, M. et al. Postglacial viability and colonization in North America's ice-free corridor. *Nature*, v. 537, n. 7618, p. 45-49, 2016.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS On.*, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PEREGO, U. A. et al. Distinctive Paleo-Indian Migration Routes from Beringia Marked by Two Rare mtDNA Haplogroups. *Curr. Biol*, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2009.

PRIETO, L. et al. The GHEP-EMPOP collaboration on mtDNA population data--A new resource for forensic casework. *Forensic Sci Int Genet*, v. 5, n. 2, p.146-51, 2011.

PIOVESAN, A. et al. On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res Notes*, v. 12, n. 1, p. 106, 2019.

PLAZA, S. et al. Insights into the western Bantu dispersal: mtDNA lineage analysis in Angola. *Hum Genet.*, v. 115, n. 5, p. 439-47, 2004.

POLETTI, M. M. et al. Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Parana state-increasing the Brazilian forensic database. *Int J Legal Med*, v. 133, n. 2, p. 347-351, 2019.

QUINTANA-MURCI, L. et al. Maternal traces of deep common ancestry and asymmetric gene flow between Pygmy hunter-gatherers and Bantu-speaking farmers. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 105, n. 5, p. 1596–1601, 2008.

RAKHA, A. et al. EMPOP-quality mtDNA control region sequences from Kashmiri of Azad Jammu & Kashmir, Pakistan. *Forensic Sci Int Genet*, v. 25, p. 125-131, 2016.

REZNIK, E. et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife*, v. 5, p. e10769, 2016.

RICHARDS, M. B.; SOARES, P.; TORRONI, A. Palaeogenomics: Mitogenomes and Migrations in Europe's Past. *Curr Biol*, v. 26, n. 6, p. R243-6, 2016.

RÖCK, A.W. et al. Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). *Forensic Sci Int Genet*, v. 7, n. 6, p. 601-9, 2013.

ROSA, A.; BREHM, A. African human mtDNA phylogeography at-a-glance. *J Anthropol Sci.*, v. 89, p. 25-58, 2011.

RUIZ-MARTINEZ, M. C. et al. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem*, v. 65, n. 20, p. 2851-8, 1993.

SALAS, A. et al. Mitochondrial Echoes of First Settlement and Genetic Continuity in El Salvador. *PLoS On*, v. 4, n. 9, p. e6882, 2009.

SALAS, A. et al. The African Diaspora: Mitochondrial DNA and the Atlantic Slave Trade. *Am J Hum Genet*, v., 74, n. 3, p. 454-465, 2004.

- SALAS, A. et al. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet*, v. 71, p. 1082-1111, 2002.
- SALAS, A. et al. The saga of the many studies wrongly associating mitochondrial DNA with breast cancer. *BMC Cancer*, v. 14, p. 659, 2014.
- SAMUELS, D. C. The power to detect disease associations with mitochondrial DNA Haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 78, n. 4, p. 713-720, 2006.
- SANCHES, N. M. et al. Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Espírito Santo state, Brazil. *Mol Biol Rep*, v. 41, p. 6645-6648, 2014.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTIBANEZ-KOREF, M. et al. Assessing mitochondrial heteroplasmy using next generation sequencing: A note of caution. *Mitochondrion*, v. 46, p. 302-306, 2019.
- SANTOS, E. T. et al. Brasil e a Idiosincrasia da Miscigenação. *Rev. UFMG*, Belo Horizonte, v. 22, n. 1 e 2, p. 232-249, 4 abr. 2016
- SCHAAN, A. P. et al. mtDNA structure: the women who formed the Brazilian Northeast. *BMC Evol Biol*, v. 17, n. 1, p. 185, 2017.
- SECHER B. et al. The history of the North African mitochondrial DNA haplogroup U6 gene flow into the African, Eurasian and American continents. *BMC Evol Biol.*, v. 14, p. 109, 2014.
- SHARMA, P.; SAMPATH, H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells*, v. 8, n. 2, p. e100, 2019.
- SHIH, S. Y. et al. Applications of Probe Capture Enrichment Next Generation Sequencing for Whole Mitochondrial Genome and 426 Nuclear SNPs for Forensically Challenging Samples. *Genes*, v. 9, n. 1, p. e49, 2018.
- SHOKOLENKO, I. et al. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, v. 37, n. 8, p. 2539-48, 2009.
- SILVA, E. Povos indígenas no Nordeste: contribuição a reflexão histórica sobre o processo de emergência étnica. *Revista de humanidades da Universidade Federal do Rio Grande do Norte*. v. 4, n. 7, 2003. Disponível em: <<https://periodicos.ufrn.br/mneme/article/view/163/153>>
Data de acesso: 02 fev. 2020
- SILVA, M. et al. 60,000 years of interactions between Central and Eastern Africa documented by major African mitochondrial haplogroup L2. *Sci Rep*, v. 5, p. 12526, 2015.
- SILVA; W. A. Jr., Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America. *Am J Hum Genet.*, v. 71, n. 1, p. 187-92, 2002.

SIMÃO, F. et al. Defining mtDNA origins and population stratification in Rio de Janeiro. *Forensic Sci Int Genet*, v. 34, p. 97-104, 2018.

SIMÃO, F. et al. The maternal inheritance of Alto Paraná revealed by full mitogenome sequences. *Forensic Sci Int Genet*, v. 39, p. 66-72, 2019.

SIMONI, L. et al. Geographic Patterns of mtDNA Diversity in Europe. *Am J Hum Genet.*, v. 66, n. 1, p. 262-78, 2000.

SMART, A.; BOLNICK, D. A.; TUTTON, R. Health and genetic ancestry testing: time to bridge the gap. *BMC Med Genomics*, v. 10, n. 1, p. 3, 2017.

SOARES, M. C. Mina, Angola e Guiné: Nomes d'África no Rio de Janeiro Setecentista. *Tempo*, v. 3, n. 6, 1998. Disponível em: <https://www.historia.uff.br/tempo/artigos_dossie/artg6-6.pdf> Data de acesso: 2 fev. 2020.

SOARES, P. et al. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am J Hum Genet.*, v. 84, n. 6, p. 740-59, 2009.

SOUCHAUD, S.; FUSCO, W. População e ocupação do espaço: o papel das migrações no Brasil. *Redes*, v. 17, n. 2, p. 5-17, 2012.

SOUZA, A. M. et al. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet. Mol. Biol.*, v. 42, n. 3, p. 495-508, 2019.

STEWART, J. B.; CHINNERY, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet.*, v. 16, n. 9, p. 530-42, 2015.

STEWART, J. E. et al. Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. *J Forensic Sci.*, v. 46, n. 4, p. 862-70, 2001.

STROBL, C. et al. Evaluation of the precision ID whole MtDNA genome panel for forensic analyses. *Forensic Sci Int Genet*, v. 35, p. 21-25, 2018.

SUTOVSKY, P. et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, v. 402, n. 6760, p. 371-2, 1999.

SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS (SWGDM). *Guidelines for Missing Persons Casework*. 2014. <<https://www.swgdam.org/publications>> Data de acesso: 03 jan. 2020.

SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS (SWGDM). *Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Analysis by Forensic DNA Testing Laboratories*. 2019. Disponível em: <<https://www.swgdam.org/publications>> Data de acesso: 03 jan. 2020.

TAMM, E. et al. Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS On*. v. 2, n. 9, p. e829, 2007.

- TORREGROSA-MUÑUMER, R. et al. Low doses of ultraviolet radiation and oxidative damage induce dramatic accumulation of mitochondrial DNA replication intermediates, fork regression, and replication initiation shift. *Mol Biol Cell*, v. 26, n. 23, p. 4197-4208, 2015.
- TORRONI, A. et al. Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations. *Genetics*, v.144, n. 4, p. 1835-50, 1996.
- TORRONI, A. et al. mtDNA Haplogroups and Frequency Patterns in Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 66, p.1173–1177, 2000.
- TORRONI, A., WALLACE, D.C. Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *J Bioenerg Biomembr.*, v. 26, p. 261–271, 1994.
- TURCHI, C. et al. Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing. *Int J Legal Med.*, v. 122, n. 3, p. 199-204, 2008.
- TSUTSUMI, H. et al. Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and a family analysis. *J Oral Sci.*, v. 48, n. 3, p. 145-52, 2006.
- TURCHI, C. et al. Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing. *Int J Legal Med.*, v. 122, n. 3, p. 199-204, 2008.
- VAN DEN BOGERT, C. et al. Regulation of the expression of mitochondrial proteins: relationship between mtDNA copy number and cytochrome-c oxidase activity in human cells and tissues. *Biochim Biophys Acta*, v. 1144, n. 2, p. 177-83, 1993.
- VAN HOUTEN, B.; HUNTER, S. E.; MEYER, J. N. Mitochondrial DNA damage induced autophagy, cell death, and disease. *Frontiers in Bioscience – Landmark Ed.* 21, p. 42-54, 2016.
- VAN HOUTEN, B.; SANTA-GONZALEZ, G. A.; CAMARGO, M. DNA repair after oxidative stress: current challenges. *Curr Opin Toxicol.*, v. 7, p. 9–16, 2018.
- VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*, v. 30, n. 2, p. e386-94, 2009.
- VOHR, S. H. et al. A phylogenetic approach for haplotype analysis of sequence data from complex mitochondrial mixtures. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 30, p. 93-105, 2017.
- WALLACE, D. C. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest*, v. 123, n. 4, p. 1405-12, 2013.
- WALLACE, D. C. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, v. 51, n. 5, p. 440-50, 2010.
- WARD, R. H. et al. Mitochondrial DNA Polymorphism in Three Brazilian Indian Tribes. *Am J Hum Biol.*, v. 8, n. 3, p. 317-323, 1996.

WATSON, E. et al. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am J Hum Genet.*, c. 61, n. 3, p. 691-704, 1997.

WITAS, H. W.; ZAWICKI, P. Mitochondrial DNA and human evolution: A review. *Anthropol. Rev.*, v. 67, p. 97-110, 2004.

WOOD, M. R. et al. Resolving mitochondrial haplogroups B2 and B4 with next-generation mitogenome sequencing to distinguish Native American from Asian haplotypes. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 43, p. 102-143, 2019.

WOODS, D. C.; KHRAPKO, K.; TILLY, J. L. Influence of Maternal Aging on Mitochondrial Heterogeneity, Inheritance, and Function in Oocytes and Preimplantation Embryos. *Genes*, v. 9, n. 5, 2018.

YANG, E. C. et al. Highly Conserved Mitochondrial Genomes among Multicellular Red Algae of the Florideophyceae. *Genome Biol Evol*, v. 7, n. 8, p. 2394–2406, 2015.

YANG, S. mtDNAprofiler: A Web Application for the Nomenclature and Comparison of Human Mitochondrial DNA Sequences. *J. Forensic Sci.*, v. 58, n. 4, p. 972-980, 2013.

YAO, Y. G.; BRAVI, C. B.; BANDEL, H. J. A call for mtDNA data quality control in forensic science. *Forensic Sci Int*, v. 141, n. 1, p. 1-6, 2004.

YU, E. P.; BENNETT, M. R. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab*, v. 25, n. 9, p. 481-7, 2014.

ZACHAR, I.; SZATHMÁRY, E. Breath-giving cooperation: critical review of origin of mitochondria hypotheses: Major unanswered questions point to the importance of early ecology. *Biol Direct*, v. 12, n. 1, p. 19, 2017.

ZAPICO, S. C.; UBELAKER, D. H. Relationship Between Mitochondrial DNA Mutations and Aging. Estimation of Age-at-death. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 71, n. 4, p. 445-50, 2016.

ZHANG, R. et al. Heteroplasmy concordance between mitochondrial DNA and RNA. *Sci Rep.*, v. 9, n. 1, p. 12942, 2019.

ZHANG, R. et al. Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics*, v. 18, n. 1, p. 890, 2017.

ZHOU, Q. et al. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science*, v. 353, n. 6297, p. 394-9, 2016.

ZIĘTKIEWICZ, E. et al. Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *J. Appl. Genet.*, v. 53, p. 41-60, 2012.

ZIMMERMANN, B. et al. Improved visibility of character conflicts in quasi-median networks with the EMPOP NETWORK software. *Croat Med J*, v. 55, n. 2, p. 115–120, 2014.

ZONG, W. X.; RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell.*, v. 61, n. 5, p. 667–676, 2016.

