



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES URBANAS DA
REGIÃO CENTRO-OESTE BRASILEIRA ESTIMADA
POR MARCADORES UNIPARENTAIS**

Rejane da Silva Sena Barcelos

Brasília
2006



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES URBANAS DA
REGIÃO CENTRO-OESTE BRASILEIRA ESTIMADA
POR MARCADORES UNIPARENTAIS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, área de concentração:
Genética

Rejane da Silva Sena Barcelos (02/47316)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília

2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB) e no Laboratório de Clonagem do Hemocentro de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), com suporte financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FINATEC (Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo) e FUNDHERP (Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silviene Fabiana de Oliveira

TESE DE DOUTORADO

Rejane da Silva Sena Barcelos

TÍTULO

**CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES URBANAS DA
REGIÃO CENTRO-OESTE BRASILEIRA ESTIMADA
POR MARCADORES UNIPARENTAIS**

Comissão Examinadora

Profª. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira

Universidade de Brasília

Presidente/Orientador(a)

Prof. Dr. João Farias Guerreiro

Membro Titular Externo

UFPA

Profª. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Membro Titular Interno

UnB

Profª. Drª. Maura Helena Manfrin

Membro Titular Externo

USP

Profª. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia

Membro Suplente em Substituição

UnB

Aos meus pais,

Raimundo Pena Sena

Pelo incentivo ao estudo, enfatizando sempre que o conhecimento era a maior riqueza entre os seres humanos; pelo carinho, dedicação e amor que sempre foi-lhe peculiar.....

&

Maria Amélia da Silva Sena

Pelo exemplo de vida, dedicação, carinho, amor, compreensão, confiança e sabedoria me orientando nas horas boas e difíceis de minha vida....

Aos meus filhos

Augusto Henrique Silva Sena Barcelos

e

Tâmara Silva Sena Barcelos

Que com carinho, amor e compreensão tentaram e talvez...entenderam os inúmeros momentos de minha ausência....

DEDICO.

Agradecimentos

A Deus, por me oferecer mais esta oportunidade de ter outras perspectivas no campo profissional e conhecer um novo mundo laborioso, cansativo, investigador, oneroso, competitivo, mas extremamente contagiante e apaixonante que é o mundo da pesquisa e do conhecimento.

Aos órgãos de incentivo à pesquisa CAPES, CNPq, FAPESP, FUNDHERP e, em especial, à FINATEC a qual proporcionou uma linda e inesquecível viagem ao exterior, ampliando meus conhecimentos e o intercâmbio com pesquisadores de outros continentes.

Agradeço a todos que de alguma forma me auxiliaram galgar mais um grande degrau em minha vida, especialmente,

À prof.^a e amiga Silviene Fabiana de Oliveira, pelos ensinamentos, apoio, orientação, carinho, exemplo, amizade que sempre lhe foram peculiares ao longo destes anos de convívio, pela grande experiência que adquiri sob sua orientação e à sua filha Gabriela por ceder, além de seu quarto, sua mãe compreendendo a importância de sua presença no “computador” e no Campus nos momentos de necessidade e dificuldade pelos quais passamos juntas.

A professora e também orientadora Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava que, no início de meus trabalhos, me acolheu com muito carinho como orientadora me incentivando nos trabalhos.

À famosa e boa Universidade de Brasília, por proporcionar condições satisfatórias para o desenvolvimento de meu trabalho.

Ao corpo docente da Universidade de Brasília, em especial aos professores Dr. César Koppe Grisólia, Dra. Maria de Nazaré Klatau Guimarães, que muito contribuíram para complementação deste trabalho.

À equipe de funcionários do Laboratório de Genética (UnB) pelo grande apoio e amizade que me ofereceram.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação em Biologia, em especial à querida Nara Irléia, funcionária exemplar no atendimento. Agradeço por ser compreensiva, confiar em minha pessoa e que, com muito carinho e paciência, me atendeu e orientou nesta temporada na UnB.

À amiga e colega de profissão Biomédica e Perita Neide Maria de Oliveira Godinho, pelo carinho, respeito, paciência, atenção, presteza, boa vontade, companheirismo e pelo apoio, o meu muito obrigado!

Aos meus amigos e amigas, companheiros do Laboratório da UnB:

- meu pupilo Guilherme, que sempre me auxiliou com grande carinho, dedicação, cuidado, presteza, atenção e profissionalismo. Muito Obrigada!!!*
- minha “orientanda”, amiga e pupila Mila, que brilhantemente terminou seu estágio mesmo com pouca atenção de minha parte...*
- minha companheira de moradia em Ribeirão Preto – Maria Angélica - Gegê, que me proporcionou dias inesquecíveis em São Paulo, incentivando a ir em frente com muita amizade e profissionalismo, pois não foi fácil ficar longe de meus filhos...*
- Aos amigos Carol, Gabriel, Ana Paula, Neda e Lane - pelos momentos que passamos juntos, pelas críticas, sugestões, ajuda, incentivo e colaboração.*

Aos colegas da minha turma do curso de Doutorado em Biologia pelos momentos apertados e bons que passamos juntos.

A professora e amiga Kiyoko Abé-Sandes que cedeu seu conhecimento e material ensinando e orientando uma grande parcela das atividades práticas em Ribeirão Preto. Agradeço também à sua família por ter compreendido as horas a mais no laboratório.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto, na pessoa do professor Dr. Wilson Araújo da Silva Junior que gentilmente cedeu o laboratório, material, oportunidade e a sua equipe do Laboratório de Clonagem.

Ao profº. Aguinaldo Simões por ceder parte dos oligonucleotídeos com presteza e rapidez.

Ao colega “indireto” do curso de Doutorado Luzitano pelos ensinamentos, atenção, companheirismo e à sua família por me acolher com tanto carinho em minha estada em Ribeirão Preto.

À amiga e companheira Vera Saddi pelo grande exemplo, dedicação, determinação, incentivo, carinho e ensinamentos nos vinte e três anos... de convívio.

A toda a Administração da Universidade Católica de Goiás, pelo investimento em minha pessoa, principalmente nas pessoas dos professores: Sérgio Machado - ex - diretor do CBB que muito me apoiou e torceu pelo meu sucesso; professor Paulo Roberto de Melo Reis atual diretor que não mediu esforços em me liberar, transmitindo incentivo e grande apoio nesta caminhada e ao professor Paulo Luiz Carvalho Francescantônio, um grande amigo que sempre me incentivou e acreditou em mim. Obrigada.