MA060	C1	1	16189C	16298C	16325C	16327T	16519C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	366R	489C
MA062	L2b2	1	16114A 204C	16129A 263G	16213A 309.1C	16223T 315.1C	16278T	16390A	73G	146C	150T	152C	182T	183G	195C	198T
MA063	B2	1	16183C	16189C	16217C	16240G	16319A	16519C	73G	146C	152C	263G	309.1C	315.1C	499A	
MA065	L3e4a	1	16051G	16223T	16264T	16269G	16519C	73G	150T	263G	315.1C	523del	524del			
MA066	A2+(64)	1	16111T 366R	16223T 411S	16290T 445M	16319A 523del	16362C 524del	16519C 574C	64T 576C	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C
MA071	L2a1a2	1	16223T	16278T	16286T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C
MA074	B4b	1	16182C 499A	16183C	16189C	16217C	16241G	16519C	73G	103A	152C	263G	297G	309.1C	309.2C	315.1C
MA075	C1b	1	16223T 524del	16325C	16327T	73G	150T	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G	523del
MA078	D1	1	16223T	16325C	16362C	73G	263G	315.1C	489C							
MA079	C1b	1	16126C 309.2C	16223T 315.1C	16270T 489C	16298C 493G	16325C 523del	16327T 524del	71A	73G	139C	249del	263G	290del	291del	309.1C
MA081	L1c2a1a	1	16071T 16527T	16129A 73G	16145A 151T	16187T 152C	16189C 182T	16213A 186A	16223T 189C	16234T 195C	16265C 198T	16278T 247A	16286G 263G	16294T 297G	16311C 315.1C	16360T 316A
MA087	C1b	1	16126C 315.1C	16223T 489C	16270T 493G	16298C 499A	16325C 523del	16327T 524del	71A	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	309.2C
MA088	L3b3	1	16048A	16124C	16223T	16278T	16362C	73G	185A	189G	263G	315.1C	385G	523del	524del	
MA090	L3e1a	1	16185T	16223T	16327T	16519C	73G	150T	189G	200G	263G	315.1C				
MA091	B4b	1	16182C	16183C	16189C	16217C	16241G	16519C	16566A	73G	103A	152C	263G	310C	499A	
MA094	B4b	1	16183C 499A	16189C 523del	16217C 524del	16316G	16519C	57G	73G	146C	151T	262A	263G	309.1C	309.2C	315.1C
MA101	C1b	1	16126C 524del	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	315.1C	489C	493G	523del
MA109	A2	1	16111T 524del	16223T	16290T	16319A	16362C	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	309.2C	315.1C	523del
MA117	L2a1	1	16189C	16192T	16223T	16245T	16278T	16294T	16309G	16390A	73G	143A	146C	152C	263G	315.1C
MA132	C1b2	1	16223T	16298C	16325C	16327T	16519C	73G	249del	290del	291del	315.1C	489C	493G	523del	524del
MA138	H	1	16129A	16519C	263G	315.1C										
MA147	L3e4a	1	16051G	16170G	16264T	16519C	73G	150T	263G	315.1C	523del	524del				
MA151	C1b	1	16129A 309.2C	16223T 315.1C	16298C 489C	16325C 493G	16327T 523del	42C 524del	73G	139C	207A	249del	263G	290del	291del	309.1C
MA159	L2a1+16189+(16192)	1	16189C	16192T	16223T	16278T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	315.1C
MA160	L3e1	1	16183M 315.1C	16189C	16223T	16311C	16327T	73G	150T	189G	200G	204C	214G	263G	309.1C	309.1C
MA162	A2+(64)	1	16111T 523del	16192T 524del	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C

MA163	B4b	1	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	315.1C	499A				
MA164	D1f1	1	16142T	16179T	16223T	16295T	16325C	16362C	16497G	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C	489C		
MA165	D4h3a	1	16114T	16172C	16223T	16241G	16311C	16342C	16362C	73G	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C	489C
MA166	B4b	3	16173T	16182C	16183C	16189C	16217C	16223T	16357C	16519C	73G	263G	306del	307del	308del	309del	
MA167	L1b1a10	1	16126C	16187T	16189C	16223T	16264T	16270T	16278T	16311C	16519C	73G	151T	152C	182T	185T	
MA168	A2+(64)+@153	1	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	59C	64T	73G	146C	204C	235G	263G	315.1C	523del	524del
MA170	A2+(64)	1	16092C	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	16468C	16519C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	
MA173	R0	2	16519C	263G	309.1C	309.2C	315.1C										
MA176	L1c1'2'4'5'6	1	16148Y	16187T	16189C	16223T	16274A	16278T	16287T	16294T	16311C	16320T	16360T	16519C	73G	89C	
MA177	B4b	1	93G	146C	151T	152C	182T	186A	189T	195C	236C	247A	263G	297G	315.1C	316A	523del
MA177	B4b	1	16182C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	150T	263G	315.1C	499A	524.1A	524.2C	524.3A	524.4C	
MA182	R0	1	16320A	16519C	195C	263G	315.1C										
MA183	L3k1	1	16209C	16223T	16355T	73G	150T	152C	204C	207A	235G	263G	315.1C	494T			
MA184	C1b8	1	16223T	16292T	16298C	16325C	16327T	16362C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C	493G
MA186	A2+(64)	1	16126C	16223T	16278T	16290T	16319A	16362C	59C	64T	73G	146C	152C	153G	235G	263G	297G
MA188	L1c1a2	1	16129A	16189C	16223T	16274A	16278T	16293G	16294T	16311C	16360T	16519C	73G	89C	93G	95C	152C
MA190	B4b	1	16126C	16183C	16189C	16217C	16232A	16372C	16519C	73G	263G	315.1C	499A				
MA191	M	1	16209C	16223T	16325C	16362C	73G	263G	309.1C	315.1C	489C						
MA192	M	1	16126C	16223T	16278T	16290T	16319A	16362C	73G	210G	263G	315.1C	489C				
MA193	A2+(64)	1	16126C	16223T	16278T	16290T	16319A	16362C	59C	62T	64T	73G	146C	152C	153G	235G	263G
MA194	C1	1	16223T	16259T	16298C	16325C	16327T	16365T	16526A	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C
MA196	R	1	73G	152C	263G	315.1C	523del	524del									
MA197	M	1	16223T	16239T	16288C	16325C	16362C	73G	210G	228A	263G	315.1C	489C				
MA198	R0	1	16320A	16519C	195Y	263G	315.1C										
MA203	B2b3a	2	16168T	16182C	16183C	16189C	16217C	16249C	16312G	16519C	73G	152C	263G	271T	309.1C	309.2C	315.1C
MA204	L1b	1	16126C	16145A	16183C	16189C	16223T	16264T	16270T	16278T	16293G	16311C	16519C	73G	152C	182T	185T
			185T	195C	247A	263G	309.1C	309.2C	315.1C	357G	461T	523del	524del				

MA205	L2b2	1	16114A 263G	16213A 315.1C	16223T	16278T	16390A	73G	146C	150T	152C	182T	183G	195C	198T	204C
MA207	L0d1b1c	1	16129A 200G	16179T 247A	16187T 309.1C	16189C 315.1C	16223T 498del	16230G	16243C	16311C	16390T	16519C	73G	146C	188G	195C
MA210	R0	1	16519C	263G	309.1C	315.1C	524.1A	524.2C								
MA213	R0	1	16519C	263G	309.1C	315.1C										
MA214	L4b2b1	1	16051G 73G	16093Y 146C	16114T 152C	16189C 195C	16192T 244G	16223T 263G	16293T 315.1C	16311C 340T	16316G 523del	16355T 524del	16362C	16384R	16399G	16519C
MA215	L3e2b+152	1	16172C	16189C	16223T	16320T	16519C	73G	150T	152C	195C	263G	315.1C			
MA216	B4b	1	16178C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	315.1C	499A					
MA217	A2+(64)	1	16111T 315.1C	16192T 523del	16223T 524del	16262T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C
MA218	L2a1	1	16189C	16223T	16278T	16294T	16309G	16390A	16519C	73G	146C	152C	195C	263G	315.1C	
MA219	L2b2	1	16114A 198T	16129A 204C	16213A 263G	16223T 309.1C	16274A 315.1C	16278T	16390A	73G	146C	150T	152C	182T	183G	195C
MA222	D1f1	1	16142T 524.2C	16179T	16223T	16295T	16325C	16362C	16497G	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C	489C	524.1A
MA224	A2+(64)	1	16111T 524del	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	315.1C	523del
MA226	B4b	1	16182C	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	315.1C	499A	524.1A	524.2C	524.3A	524.4C	
MA229	L3d2	1	16111T	16124C	16223T	16519C	73G	152C	199C	263G	309.1C	315.1C	523del	524del		
MA230	L4b2	1	16093G 244G	16223T 263G	16287A 315.1C	16293T 513A	16311C	16355T	16362C	16399G	73G	146C	150T	152C	195C	200G
MA233	A2+(64)+@153	1	16093C 263G	16111T 315.1C	16223T 338T	16290T	16311C	16319A	16362C	16468C	16519C	64T	73G	146C	185A	235G
MA239	L2d+16129	1	16129A 263G	16182C 309.1C	16183C 309.2C	16189C 315.1C	16278T 456T	16300G	16354T	16390A	16399G	16519C	73G	146C	150T	195C
MA244	U5b1e	1	16172C 309.1C	16183C 309.2C	16189C 315.1C	16270T	16274A	16311C	16325C	16465T	16519C	73G	150T	152C	195C	263G
MA245	A2	3	16111T 523del	16223T 524del	16290T	16319A	16344T	16362C	73G	146C	153G	207A	235G	263G	309.1C	315.1C
MA253	U6a'b'd+16311	1	16051G	16172C	16219G	16311C	73G	263G	315.1C	573.1C						
MA254	C1d	1	16051G 291del	16093C 315.1C	16223T 489C	16287T 523del	16290T 524del	16298C	16311C	16325C	16327T	16519C	73G	249del	263G	290del
MA255	M	1	16223T	16325C	16362C	73G	204C	207A	263G	315.1C	455.1T	455.2T	463.1C	460C	489C	
MA295	C1b8	1	16223T 493G	16292T 513del	16298C 514del	16325C	16327T	16362C	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C
MA296	C1d+194	1	16051G 489C	16223T 523del	16298C 524del	16325C	16327T	16519C	73G	194T	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C
MA297	A2+(64)+@153	1	16111T	16192T	16223T	16290T	16319A	16343G	16362C	64T	73G	146C	151T	235G	263G	309.1C

			315.1C	523del	524del											
MA299	J1b1a1	1	16069T	16126C	16145A	16172C	16222T	16261T	73G	242T	263G	295T	309.1C	315.1C	462T	489C
MA305	L1c3b	1	16129A	16163G	16187T	16189C	16223T	16278T	16293G	16294T	16311C	16360T	16519C	73G	151T	152C
			182T	186A	189C	247A	263G	315.1C	316A	523del	524del					
MA306	A2+(64)	1	16223T	16290T	16319A	16362C	16527T	59C	62T	64T	73G	153G	235G	263G	309.1C	315.1C
			523del	524del												
MA309	L3e1a3b	1	16093C	16185T	16223T	16311C	16327T	73G	150T	152C	189G	200G	263G	309.1C	315.1C	
MA311	R0	1	16519C	152C	263G	315.1C										
MA315	L3b3	1	16124C	16223T	16278T	16293G	16362C	16519C	73G	263G	315.1C	523del	524del			
MA320	C1+16311	1	16153A	16223T	16298C	16311C	16325C	16327T	16526A	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C
			489C	493G	523del	524del										
MA322	L3e1b2	1	16223T	16325del	16327T	73G	150T	185A	189G	263G	309.1C	315.1C				
MA323	L0a2a2	1	16148T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T	16519C	64T	93G	152C	189G
			204C	207A	236C	247A	263G	309.1C	315.1C	523del	524del					
MA402	H	1	16519C	93G	263G	315.1C										
MA403	C1b	1	16223T	16298C	16325C	16327T	73G	150T	185A	249del	263G	290del	291del	309.1C	315.1C	489C
			493G	523del	524del											
MA405	L3e4a	1	16051G	16216G	16223T	16264T	16519C	73G	150T	263G	309.1C	315.1C	523del	524del		
MA406	L3e3	1	16223T	16265T	16519C	73G	150T	195C	263G	315.1C	523del	524del				
MA407	L0a1b	1	16129A	16148T	16168T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16278T	16293G	16311C	16320T	93G
			95C	185A	189G	236C	247A	263G	309.1C	315.1C	523del	524del				
MA408	B4b	1	16183C	16189C	16217C	16519C	73G	263G	315.1C	499A	524.1A	524.2C	524.3A	524.4C		
MA419	L1b1a+189	1	16126C	16187T	16189C	16223T	16264T	16270T	16278T	16293G	16311C	16519C	73G	152C	182T	185T
			189G	195C	247A	263G	315.1C	357G	523del	524del						
MA420	L2a1	1	16223T	16278T	16294T	16309G	16327T	16362C	16390A	16519C	73G	143A	146C	152C	195C	263G
			309.1C	315.1C	523del	524del										
MA421	L2a1	1	16223T	16278T	16294T	16309G	16362C	16390A	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C
			523del	524del												
MA422	L1c3a	1	16086C	16129A	16189C	16215G	16223T	16278T	16294T	16311C	16360T	16519C	73G	152C	182T	186A
			189C	195C	198T	247A	263G	315.1C	316A	338T	523del	524del				
MA424	A2+(64)	1	16126C	16223T	16278T	16290T	16319A	16362C	59C	64T	73G	146C	152C	153G	235G	263G
			297G	309.1C	315.1C	523del	524del									
MA431	A2+(64)+@153	1	16111T	16195C	16223T	16290T	16319A	16362C	73G	143A	146C	235G	263G	309.1C	315.1C	524.1A
			524.2C													
MA432	H1c	1	16519C	263G	309.1C	315.1C	477C									
MA435	L3e2	1	16223T	16258T	16320T	16519C	73G	150T	189G	195C	263G	315.1C				
MA441	L3e2a1	1	16223T	16320T	16519C	73G	150T	195C	198T	263G	309.1C	315.1C				
MA442	B2i1	1	16179A	16182M	16183C	16189C	16217C	16311C	16519C	73G	263G	309.1C	309.2C	315.1C	430C	485C
			499A	524.1A	524.2C											
MA446	HV	1	16189C	16356C	16519C	263G	315.1C	523del	524del							