Ao coordenador do Mestrado em Ciências Ambientais e amigo profº Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior que com muito carinho me acolheu nas dependências da área 5 – UCG, e à profª Dr. Kátia Pellegrino pela acolhida em seu laboratório deixando-me à vontade para efetuar as tarefas diárias.

Ao corpo docente da UCG, principalmente nas pessoas das professoras e amigas Ana Maria, Carla, Cláudio, tia Ivanise, Lândia, Maria Paula e minha amiga Denise, pelo apoio, amizade e carinho! Ao Cláudio agradeço também os socorros nos atendimentos estatísticos...

Aos funcionários da UCG da área V e do Mestrado em Ciências Ambientais – Natalina, Rosilda, Claret, Eli, Roberto, Carlos e Camila pela acolhida e incentivo.

À Secretaria de Segurança Pública e Justiça do Estado de Goiás que investiu profissionalmente nesta jornada e, em especial, ao sr. Secretário Profº Jônatas Silva, por acreditar em mim e na classe dos Peritos Criminais. Profissão esta em que somente com estudo e pesquisa é que poderemos prestar a população um serviço profissional de qualidade.

Ao meu Grande chefe, doctor Décio, pelo incentivo e força que foram vitais para o desenvolvimento deste trabalho em outra unidade da Federação e, que indiferente de “comentários” Sempre acreditou em mim.

Aos meus chefes “mais diretos” Antônio Carlos e Rhonan pelo incentivo e liberação durante esse trabalho. E ao colega de Superintendência da Academia Sérgio por sua dedicação e carinho.

À Diretoria da Polícia Civil pelo investimento financeiro e por confiar em mim nesta jornada, em especial ao grande delegado e Superintendente da Polícia Judiciária Dr. Alzemiros José dos Santos e sua esposa Joana que sempre apostaram, investiram e acreditaram em mim. Obrigada!

À Ex-Superintendente de Criminalística, perita, madrinha e amiga Helena Fernandes Martins, pelo incentivo, companheirismo, confiança, apoio moral, que por seu intermédio tornou realidade um sonho da Polícia Técnica de Goiás.

Aos meus queridos amigos aos quais, em suas presenças, conheci todo o Estado de Goiás durante a coleta das amostras, Atanagildo Ribeiro da Silva e Luis Carlos Augusto que com muita garra me ajudaram a encontrar, sem medir esforços, os voluntários para essa pesquisa.

Ao meu colega Perito Roberto Pedrosa que nunca mediu esforços para defender a minha profissionalização e a minha pessoa.

Ao meu querido “grande” chefe Geraldo Batista Ferreira, in memoriam, que sempre com muita alegria que lhe era peculiar, designava com presteza a viatura e o colega de trabalho para as

nossas viagens. Esteja onde estiver, meu muito obrigado!

Ao meu amigo e ex-Diretor do Instituto de Criminalística do Estado de Goiás, Dr. Júlio Tadeu de Castro Barros, agradeço por sempre me apoiar, orientar e, principalmente, confiar em mim.

Aos chefes Nilce, Wagner e Jorge Carim por confiarem e compreenderem a importância do meu estudo e profissionalização.

À amiga Gracyelena Maria Dorivê Silva por acreditar, incentivar e apoiar o estudo do DNA Forense desde quando ele estava no papel com um carinho especial.

Aos colegas do Laboratório Químico do Instituto de Criminalística, que sempre me incentivaram e por tentarem compreender os anos de ausência e trabalho incessante.

A toda a Divisão de DNA Forense da Polícia Civil do Distrito Federal, nas pessoas dos grandes profissionais e peritos Aluízio, Cláudia, Flávia, Gustavo, Karla Angélica e Yung e toda a equipe técnica pelas horas de ensinamentos e empenho no repasse de experiências.

A toda equipe da Superintendência da Polícia Técnica: Andréia, Fernanda, Geraldo, Luis Altino, Luis Augusto, Raquel, Régia e Ozana, que sempre empenharam em resolver os problemas gerados com minha ausência.

Aos prof^o Alexandre Coelho da Universidade Federal de Goiás e prof^o Rinaldo da Universidade Católica de Brasília pelo auxílio em parte das análises estatísticas sem medir esforços para meu atendimento.

A todos os colegas Biomédicos e Peritos que em algum momento me apoiaram.

À Sr^a. Cinira, Maristene, Elder, Aurélio Antônio, Margarethe, Débora, Cínara e minha afilhada Érica que muito me incentivaram a concluir com êxito mais esta fase de minha vida.

Ao meu irmão Renan, um batalhador “nato”, que a vida sempre coloca desafios e os quais sempre consegue vencê-los, minha cunhada Jacqueline, minhas sobrinhas Renata, Rossana e Raíssa, pelas horas de ausência, pelo apoio, por acreditarem muito em mim e pelo grande apoio emocional nas horas mais difíceis que passei nesta jornada.

À minha irmã, amiga e companheira nas dificuldades da vida, Regina, pela paciência e compreensão. Agradeço também ao seu esposo Marcelo e meu afilhado Brunno que juntos me auxiliarem nas tarefas maternas.

Ao meu irmão Renato que Deus sabe o quanto é feliz em seu mundo, por me compreender e entender, outra vez, a ausência da “Aninha”.

À minha querida amiga, admiradora e mãe Maria Amélia por sempre poder contar com seu apoio nas horas boas e difíceis da vida por muitas vezes me substituiu no papel de mãe, pela confiança, por acreditar e sempre investir em mim. Obrigada !!!

A meu saudoso e sábio pai Raimundo Pena Sena, in memoriam, por sempre me ensinar que o conhecimento é o bem mais valioso do ser humano e esteja onde estiver, sei que há de estar muito orgulhoso pelo meu sucesso que também é seu.

Ao meu esposo Jovistênio pelas horas e horas de ausência, pelos momentos difíceis e pelos bons que muitas vezes foram “encurtados” pelos afazeres do doutorado, por sempre me apoiar, incentivar a galgar mais este degrau de minha vida e me substituir cuidando de nossos filhos com muita eficiência.

Aos meus filhos Tâmara e Augusto Henrique que souberam, com seu jeitinho carinhoso, me apoiar e ajudar a passar momentos difíceis com amor e muito companheirismo. Que Deus me permita conceder a eles todas as oportunidades que tive.