MA447	L3d1b	1	16124C	16223T	16311C	16399G	73G	150T	152C	263G	315.1C	523del	524del			
MA450	L1c1c	1	16086C 73G 417A	16129A 151T 523del	16169T 152C 534T	16172C 182T	16189C 186A	16192T 189C	16213A 195C	16223T 247A	16261T 249del	16278T 263G	16293G 297G	16311C 309.1C	16360T 315.1C	16519C 316A
MA455	L3e2b	1	16172C	16189C	16223T	16320T	16519C	73G	150T	195C	263G	309.1C	315.1C			
MA456	B4b	1	16183C	16189C	16217C	16327T	16519C	73G	263G	315.1C	499A	524.1A	524.2C	524.3A	524.4C	
MA462	L2a1	1	16223T 523del	16278T 524del	16294T	16309G	16318G	16390A	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C	315.1C
MA463	A2+(64)	1	16111T 315.1C	16223T 338T	16290T 523del	16319A 524del	16362C	16468C	16519C	64T	73G	146C	153G	185A	235G	263G
MA464	A2+(64)+@153	1	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	16468C	16519C	73G	263G	309.1C	315.1C	338T	523del	524del
MA465	B4b	1	16183C 524del	16189C 569T	16217C	16311C	16319A	16519C	16524G	73G	263G	309.1C	309.2C	315.1C	499A	523del
MA468	B2b3a	1	16182C 315.1C	16183C 499A	16189C	16217C	16249C	16312G	16344T	16519C	73G	152C	263G	271T	309.1C	309.2C
MA471	L2a1c1	1	16086C	16223T	16278T	16294T	16309G	16390A	73G	143A	146C	152C	195C	198T	263G	315.1C
MA472	L3f1b1	1	16209C	16223T	16292T	16295T	16304C	16311C	16519C	73G	189G	263G	315.1C			
MA474	L1b1a+189	1	16126C 185T	16187T 189G	16189C 195C	16223T 207A	16264T 247A	16266T 263G	16270T 315.1C	16278T 357G	16293G 523del	16311C 524del	16519C	73G	152C	182T
MA481	L2a1c+16086	1	16086C	16223T	16278T	16294T	16309G	16390A	73G	143A	146C	152C	195C	263G	315.1C	
MA482	A2+(64)	1	16111T 524del	16223T	16290T	16319A	16362C	64T	73G	146C	153G	235G	263G	315.1C	485C	523del
MA484	C1b	1	16223T 523del	16289C 524del	16325C	16327T	73G	249del	263G	290del	291del	309.1C	309.2C	315.1C	489C	493G
MA485	L3b1a9a	1	16051G	16223T	16240G	16278T	16318G	16362C	16519C	73G	263G	315.1C	523del	524del		
MA487	B2	1	16183C 499A	16189C 523del	16217C 524del	16316G	16519C	73G	146C	151T	153G	159C	263G	309del	315.1C	327T
MA489	B4b	1	16183C	16189C	16217C	16241G	16519C	73G	103A	189G	263G	309.1C	315.1C	499A	522T	
MA491	L2a1	1	16092Y 315.1C	16223T 523del	16278T 524del	16294T	16309G	16390A	16400T	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C

APÊNDICE B – Matriz representativa do resultado do teste de não-diferenciação para as linhagens africanas.

AFRICANA	Maranhão	Piauí	Ceará	RN	Pernambuco	Alagoas	Nordeste	Sudeste	Sul
Maranhão	-								
Piauí	0,06150 ± 0,0017	-							
Ceará	0,10425 ± 0,0015	0,62905 ± 0,0024	-						
Rio Grande do Norte	0,01069 ± 0,0007	0,00347 ± 0,0004	0,02670 ± 0,0009	-					
Pernambuco	0,01870 ± 0,0006	0,01175 ± 0,0006	0,01677 ± 0,0005	0,00000 ± 0,0000	-				
Alagoas	0,00012 ± 0,0001	0,00045 ± 0,0001	0,00078 ± 0,0001	0,00000 ± 0,0000	0,34815 ± 0,0022	-			
Nordeste	0,00633 ± 0,0005	0,97045 ± 0,0010	0,43342 ± 0,0029	0,00001 ± 0,0000	0,01417 ± 0,0007	0,00003 ± 0,0000	-		
Sudeste	0,05851 ± 0,0020	0,14248 ± 0,0034	0,54224 ± 0,0028	0,00000 ± 0,0000	0,01342 ± 0,0007	0,00000 ± 0,0000	0,00043 ± 0,0002	-	
Sul	0,00000 ± 0,0000	0,00008 ± 0,0001	0,02474 ± 0,0007	0,00000 ± 0,0000	-				

Nota: Já que os testes foram realizados para 36 comparações estatísticas, a correção de Bonferroni foi utilizada para ajustar o nível de significância, resultando em $\alpha = 0,00139$ (i.e. $0,05/36$).

Fonte: Maranhão – Presente estudo, 2020; Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte – SCHAAN et al., 2017; Pernambuco – ALVES-SILVA et al., 2000; SCHAAN et al., 2017; Alagoas – BARBOSA et al., 2008; SCHAAN et al., 2017; Nordeste – SCHAAN et al. 2017; Sudeste – FRIDMAN et al., 2014; Sul – PALENCIA et al. 2010; POLLETO et al. 2019.

APÊNDICE C – Matriz representativa do resultado do teste de não-diferenciação para as linhagens ameríndias.

AMERÍNDIA	Maranhão	Piauí	Ceará	RN	Pernambuco	Alagoas	Nordeste	Norte	Sudeste	Centro-Oeste	Sul
Maranhão	-										
Piauí	0,06836 ± 0,0016	-									
Ceará	0,20835 ± 0,0023	0,02020 ± 0,0007	-								
Rio Grande do Norte	0,48945 ± 0,0037	0,00015 ± 0,0001	0,34973 ± 0,0025	-							
Pernambuco	0,00290 ± 0,0002	0,00613 ± 0,0004	0,00003 ± 0,0000	0,00003 ± 0,0000	-						
Alagoas	0,63287 ± 0,0030	0,00361 ± 0,0003	0,52187 ± 0,0025	0,85866 ± 0,0019	0,00002 ± 0,0000	-					
Nordeste	0,97834 ± 0,0005	0,00546 ± 0,0005	0,20869 ± 0,0022	0,23615 ± 0,0042	0,00016 ± 0,0000	0,56479 ± 0,0040	-				
Norte	0,00019 ± 0,0001	0,00001 ± 0,0000	0,30892 ± 0,0025	0,00008 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000	0,00050 ± 0,0001	0,00002 ± 0,0000	-			
Sudeste	0,27854 ± 0,0040	0,00000 ± 0,0000	0,22923 ± 0,0023	0,95263 ± 0,0014	0,00000 ± 0,0000	0,53992 ± 0,0037	0,00729 ± 0,0008	0,00001 ± 0,0000	-		
Centro-Oeste	0,62392 ± 0,0033	0,05288 ± 0,0017	0,03246 ± 0,0009	0,01441 ± 0,0010	0,01435 ± 0,0006	0,04009 ± 0,0015	0,13483 ± 0,0037	0,00000 ± 0,0000	0,00051 ± 0,0002	-	
Sul	0,10411 ± 0,0022	0,00000 ± 0,0000	0,68139 ± 0,0021	0,57660 ± 0,0038	0,00000 ± 0,0000	0,48200 ± 0,0033	0,02434 ± 0,0014	0,00550 ± 0,0004	0,39582 ± 0,0044	0,00082 ± 0,0002	-

Nota: Já que os testes foram realizados para 55 comparações estatísticas, a correção de Bonferroni foi utilizada para ajustar o nível de significância, resultando em $\alpha = 0,0009$ (i.e. $0,05/55$).

Fonte: Maranhão – Presente estudo, 2020; Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte – SCHAAN et al., 2017; Pernambuco – ALVES-SILVA et al., 2000; SCHAAN et al., 2017; Alagoas – BARBOSA et al., 2008; SCHAAN et al., 2017; Nordeste – SCHAAN et al. 2017; Norte – NOGUEIRA et al., 2017; Sudeste – FRIDMAN et al., 2014; Centro-Oeste – FREITAS et al. 2019; Sul - PALENCIA et al. 2010; POLLETO et al. 2019.

APÊNDICE D – Matriz de distância genética F_{ST} entre Maranhão e três populações brasileiras (diagonal inferior) e o valor de p (diagonal superior).