A todos os voluntários que cederam a matéria prima deste estudo.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi analisar e comparar a constituição genética masculina e feminina da região Centro-Oeste brasileira utilizando 11 UEPs, um elemento *AluYAP* e 4 STRs localizados na região não-recombinante do cromossomo Y, além de 13 SNPs situados na região codificante do DNA mitocondrial (DNAMt) e uma deleção de 9 pb localizados no DNAMt. Estes marcadores foram analisados em 200 homens não aparentados do Estado de Goiás e Distrito Federal. As análises dos marcadores situados no cromossomo Y e no DNA mitocondrial demonstraram uma ampla diversidade genética entre as populações. A análise estatística dos dados foi realizada pelos programas ARLEQUIN 2000, PopGENE e pelo teste Z. Os marcadores binários do cromossomo Y e do DNA mitocondrial não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre as populações. Entretanto, na análise dos STRs Y específicos foram observadas diferenças genéticas ($p < 0.05$). Os resultados para contribuição paterna indicaram uma maior contribuição de homens europeus que africanos e ameríndios. Já o DNA mitocondrial mostrou uma predominância de linhagem materna ameríndia/asiática em ambas populações, seguida pela africana e uma pequena contribuição européia. Sendo assim, os resultados da contribuição paterna e materna são claramente divergentes. Esses resultados corroboram dados históricos que indicam: o cruzamento direcional entre homens europeus e mulheres dos três grupos étnicos principais que colonizaram o Brasil; e um pequeno número de homens descendentes de ameríndios na população brasileira atual, o qual é consequência da colonização européia.

ABSTRACT

This research aimed to analyze and compare the male and female genetic constitution of Middle-West Brazilian region by the investigation of 11 UEPs, an *Alu*YAP element and 4 STRs located in the nonrecombinant region of the Y-chromosome, and, also, 13 SNPs placed in coded regions of mitochondrial DNA (mtDNA) and a 9 bp deletion of mtDNA. These markers were analyzed in 200 unrelated men from *Goiás* state and Federal District. The analysis of the Y-chromosome and mtDNA markers demonstrated a great genetic diversity between populations. The statistical analysis of the data obtained was done using the ARLEQUIN 2000 software, PopGENE and Z test. The binary markers of Y-chromosome and mtDNA did not indicate statistic supported differences between the populations. However, genetic differences were observed in Y-chromosome STRs analysis ($p < 0.05$). The paternal contribution results indicated a greater European men contribution than African or Amerindian ones. Besides, mtDNA showed a predominance of Amerindian/Asiatic maternal lineage in both populations constitution, followed by African and then a small European contribution. Therefore, the results showed a clear divergence from paternal to maternal lineages. These results corroborated historical data that points to: directional mating between European males and females from any of the main three ethnic groups that colonized Brazil; and to a small number of Amerindians males' descendants in nowadays Brazilian populations, which is a consequence of the European colonization.

Sumário

I.	INTRODUÇÃO	1
I.1.	A população brasileira – um relato histórico	1
I.2.	Marcadores genéticos e reconstrução histórica	4
I.2.1.	Marcadores genéticos uniparentais	8
I.2.1.1.	Cromossomo Y	8
I.2.2.2.	DNA mitocondrial	11
I.3.	A população brasileira: um relato genético	13
II.	OBJETIVOS	17
III.	MATERIAL E MÉTODOS	19
III.1.	Populações	19
III.2.	Coleta de material biológico e dados demográficos	21
III.3.	Processamento e conservação da amostra e extração de DNA	24
III.4.	Marcadores genéticos	24
III.4.1.	Cromossomo Y	25
III.4.1.1.	<i>Elemento Alu</i>	25
III.4.1.2.	<i>Marcadores binários</i>	26
III.4.1.3.	<i>Marcadores do tipo STR</i>	28
III.4.2.	DNA mitocondrial	30
III.4.2.1.	<i>Marcadores situados no DNA mitocondrial</i>	30
III.5.	Análise estatística	34
IV.	RESULTADOS	39
IV.1.	Contribuição uniparental masculina	39
IV.1.1.	Inserção <i>Alu</i> YAP	39
IV.1.2.	Marcadores binários do tipo SNPs situados no cromossomo Y	40
IV.1.2.1.	<i>Caracterização genética populacional por locus</i>	40
IV.1.2.2.	<i>Caracterização genética populacional por haplótipos e haplogrupos</i>	43
IV.1.2.3.	<i>Análise de mistura: marcadores binários Y-específicos</i>	45
IV.1.2.4.	<i>Análise filogeográfica</i>	46
IV.1.3.	Microssatélites situados no cromossomo Y	48
IV.1.3.1.	<i>Caracterização genética populacional por locus</i>	48
IV.1.3.2.	<i>Caracterização genética populacional por haplótipos e haplogrupos</i>	58

IV.1.3.3. Diferenciação genética analisada por marcadores do tipo STR	63
IV.1.4. Associação SNPs/STRs/AluYAP	65
IV.2. Contribuição uniparental feminina	65
IV.2.1. Mistura genética: marcadores do DNA mitocondrial	71
IV.3. Comparação: Y versus DNA mitocondrial	75
IV.3.1. Análise indivíduo a indivíduo	75
V. DISCUSSÃO	80
V.1. Contribuição uniparental masculina	81
V.1. Inserção AluYAP	82
V.2. Marcadores binários do tipo SNPs situados no cromossomo Y	82
V.3. STR (<i>Short tandem repeats</i>)	90
V.4. Marcadores genéticos Y-específicos: uma comparação	96
V.2. Contribuição uniparental feminina	98
V.2.1. Mistura genética utilizando marcadores do DNA mitocondrial	101
V.3. Comparação entre a contribuição parental masculina e feminina	103
V.4. Comparação individual: Y versus DNA mitocondrial	103
V.5. Comparação populacional: Y versus DNA mitocondrial	105
VI. CONCLUSÕES	108
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
VIII. ANEXOS	130

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura III.1	Mesorregiões e microrregiões que compõem o Estado de Goiás (Mapa: Albani Borges dos Reis).	20
Figura III.2	Regiões Administrativas que compunham o Distrito Federal à época da coleta de material biológico (Fonte: Codeplan, 1997). Quatro outras regiões administrativas foram criadas desde então: Park Way (2003), Setor Complementar de Indústria e Abastecimento (2004), Sobradinho II (2004) e Itapoã (2005) (sítio oficial do Governo do Distrito Federal – www.districtofederal.df.gov.br acessado em 31/01/2006), as quais não estão representadas no presente mapa.	20
Figura III.3	Estrutura do cromossomo Y humano e a localização dos quatro STRs analisados.	29
Figura IV.1	Distribuição das frequências dos alelos ancestrais dos marcadores genéticos do tipo SNP situados no cromossomo Y nas populações do Estado de Goiás e Distrito Federal.	42
Figura IV.2	Distribuição dos haplogrupos do cromossomo Y nas populações de Goiás e Distrito Federal.	45
Figura IV.3	Relacionamento dos haplogrupos do cromossomo Y observados nas populações do Distrito Federal (A) e Goiás (B). Os haplogrupos são representados pelos círculos (o diâmetro do círculo é proporcional à frequência dos haplogrupos) e estão indicados ao lado dos mesmos; as mutações estão indicadas ao lado dos ramos.	47
Figura IV.4	Distribuição de frequências alélicas para o marcador DYS19 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste.	51
Figura IV.5	Distribuição de frequências alélicas para o marcador DYS390 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste.	51
Figura IV.6	Distribuição de frequências alélicas para o marcador DYS391 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste.	52
Figura IV.7	Distribuição de frequências alélicas para o marcador DYS393 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste.	52
Figura IV.8	Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} , para o marcador do tipo STR Y-específico DYS19. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia <i>et al.</i> , 2005), Abaixo valores de F_{st} e acima valores de p ; Número de permutações: 10100.	54
Figura IV.9	Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} ,	

- para o marcador do tipo STR Y-específico DYS390. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia *et al.*, 2005), Abaixo valores de F_{st} e acima valores de p ; Número de permutações: 10100. **55**
- Figura IV.10** Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} , para o marcador do tipo STR Y-específico DYS391. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia *et al.*, 2005), Abaixo valores de F_{st} e acima valores de p ; Número de permutações: 10100. **56**
- Figura IV.11** Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} , para o marcador do tipo STR Y-específico DYS393. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia *et al.*, 2005), Abaixo valores de F_{st} e acima valores de p ; Número de permutações: 10100. **57**
- Figura IV.12** Haplótipos de microssatélites do cromossomo Y e suas frequências nas populações de Goiás e Distrito Federal. Os haplótipos foram agrupados em YAP+ e YAP-. Haplótipos compartilhados entre as populações: 1 a 21 e 57 a 59; Haplótipos YAP- específicos da população do Distrito Federal (22 a 37) e do Estado de Goiás (38 a 56). Haplótipos YAP+ específicos da população do Distrito Federal (60 a 62) e do Estado de Goiás (63 a 72). **62**
- Figura IV.13** Distribuição das frequências dos haplogrupos de DNA mitocondrial observados no Estado de Goiás e no Distrito Federal classificados de acordo com suas linhagens. ***Não Ameríndios/Asiáticos. **69**
- Figura IV.14** Matriz de comparação par a par dos resultados obtidos pelos marcadores de DNA mitocondrial entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} . A população do Centro-Oeste é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos auto-

declarados como “brancos” e a população denominada “Brasil” é o conjunto amostral das regiões brasileiras excetuando o Centro-Oeste (dados de Alves-Silva *et al.*, 2000). Abaixo valores de F_{st} e acima valores de P. Número de permutações: 10100.

- Figura IV.15** Distribuição dos haplogrupos de DNA mitocondrial observados em Goiás e no Distrito Federal distribuídos pelas origens geográficas. ***Não ameríndios/Asiáticos. **70**
- Figura IV.16** Contribuição uniparental na constituição de cada indivíduo amostrado na população do Estado de Goiás. Na parte inferior da figura estão representadas as linhagens referentes ao cromossomo Y e, na superior, as do DNA mitocondrial. As amostras caracterizadas como linhagens europeias estão representadas na cor azul, as africanas na cor vermelha, as ameríndias na cor verde. **72**
- Figura IV.17** Contribuição uniparental na constituição de cada indivíduo amostrado na população do Distrito Federal. Na parte inferior da figura estão representadas as linhagens referentes ao cromossomo Y e, na superior, as do DNA mitocondrial. As amostras caracterizadas como linhagens europeias estão representadas na cor azul, as africanas na cor vermelha, as ameríndias na cor verde e a asiática na cor laranja. **77**
- 78**

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela III.1	Distribuição dos habitantes do Estado de Goiás e do Distrito Federal por gênero (masculino e feminino), região (urbana ou rural), contingente total em cada população e na região Centro-Oeste como um todo (Dados IBGE – censo 2000 – www.ibge.gov.br).	21
Tabela III.2	Proporção da população residente, por faixas etárias, no Estado de Goiás e no Distrito Federal, conforme dados do IBGE (2000).	21
Tabela III.3	Distribuição dos indivíduos do Estado de Goiás de acordo com as mesorregiões, microrregiões, municípios coletados e sua densidade populacional.	23
Tabela III.4	Distribuição dos doadores do Distrito Federal de acordo com a região administrativa de moradia dos pais à época do nascimento do sujeito da pesquisa.	24
Tabela III.5	Relação dos marcadores binários analisados, mutação característica do locus, seqüência dos iniciadores utilizados, temperatura de pareamento, tamanho do fragmento amplificado e enzima de restrição utilizada	27
Tabela III.6	Relação dos <i>loci</i> gênicos do tipo STRs do cromossomo Y analisados, seqüência dos iniciadores, temperatura de pareamento, segmento amplificado, repetição e localização cromossômica.	29
Tabela III.7	Relação dos haplogrupos analisados, iniciadores, temperatura de pareamento, segmento amplificado, polimorfismos analisados por digestão enzimática para caracterização dos haplogrupos de DNA mitocondrial e sua distribuição geográfica. As amplificações foram feitas utilizando-se iniciadores específicos e as condições descritas por Torroni <i>et al.</i> (1992, 1993a e 1996).	32
Tabela III.8:	Freqüências alélicas parentais utilizadas nos cálculos das estimativas de contribuições étnicas para a constituição da população da região Centro-Oeste brasileira.	38
Tabela IV.1	Freqüência dos alelos ancestrais dos marcadores genéticos do tipo SNP situados no cromossomo Y analisados nas populações do Estado de Goiás e Distrito Federal, parâmetros de variabilidade genética (índice de diversidade gênica (Nei, 1973) e % loci polimórfico) e teste de heterogeneidade intra <i>locus</i> .	41
Tabela IV.2	Haplogrupos do cromossomo Y observados e respectivas freqüências nas populações de Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste e populações parentais.	44
Tabela IV.3	Estimativas de composição quanto à origem geográfica das populações de Goiás e Distrito Federal e do conjunto amostral (Centro-Oeste brasileiro) baseada nos haplogrupos do cromossomo Y e comparação das estimativas obtidas para as duas populações (teste z).	46
Tabela IV.4	Distribuição das freqüências alélicas de quatro microssatélites do cromossomo Y nas populações de	