	Maranhão	Rio de Janeiro	Espírito Santo	São Paulo	Santa Catarina	Paraná
Maranhão	-	0,00149 ± 0,0004	0,02495 ± 0,0016	0,00129 ± 0,0004	0,00000 ± 0,0000	0,00089 ± 0,0003
Rio de Janeiro	0,00819	-	0,51955 ± 0,0053	0,22028 ± 0,0038	0,00000 ± 0,0000	0,00000 ± 0,0000
Espírito Santo	0,00644	-0,00053	-	0,71854 ± 0,0046	0,00020 ± 0,0001	0,00000 ± 0,0000
São Paulo	0,00991	0,00115	-0,00168	-	0,00020 ± 0,0001	0,00000 ± 0,0000
Santa Catarina	0,03234	0,01822	0,01744	0,01387	-	0,00178 ± 0,0005
Paraná	0,01193	0,01614	0,0201	0,01969	0,01762	-

Nota: Já que os testes foram realizados para 15 comparações estatísticas, a correção de Bonferroni foi utilizada para ajustar o nível de significância, resultando em $\alpha=0,00333$ (i.e. 0,05/15).

Fonte: Maranhão – Presente estudo, 2020; Rio de Janeiro – SIMÃO et al., 2018; Espírito Santo – SANCHES et al., 2014; São Paulo – PRIETO et al., 2011; Santa Catarina – PALENCIA et al., 2010; Paraná – POLETTTO et al., 2019.

APÊNDICE F – Frequência das linhagens ameríndias em tribos da América do Sul e linhagens africanas encontradas em países da África por outros estudos.

(a)

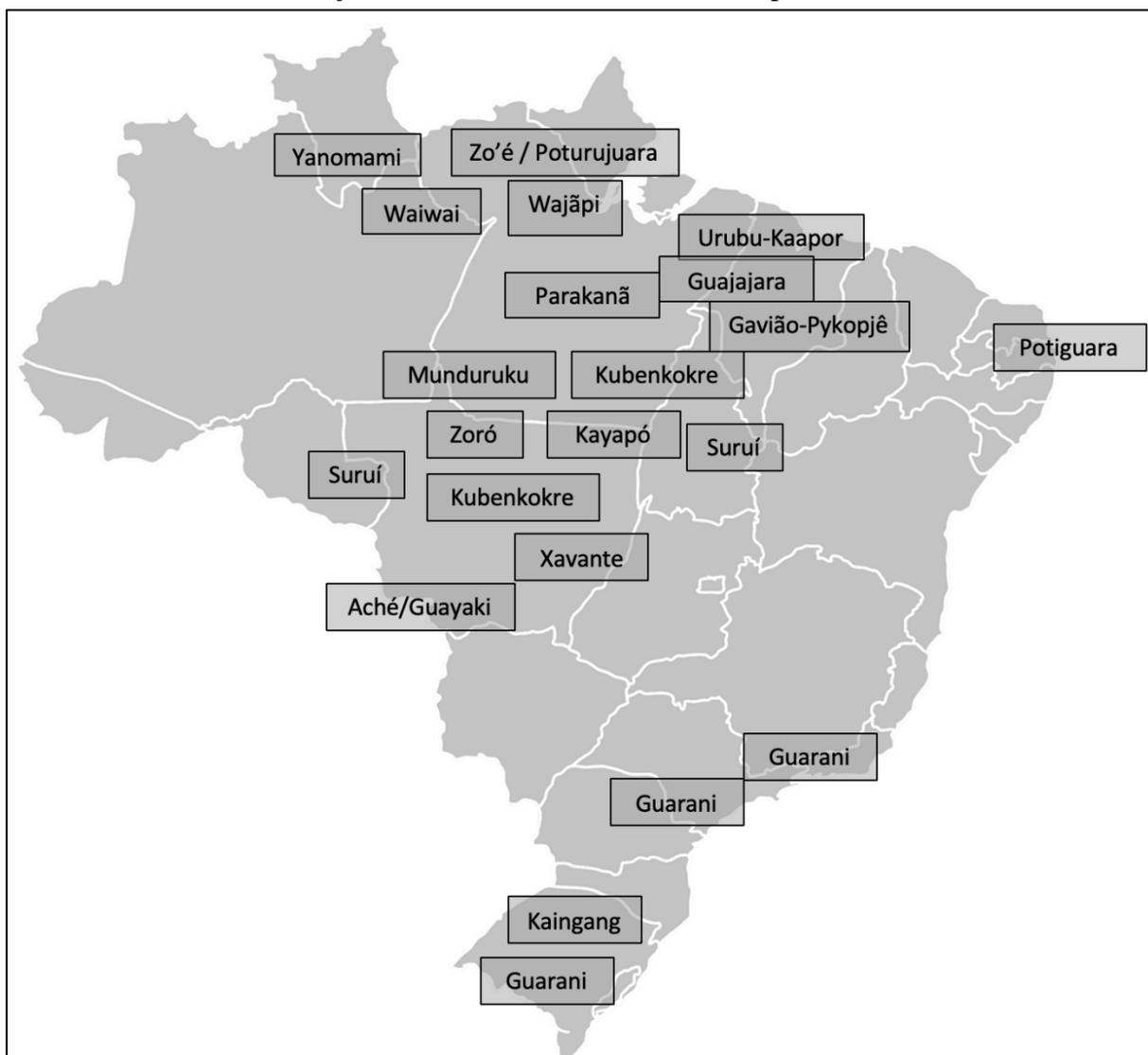
HP	Tupi-Guarani ² N=200	Poturujara ² N=20	Wayampi ² N=24	Krahó ² N=8	Aché ² N=63	Urubu-kaapor ² N=42	Kubenkokre ² N=4	Xavantes ² N=25	Parakanã ² N=13	Kaingang-Jêan ² N=78	Suruí ² N=44	Gavião ² N=43	Zoró ² N=30	Mundurukú ² N=40
A	84%	45%	75%	50%	10%	22%	0%	16%	8%	47%	11%	9%	20%	13%
B	0%	0%	0%	38%	90%	33%	100%	84%	23%	4%	2%	9%	3%	15%
C	9,5%	25%	17%	12%	0%	14%	0%	0%	46%	49%	0%	0%	13%	10%
D	6,5%	30%	8%	0%	0%	31%	0%	0%	23%	0%	87%	82%	64%	62%

(b)

Região	Países	Todos Hp - L	L0 - outros	L0a	L0d	L1	L1b	L1c	L2 - outros	L2a	L2b	L2c	L2d	L3 - outros	L3b	L3d	L3e	L3f	L3k	L4 - L6
Leste Africa	Somália, Uganda	6%	3%	19%	0%	0%	0%	3%	1%	14%	1%	0%	0%	13%	8%	3%	7%	3%	0%	20%
Norte Africa	Mauritânia	83%	1%	1%	0%	0%	7%	0%	0%	2%	1%	0%	0%	0%	1%	1%	3%	1%	0%	0%
Sudeste Africa	Moçambique, Zimbábue, Tunísia	0%	0%	28%	4%	0%	2%	7%	0%	34%	1%	0%	0%	1%	2%	4%	15%	1%	0%	1%
Sudoeste Africa	Angola	2%	0%	11%	0%	2%	1%	25%	0%	7%	6%	2%	0%	0%	4%	6%	24%	11%	0%	1%
Centro-Oeste Africa	*	8%	0%	6%	0%	0%	8%	3%	1%	21%	4%	2%	0%	1%	10%	7%	16%	10%	1%	1%
Maranhão		38%	0%	1%	1%	0%	3%	5%	1%	7%	3%	0%	0%	1%	3%	2%	10%	1%	1%	1%

Legenda: HP: Haplogrupo; (a) Frequência das linhagens ameríndias encontradas em tribos localizadas na América do Sul; (b) Frequência das linhagens africanas encontradas em países da África. *Camarões, Chad, Burkina Faso, Benin, Gambia, Gana, Costa do Marfim, Mali, Nigéria, Serra Leoa e Togo.