	Goiás e Distrito Federal (DF) e em cinco regiões geopolíticas brasileiras (Grattapaglia <i>et al.</i> , 2005) (N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul; CO = Centro-Oeste)	49
Tabela IV.5	Haplótipos observados em quatro microssatélites situados no cromossomo Y, suas freqüências em cada população e a diversidade haplotípica. Os haplótipos foram divididos em dois grupos YAP e YAP ⁺	59
Tabela IV.6	Estimativas de mistura genética (erro padrão em parênteses) das populações de Goiás e Distrito Federal e para o conjunto amostral (Centro-Oeste brasileiro) considerando um conjunto de cinco marcadores genéticos uniparentais (STRs e <i>AluYAP</i>) e comparação das estimativas obtidas para as duas populações (teste z).	64
Tabela IV.7	Comparação entre as estimativas de mistura genética geradas a partir dos dados dos marcadores bialélicos e microssatélites para o conjunto amostral do Centro-Oeste brasileiro.	64
Tabela IV.8	Distribuição geográfica e freqüências dos haplogrupos de DNA mitocondrial observados no Centro-Oeste brasileiro e em dados da literatura (indivíduos autodeclarados brancos de quatro regiões geopolíticas brasileiras - N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul - e do Brasil sem a região Centro-Oeste (Alves-Silva <i>et al.</i> , 2000)). A nomenclatura de haplogrupos no presente trabalho foi baseada em Chen <i>et al.</i> (2000).	67
Tabela IV.9	Composição quanto a origem geográfica das populações de Goiás e Distrito Federal e do conjunto amostral (Centro-Oeste brasileiro) baseada nos haplogrupos do DNA mitocondrial e comparação das estimativas obtidas para as duas populações (teste z).	71
Tabela IV.10	Distribuição das freqüências dos haplogrupos do DNA mitocondrial agrupados por origem geográfica (ancestralidade) da região Centro-Oeste (CO) e dados de brasileiros autodefinidos como brancos da literatura (N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul) (Alves-Silva <i>et al.</i> , 2000). Destaca-se que a região Centro-Oeste não foi contemplada na literatura citada.	73
Tabela IV.11	Teste z (valores de <i>p</i> entre parênteses) para a comparação das proporções de contribuição das três origens geográficas principais (Europa, África e América/Ásia) na região Centro-Oeste e no Brasil com relação às demais regiões geográficas brasileiras (N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul). Valores de z estatisticamente significativos estão em negrito.	74
Tabela IV.12	Constituição genética individual definida pela associação das linhagens de DNA mitocondrial e cromossomo Y nas populações de Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste brasileiro	79

Tabela IV.13 Comparação das estimativas de mistura genética geradas a partir das linhagens do cromossomo Y e do DNA mitocondrial para o conjunto amostral da região Centro-Oeste brasileiro e comparação das estimativas obtidas para as duas categorias de marcadores (teste z). **79**

I. INTRODUÇÃO

I.1. A população brasileira – um relato histórico

O Brasil é um país dividido geopoliticamente em cinco regiões: Sul, Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Apesar da história oficial do Brasil ter iniciado a partir do ano de 1500 com a colonização portuguesa, os ameríndios já habitavam o território brasileiro há pelo menos 12 mil anos. É estimado que os ameríndios somavam dois milhões de indivíduos no início da colonização (Cunha, 1998), sendo que esse número foi reduzido ao longo da história do país, tendo sido estimada em 734.127 indivíduos (IBGE-Censo 2000).

A colonização do Brasil iniciou pela costa brasileira e, gradualmente, os europeus e africanos que aqui chegaram juntamente com seus descendentes interétnicos seguiram para o interior. Isto proporcionou um processo de colonização diferenciada entre as regiões socioeconômicas brasileiras.

Até 1808, ano da abertura dos portos para migrações de outros países, a migração para o país foi composta basicamente por homens portugueses, sendo que a de mulheres européias durante os primeiros séculos de povoamento foi insignificante (Ribeiro, 1995). O fluxo migratório para o Brasil teve altos e baixos até a virada do século XX, quando viveu seu ápice. No exterior, desdobrava-se a Revolução Industrial, dispensando a mão-de-obra com os avanços técnicos na produção, bem como os transportes e as comunicações eram facilitados sendo que movimentos sociais conturbavam o cenário político. No Brasil, a expansão da lavoura cafeeira no Sudeste e a chamada “questão da mão-de-obra” foram fundamentais para o maior movimento imigratório já vivido pelo país até hoje (IBGE, 2000).

O tráfico de escravos iniciou-se no ano de 1538 e oficialmente terminado em 1850. Estima-se que aproximadamente três milhões e seiscentos mil escravos foram trazidos para o Brasil durante este período, o que representa em torno de 40% do total de escravos vindos para a América, sendo que a proporção sexual foi de 2/3 de homens para 1/3 mulheres (Curtin, 1969; Reis e Gomes, 1996).

Do total de imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1978, estima-se que 58% foram europeus, 40% africanos e 2% asiáticos (Callegari-Jacques e Salzano, 1999) e as contribuições de outras regiões da Europa, como Itália, Espanha, Alemanha, Sírios e Líbano foi intensificado e continuado até o início do século XX (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Contribuições de outras regiões do mundo também aconteceram, mas foi numericamente insignificante.

Portanto, o povoamento brasileiro foi conduzido a partir da fusão da diversidade genética de, principalmente, três grupos étnicos - ameríndios, europeus e africanos - em um processo de miscigenação que já se estende por meio milênio. Devido a sua grande extensão territorial, a distribuição destes grupos no território brasileiro não foi homogênea, a qual é refletida na composição da população atual (IBGE, 2000). Porém, houve também um processo de incorporação de várias outras culturas à brasileira e, conseqüentemente, suas características genotípicas e fenotípicas também foram adicionadas à nossa população (Salzano, 1986). Dessa forma, o povo brasileiro forma uma das mais heterogêneas populações do mundo (Carvalho-Silva *et al.*, 2001).

Uma das regiões menos conhecidas com relação à caracterização genética é a região Centro-Oeste. Essa região é composta por três estados – Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul – e o Distrito Federal, onde se localiza Brasília, a Capital Federal. Devido a sua localização central, longe da costa brasileira, esta região foi uma das últimas a ser povoada. Mais da metade da população habita Goiás e Distrito Federal (60,6%) (Censo IBGE – 2000).

A colonização do Estado de Goiás foi conduzida pela descoberta do ouro, a qual atraiu rapidamente pessoas especialmente dos estados vizinhos (Palacín, 1994). Esta migração foi principalmente composta de pessoas miscigenadas, oriundas principalmente da reprodução entre representantes dos três grupos parentais principais da população brasileira – europeus (principalmente portugueses), africanos e ameríndios da região Norte. Outros grupos, como os japoneses, também contribuíram para a constituição desta população, embora essa participação tenha realmente sido muito pequena (Palacín e Moraes, 1994).

Dentro da região Centro-Oeste encontra-se o Distrito Federal. O povoamento desse Distrito apresenta a peculiaridade de ter ocorrido artificialmente, incentivado por benefícios governamentais para a construção da cidade de Brasília (1956 até 1960). A construção da Capital foi o principal atrativo para o processo migracional, originando-se principalmente das regiões Norte, Sul e Sudeste. Desde o início dessa construção, pessoas de todos os lugares do Brasil, e mesmo de outros países, vieram se fixar aqui (Arantes, 1999). E foi com essa contribuição que se formou a população nativa brasiliense, o que deve contemplar um amplo conjunto dos genótipos existentes em nosso país.

A contribuição de cada região brasileira para a formação da população do Distrito Federal é bastante diferenciada. Foi estimado que 1,47% dos migrantes são oriundos da região Sul, 1,94% do Norte, 16,84 % da Sudeste, 27,87% da Nordeste e 52,08% da própria região Centro Oeste. De acordo com o último censo (IBGE, 2000), 95,0% da população do Distrito Federal que abrange, Brasília e cidades satélites, vive em área urbana sendo que 43,9% da população total nasceram no próprio Distrito Federal refletindo uma diminuição no fluxo migratório e assim o reconhecimento de uma população local (Codeplan, 1997).

Na composição étnica do Centro-Oeste brasileiro, de acordo com o último censo do IBGE (2000), os indivíduos se autodeclararam ao entrevistador como pertencendo a uma dada cor da pele, sendo que 49,72% dos indivíduos brasileiros são brancos, 43,68% pardos, 4,62% pretos, 0,90% indígena, 0,40% amarelo e, 0,68% sem declaração.

Uma característica importante do povoamento do Brasil foi o forte cruzamento direcional entre homens europeus e mulheres ameríndias e africanas (Carvalho-Silva, 2001; Abé-Sandes, 2002; Grattapaglia *et al.*, 2005). A consequência desse cruzamento diferencial, relatado na história do país, como, por exemplo, na reprodução entre portugueses e ameríndias no início do povoamento e entre Senhores de Engenho e escravas em fazendas do Brasil colonial, pode ser avaliado utilizando marcadores genéticos.

I.2. Marcadores genéticos e reconstrução histórica

A análise de marcadores genéticos iniciou com os estudos de genética mendeliana e a observação de genes associados a caracteres morfológicos. Esses primeiros trabalhos contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e na construção das primeiras versões dos mapas genéticos (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Porém, o número desses marcadores morfológicos era restrito e com a ampliação de pesquisas em genética e bioquímica, foram descritos novos marcadores. Além disso, com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, passou-se a utilizar os polimorfismos de DNA, úteis para análise de populações. Os primeiros marcadores genéticos moleculares que foram utilizados visando o diagnóstico de patologias humanas (Meyer *et al.*, 1995; Bydlowski *et al.*, 1996), identificação humana (Jeffreys *et al.*, 1985a; Silva e Moura-Neto, 1998) e mapeamento genético (Donis-Keller *et al.*, 1987; Telenius *et al.*, 1990) foram as variações no comprimento de fragmentos de restrição de DNA - *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

O estudo de marcadores genéticos auxilia no entendimento das relações evolutivas, assim como na reconstrução das rotas e origens dos povoamentos (Salzano e Callegari-Jacques, 1988; Saitou, 1995). Uma das questões que tem sido enfocada é a mistura genética de populações. Dentro dessa abordagem, pode-se estimar a contribuição de cada um dos grupos étnicos com base nas frequências gênicas desses marcadores.

A variabilidade genética encontrada em populações humanas não é aleatória e depende do nível da análise realizada, se intra ou inter populacional e dos marcadores genéticos utilizados. Esta variabilidade não é necessariamente paralela quando diferentes níveis de hierarquia biológica são analisados, como DNA nuclear e proteínas (Salzano, 1998). Dessa forma, torna-se interessante estudar diferentes tipos de marcadores para que se tenha uma visão mais ampla dos processos de mistura étnica e subestruturação ocorridos na formação da população de interesse.

Os marcadores genéticos, polimórficos e facilmente detectáveis na população, podem se referir a um gene, um sítio de restrição ou qualquer outra seqüência do DNA que apresente diferentes versões alélicas para aquele *locus*

(Edwards *et al.*, 1991). Os mecanismos que explicam o polimorfismo podem ser mudanças únicas de nucleotídeos (por exemplo, substituições) como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), variações no comprimento de repetições *in tandem* (VNTRs - Número variável de repetições *in tandem* e STRs - Repetições curtas *in tandem*) e a inserção ou deleção de seqüências de DNA, os Indels, como as inserções *Alu* (Edwards *et al.*, 1991). É importante ressaltar ainda que determinados marcadores, em decorrência da diferença de freqüência entre dois grandes grupos populacionais (como europeus e africanos) ser superior a 50%, são considerados específicos de populações, denominados PSAs, ou mais recentemente indicadores de ancestralidade, os AIMs (Shriver *et al.*, 1997; Shriver *et al.*, 2005).

Os elementos *Alu*, restritos a primatas, são compostos por uma seqüência de aproximadamente 300 pares de base que são encontradas inseridas em uma série de regiões do genoma, sendo que parte deles são polimórficos, isto é, nem todos os indivíduos de uma dada população possuem a inserção. São ferramentas altamente úteis para a análise da reconstrução histórica de populações humanas e dos eventos demográficos pertinentes a estas. Isto porque a inserção de elementos *Alu* é um tipo de evento mutacional estável, único e unidirecional. Essas particularidades fazem que este marcador genético seja um dos marcadores em que há segurança quanto ao conhecimento do estado ancestral, isto é, a ausência do elemento *Alu* na região de interesse (Tishkoff *et al.*, 2000). O elemento YAP (*Y chromosome Alu Polymorphism*), localiza-se na região Yq11 do cromossomo e apresenta polimorfismo (Hammer, 1994).