Fonte: (a) Adaptado de MARRERO et al., 2007; (b) Adaptado de SALAS et al., 2002.

APÊNDICE G – Localização das tribos brasileiras citadas no presente estudo.

Fonte: A autora, 2020. Baseado em INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2018 e Dicionário Tupi-Guarani. WEB: <https://www.dicionariotupiguarani.com.br/mapas/>. Acesso em 02 jan. 2020.

APÊNDICE I – Trabalho apresentado no XVI Congresso Nacional de Criminalística, realizado em Goiânia (GO), em outubro de 2019.

ANÁLISE GENÉTICA DA LINHAGEM MATRILÍNEA DE INDIVÍDUOS MARANHENSES PARA FINS DE BANCOS DE DADOS POPULACIONAL E FORENSE

A. B. R. Gonçalves^{a*}, T. L. S. Nogueira^b, R. S. Azulay^a, M. B. Gomes^a, E. F. Carvalho^a, D. A. Silva^a

^a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, 20550900.

^b Instituto de Biologia do Exército (IBEx), Rio de Janeiro, RJ, 20911270.

*gonannab@gmail.com

INTRODUÇÃO

A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) humano pode ser uma potente ferramenta de identificação de vítimas e desaparecidos, principalmente quando outras metodologias não alcançam resultados satisfatórios, como em situações em que o material biológico se encontra escasso ou muito degradado (WEEDN; BAUM, 2011). Estas condições são frequentemente encontradas em desastres em massa como os que aconteceram nos últimos anos nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Apesar das vantagens e importância da utilização do mtDNA para a identificação forense, estudos acerca da herança mitocondrial da população brasileira ainda são escassos, o que reduz a confiabilidade de resultados para a identificação humana através do mtDNA no país. Além, o aumento da contribuição aos bancos genéticos de mtDNA colaboraria com a análise da ancestralidade materna da população brasileira, de forma a contribuir não só em casos forenses, mas também para estudos clínicos e populacionais.

OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região controle completa do mitogenoma de indivíduos da população do Estado Brasileiro do Maranhão, de modo a corroborar com estudos de ancestralidade e expandir o banco de dados genético de mtDNA.

METODOLOGIA

Foram selecionadas amostras de sangue de 67 indivíduos, dentre homens nascidos no Estado do Maranhão. O DNA foi extraído pelo método resina quelante Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories), amplificado por PCR (QIAGEN Multiplex PCR kit) utilizando *primers* para a região controle do mtDNA. A sequência de técnicas moleculares utilizadas pode ser acompanhada como ilustrado na Figura 1. Os eletroferogramas foram analisados de acordo com as atuais diretrizes da *International Society for Forensic Genetics* (PARSON *et al.*, 2014), comparando as sequências de mtDNA estudadas com a sequência referência de Cambridge revisada (rCRS) (ANDREWS *et al.*, 1999). Para determinar os haplogrupos, foi utilizada a base de dados populacional EMPOP mtDNA *database* v4/R12 (PARSON; DÜR, 2007). O software GraphPad Prism versão 7.00 foi utilizado para realizar os cálculos estatísticos deste estudo.

Figura 1: Técnicas moleculares utilizadas no processamento das amostras.

Extração e Amplificação Purificação Enzimática Reação de Sequenciamento

Chelex 100 (Bio-Rad) e QIAGEN Multiplex PCR Kit

ExoSAP-IT (Applied Biosystems).

BigDye® Terminator (Applied Biosystems).

Purificação

Eletroforese Capilar

Eletroferograma

Sephadex (GE Healthcare Life Sciences).

Applied Biosystems™ 3500 Series (ABI-3500).

Software SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

Fonte: Adaptado de: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-sciences/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-workflow.html>

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das sequências mitocondriais oriundas da população estudada evidenciou marcada contribuição de ancestralidade africana (41,791%), com maior frequência do haplogrupo L, seguida pelas linhagens ameríndia (40,299%), cujos haplogrupos proporcionalmente observados foram A e C, e por último, a europeia (17,910%) com maior predominância dos haplogrupos H e R0 (Figura 2).

Este é o primeiro trabalho a relatar a composição genética matrilinea de indivíduos maranhenses. Com isso, juntamente com outros trabalhos que estudaram a composição dos haplogrupos dos demais Estados do Nordeste brasileiro (ALVES-SILVA *et al.*, 2000. BARBOSA *et al.*, 2008. SCHAAN *et al.*, 2017), foi possível inferir a composição genética matrilinea da população nordestina. O resultado pode ser conferido na Tabela 1. Assim, ao comparar o resultado da análise do Maranhão com o do Nordeste, é possível perceber a conformidade entre a distribuição das linhagens matrilineas para o Estado e a Região (Figura 2).

Figura 2: Representação percentual dos resultados da análise das sequências mitocondriais de indivíduos Maranhenses em comparação com a Região Nordeste.

MARANHÃO NORDESTE BRASILEIRO
2%

Tabela 1: Frequências das linhagens matrilineas encontradas entre os Estados do Nordeste. AMR – Ameríndia, AFR – Africana, EUR – Europeia, ASI – Asiática.

	n	AMR	AFRI	EUR	ASI	Referência
PI	174	52.3%	36.2%	9.8%	1.7%	Schaan <i>et al.</i> , 2017.
CE	52	51.9%	30.8%	11.5%	5.8%	Schaan <i>et al.</i> , 2017.
RN	276	45,7%	35.1%	15.1%	3.6%	Schaan <i>et al.</i> , 2017.
PB	21	38.1%	38.1%	23.8%	-	Schaan <i>et al.</i> , 2017.
PE	50	22%	44%	34%	-	Alves-Silva <i>et al.</i> , 2000.
AL	167	40%	42%	18%	-	Barbosa <i>et al.</i> , 2008.
SE	4	25%	75%	-	-	Schaan <i>et al.</i> , 2017.
BA	7	28.6%	71,4%	-	-	Schaan <i>et al.</i> , 2017.
MA	67	40.3%	41.8%	17.9%	-	Presente estudo.
Total	834	43.3%	38.1%	16.6%	2%	Presente estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresenta informações inéditas acerca da composição genética matrilinea, evidenciando as contribuições africana, ameríndia e europeia para a formação da população maranhense. Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam a importância da continuidade do estudo do genoma mitocondrial para aplicações em âmbito clínico, populacional e forense. Deste modo, novos estudos são importantes para agregar maiores informações a bases de dados populacionais, principalmente de localidades que ainda não estão disponíveis nestes bancos genéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, v. 23, n. 2, p. 147, 1999.
- ALVES-SILVA *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *The American Journal of Human Genetics*, v. 67, n. 2, p. 444-461, 2000.
- BARBOSA, A. B. G. *et al.* Mitochondrial DNA Control Region Polymorphism in the Population of Alagoas State, North-Eastern Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, v. 53, n. 1, p. 142-146, 2008.
- PARSON, W. *et al.* DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International: Genetics*, v. 13, p. 134-142, 2014.
- PARSON, W.; DÜR, A. EMPOP—a forensic mtDNA database. *Forensic Science International: Genetics*, v. 1, n. 2, p. 88-92, 2007.
- SCHAAN, A. P. *et al.* mtDNA structure: the women who formed the Brazilian Northeast. *BMC Evolutionary Biology*, v. 17, n. 385, p. 1-12, 2017.
- WEEDN, V. W.; BAUM, H. J. DNA identification in mass fatality incidents. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v. 32, n. 4, p. 393-397, 2011.

APÊNDICE J – Resumo submetido à Conferência Internacional *12th Haploid Markers*, a ser realizado em Budapeste, na Hungria.



Maternal lineages analysis from the Brazilian state of Maranhão.

A. B. R. Gonçalves^{a*}, R. S. Azulay^d, T. L. S. Nogueira^c, M. B. Gomes^b, E. F. Carvalho^a, D. A. Silva^a

^a*Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes-Universidade do Estado do Rio de Janeiro (IBRAG-UERJ), Rio de Janeiro, RJ, 20550900.*

^b*Hospital Universitário Pedro Ernesto-Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ), Rio de Janeiro, RJ, 20550900.*

^c*Instituto de Biologia do Exército (IBEx), Rio de Janeiro, RJ, 20911270.*

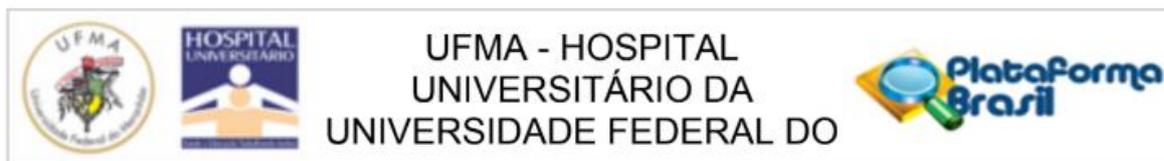
^d*Hospital Universitário-Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA), São Luis, MA, 65080805*

It is well-known that sequencing the mitochondrial DNA (mtDNA) complete control region is an efficient approach to infer accurate information regarding population ancestry, diversity and genetic distance. Those kind of population genetics data from some Brazilian regions are non-existent, which leads to a lack of information that would be suitable for forensic and clinical purposes. The main objective of this study is to provide unprecedented results regarding the maternal lineages from Maranhão, a state located at Brazilian Northeast.

Through the sequencing of mtDNA, we analyzed the content of the complete control region from 154 individuals who were born in Maranhão. In total, 74 different haplogroups were found. The population from Maranhão presented different proportions of Native American, African and European maternal ancestries. The major component was Native American, corresponding to 46.1%, followed by 37.7% of African contribution, 13.6% European and 2.6% Asian. However, the most common macrohaplogroup found in this population sample was L3 (16.2%), followed by A2 (15.6%).

These first results regarding the maternal ancestry from the Brazilian state of Maranhão population indicated an important indigenous maternal inheritance, which is in accordance with the presence of many Indian tribes in Brazilian North and coast. The African component was also expressive, as a consequence of African intense migration for slavery in Brazil. Further analyses are necessary in order to contribute with these samples to EMPOP database.

ANEXO A – Aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do HU-UFMA.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE BIOMARCADORES DE PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA E ANCESTRALIDADE PARA O DIABETES MELITUS TIPO 1 E SUAS COMPLICAÇÕES CRÔNICAS NO ESTADO DO MARANHÃO.

Pesquisador: ROSSANA SANTIAGO DE SOUSA AZULAY

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 59795116.9.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.441.473

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

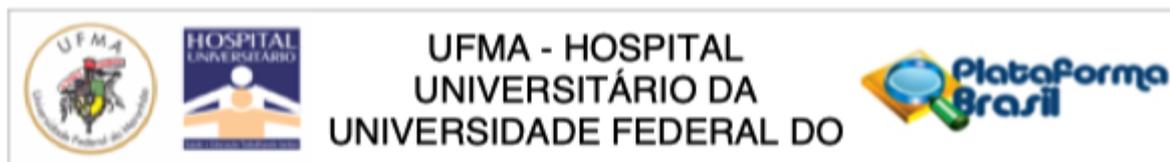
UF: MA

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 2.441.473

SAO LUIS, 15 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Dorlene Maria Cardoso de Aquino
(Coordenador)

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

ANEXO B – Aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do HUPE-UERJ.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DNA MITOCONDRIAL: Identificação de linhagens maternas na População Brasileira

Pesquisador: Tatiana Lúcia Santos Nogueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55747516.0.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/ UERJ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

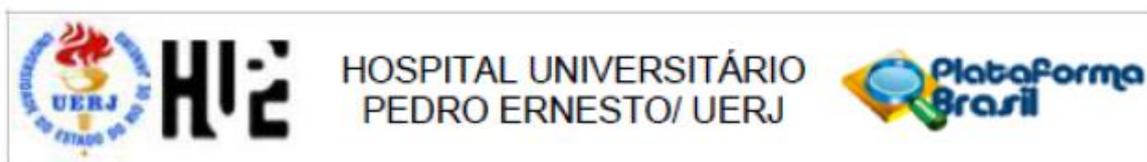
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.542.187

Apresentação do Projeto:

O presente projeto se caracteriza por apresentar proposta de realização do primeiro estudo vinculado ao estudo do mtDNA no âmbito da população brasileira que se relaciona com um projeto de interesse da defesa nacional. É parte integrante do projeto intitulado "Estudos estratégicos em Defesa Nacional, Educação Nacional e Ensino Militar no Âmbito das Aplicações Forenses do DNA", aprovado no Edital CAPES/Pró-Defesa nº 031/2013, o sob a coordenação do Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, no âmbito de convênio entre o Instituto de Biologia do Exército e a Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Serão analisadas amostras pertencentes ao Repositório de Amostras do Exército Brasileiro, provenientes de todo território nacional, com o intuito principal de construir um Banco de dados de perfis genéticos mitocondriais especificamente de militares. O mesmo poderá também agregar informações importantes com diversas aplicações na identificação humana e de outras espécies.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.542.187

Biorepositório / Biobanco	TCUD_Tatiana_Nogueira.pdf	01/04/2016 11:02:29	Tatiana Lúcia Santos Noqueira	Aceito
------------------------------	---------------------------	------------------------	----------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 12 de Maio de 2016

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 Fax: (21)2264-0853 E-mail: cep-hupe@uerj.br