Os marcadores do tipo SNPs são posições ao longo dos cromossomos onde a seqüência apresenta variação em uma única base. Estima-se que ocorra, aproximadamente, um SNP a cada mil bases ao longo do genoma humano (Nielsen, 2000). São também referidos como marcadores binários ou bialélicos por apresentarem apenas dois alelos segregando em populações humanas, a seqüência ancestral ou a derivada (Hammer e Zegura, 2002). Considera-se que são oriundos de eventos que ocorreram apenas uma vez na história evolutiva de uma determinada espécie (Underhill *et al.*, 2001).

Estudos de relações mais ancestrais entre populações e a tentativa para reconstruí-las a partir de linhagens do cromossomo Y, requerem polimorfismos com baixa probabilidade de mutações paralelas na porção não-recombinante do cromossomo Y nos quais o estado ancestral possa ser determinado. Os marcadores do tipo SNPs, com baixas taxas de mutação, na ordem de $2-4 \times 10^{-8}$ /sítios/geração, são os escolhidos para esse propósito. Esses polimorfismos auxiliam na determinação da origem filogeográfica de linhagens do cromossomo Y, permitindo a reconstrução do estado ancestral e preservando a informação haplotípica população-específica (Underhill *et al.*, 1997). O relacionamento ancestral entre os marcadores pode ser inferido pela análise filogenética. Entende-se por alelo ancestral aquele que está presente na base da árvore e o derivado o que apresenta uma mutação no mesmo local.

Os dados gerados pela análise dos SNPs são considerados como uma importante ferramenta para pesquisas genéticas e biológicas, sendo, portanto, aplicados em vários campos, como em áreas médica e genética de populações, com o objetivo de traçar migração e mistura de grupos ancestrais. Um outro campo de aplicação é a ciência forense para a identificação humana, tanto de indivíduos como de restos humanos (Krawczak, 1999; Petkovski *et al.*, 2005).

Os marcadores do tipo STR (*Short tandem repeats*), também chamados microssatélites ou repetições consecutivas curtas são abundantes no genoma. Possuem sua seqüência núcleo variando no número de repetições (Drobnic e Budowle, 2000), e/ou na seqüência de unidades repetidas, como seqüências mono, di, tri ou tetranucleotídios. Além disso, podem ser repetidos de poucas a inúmeras vezes no genoma e são muito polimórficos (Edwards *et al.*, 1992, Pena e Jeffreys, 1993; Ferreira e Grattapaglia, 1995; Hancock, 1996; Lins *et al.*, 1996). O número de alelos em um típico *locus* STR do tipo tetranucleotídeo pode variar de 5 a 20, dependendo do *locus* (Inman e Rudin, 1997), além de possuírem de 100 a 300 pares de bases.

Uma provável causa destas variações nos *loci* STRs são mutações envolvendo a inserção ou deleção de unidades que alteram o tamanho do alelo (Hancock, 1996; Kruglyak *et al.*, 1998; Drobnic e Budowle, 2000). Erros do tipo deslizamento (*slippage*) favorecem a mutação nos STRs proporcionando pequenas mudanças na ordem das unidades de repetição. São marcadores

com alta taxa de mutação (Kayser *et al.*, 2000), proporcionando situações em que dois alelos possuem mesmo número de repetições, mas não são idênticos por descendência.

A instabilidade desses marcadores gera uma grande quantidade de alelos enquanto os outros marcadores genéticos flanqueadores destes STRs, que são mais estáveis, permitem um rastreamento mais preciso das linhagens, assim como uma determinação da identidade das mesmas por descendência (Tishkoff *et al.*, 2000). O conjunto de alelos, transmitidos em blocos de alelos de diferentes STR no mesmo cromossomo, chama-se haplótipo e, a herança, haplotípica. Dessa maneira, é possível a identificação de diversos *loci* STR em um único cromossomo, sendo os mesmos alelos encontrados no pai, irmãos, tios, primos, avô e demais antepassados masculinos (Budowle e Brown, 2001).

São caracterizados como *loci* hipervariáveis, codominantes, multialélicos (Ferreira e Grattapaglia, 1995) e com uma alta heterozigosidade (Hammer e Zegura, 2002) sendo extremamente úteis no mapeamento genético de espécies, na identificação de pessoas ou de linhagens/ clones e predisposições de doenças (Armour *et al.*, 1996), em estudos de identificação humana (Hammond *et al.*, 1992, 1994; Hammer e Zegura, 2002), análise de paternidade (Alford *et al.*, 1994; Bever e Creacy, 1994; Schumm *et al.*, 1997), mapeamento genético (Schumm *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1991, 1992) e análise de populações (Deka *et al.*, 1995; Gill e Evett, 1995; Martinez-Jarreta *et al.*, 1999, Yamamoto *et al.*, 1999; Drobic e Budowle, 2000; Hashiyada, 2000; Tahir *et al.*, 2000; Aler *et al.*, 2001; Bosch *et al.*, 2001; Chantratita *et al.*, 2001; Goodwin *et al.*, 2001; Gusmão *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2001).

As mutações pontuais, deleções ou inserções de nucleotídeos, que levam à perda ou ganho de sítios de restrição, também revelam alterações na molécula do DNA mitocondrial, proporcionando polimorfismo. Esses sítios de restrições são específicos para endonucleases, enzimas de restrição capazes de reconhecer uma seqüência específica de DNA e a cortá-la, gerando fragmentos de tamanhos definidos (High e Benz, 1985) diferentes daqueles segmentos de DNA que não possuem este sítio, o que faz com que estes polimorfismos possam ser diferenciados.

Esses marcadores polimórficos podem auxiliar na diferenciação de populações humanas e podem ser denominados específicos de populações ou indicadores de ancestralidade. Apresenta maior sensibilidade, especificidade e são mais informativos que outros marcadores genéticos (Budowle e Brown, 2001). A análise de populações humanas utilizando a RFLP e/ ou seqüenciamento da região controle (Ballinger *et al.*, 1992; Torroni *et al.*, 1994a, 1994b, 1996) revela *clusters*, que definem a origem dos polimorfismos em africanos, europeus, asiáticos/ameríndios, muitas vezes continente-específicos (Torroni *et al.*, 1996, Alves-Silva *et al.*, 1999). Dessa forma, a análise de polimorfismo do DNA mitocondrial permite, por exemplo, estabelecer associações ou exclusões entre espécimes forenses e suspeitos de crimes e determinar relações de parentesco, tornando-se uma metodologia muito utilizada no meio forense.

Portanto, os *loci* haplóides, não-recombinantes, de herança uniparental, como os situados no cromossomo Y e no DNA mitocondrial são particularmente sensíveis para fazer inferências sobre eventos que ocorreram no passado. Em especial, eventos como efeito do fundador, migrações e expansões demográficas podem ser revelados com a análise dessas categorias de marcadores genéticos (Malaspina *et al.*, 1998; Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Underhill *et al.*, 2001).

I.2.1. Marcadores genéticos uniparentais

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

I.2.1.1. Cromossomo Y

Os cromossomos sexuais humanos são morfologicamente distintos. Enquanto o cromossomo X tem um tamanho médio de 150 Mb, o cromossomo

Y é pequeno (60 Mb) e apresenta poucos genes (Affara *et al.*, 1994). De acordo com análises citogenéticas, o cromossomo Y é altamente heteromórfico, ou seja, estudos em homens normais demonstram grandes variações no tamanho desse cromossomo dentro da espécie humana (Bobrow *et al.*, 1971).

O cromossomo Y apresenta poucos genes funcionais e um excesso de seqüências repetitivas (Smith *et al.*, 1987). Nas extremidades dos dois braços existem duas pequenas regiões, denominadas pseudoautosômicas (PARs - *pseudo-autosomal regions*), as quais apresentam homologia com o cromossomo X (Bradman e Thomas, 1998) e perfazem cerca de 5% do total do cromossomo Y (Hammer e Zegura, 2002). A homologia existente entre o cromossomo Y e o X permite que ocorra pareamento e recombinação entre esses na região pseudoautosômica (Bradman e Thomas, 1998). Excetuando essas duas regiões, os 50 milhões de pares de bases restantes compõem o restante desse cromossomo, é específico do Y (Hammer e Zegura, 2002).

Em decorrência da ausência de recombinação na região Y-específica, a cópia genética deste cromossomo encontrada em um pai e seu filho é idêntica, na ausência de mutação. As mutações, única forma de mudança na região Y-específica e fonte de toda variabilidade genética encontrada no mesmo são transmitidas de geração a geração (Jobling e Tyler-Smith, 1995). Elas podem aumentar de frequência na população e, com isso, a região passa a apresentar polimorfismo principalmente devido aos efeitos da deriva genética (Futuyma, 1998). O cromossomo Y possui diferentes tipos de polimorfismos que apresentam taxas de mutação diferentes, permitindo assim selecionar o intervalo de tempo da história das populações que desejamos estudar e escolher o tipo de marcador mais adequado (Jobling e Tyler-Smith, 1995). A maioria das mudanças ocorre nas regiões de introns e nas regiões extragênicas, conhecidas como regiões neutras, ou seja, que não representam nenhuma característica e nem conferem caráter adaptativo aos indivíduos. Logo, a análise das mudanças dentro destas regiões Y-específicas pode nos revelar a genealogia paterna e as relações evolutivas entre diferentes grupos de indivíduos (Bradman e Thomas, 1998; Hammer, 1995).

Indivíduos que compartilham a mesma seqüência cromossomal ou haplótipo o fazem por ancestralidade comum o que possibilita quantificar, em termos de gerações, a distância entre o cromossomo ancestral e os derivados. Desta forma, a porção não-recombinante do cromossomo Y de um homem representa a história única de sua linhagem patrilinear e contém um registro de eventos mutacionais que ocorreram ao longo da evolução em toda a linhagem (Mitchell e Hammer, 1996).

Esses fatores fazem com que o estudo de *loci* polimórficos situados no cromossomo Y seja muito útil em diferentes abordagens. Os haplótipos podem ser utilizados para traçar a evolução do cromossomo Y e detectar padrões geográficos em sua distribuição, permitindo a detecção de conjuntos característicos de haplótipos específicos de determinadas populações (Mitchell e Hammer, 1996). São particularmente úteis em estudos populacionais, pois refletem os efeitos de deriva e migração e auxiliam no entendimento da história evolutiva e na identificação humana (Seielstad *et al.*, 1994; Jobling e Tyler-Smith, 1995; Hammer e Zegura, 1996; Underhill *et al.*, 1997; Jobling *et al.*, 1997; Underhill *et al.*, 2000, 2001; Hammer *et al.*, 2001; Jobling, 2001; Brion *et al.*, 2004).

Como já explicado, a análise de marcadores binários do cromossomo Y possibilita a determinação da origem filogeográfica de cada cromossomo analisado, utilizando o conjunto haplotípico formado pelos alelos de cada locus estudado (haplogrupo). Quanto maior o poder discriminatório do conjunto de marcadores, ou seja, quanto mais recentes forem as mutações analisadas, maior será a capacidade de determinar geograficamente a origem étnica do cromossomo Y analisado. Os haplogrupos são população-específicos, como por exemplos, o haplogrupo Q3* que é característico de populações ameríndias sendo encontrado de acordo com Y - *The Y-Chromosome Consortium* (YCC, 2002), na América do Norte, Central e do Sul e o haplogrupo R1b8 que possui origem ancestral Ibérica (Hurles *et al.*, 1999).

I.2.1.2. DNA mitocondrial

Mitocôndrias são organelas encontradas no citoplasma celular. Seu número varia conforme a função da célula (Salzano, 2002), possuindo em sua estrutura uma matriz, uma membrana interna e uma externa (Alvarez *et al.*, 2001). A quantidade de mitocôndrias varia em função de suas necessidades energéticas, sendo que uma única célula pode chegar a possuir mais de 5.000 cópias dessa organela (Jobim *et al.*, 1999).

O DNA mitocondrial (DNAMt), um genoma extranuclear, é uma molécula circular pequena de 16.569 pares de nucleotídeos. Sua seqüência é totalmente conhecida, sendo que a região codificante contém 37 seqüências codificadoras, sendo 22 genes para RNA de transferência, 2 para RNA ribossômico e 13 para proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e na produção de ATP (Anderson *et al.*, 1981).

Uma das características de interesse em seu estudo é que, semelhante ao padrão de herança do cromossomo Y, a transmissão é em haplótipos. O DNA mitocondrial é de herança uniparental materna (Budowle e Brown, 2001; Alvarez *et al.*, 2001), ocorrendo a transmissão do genoma da mãe para os filhos sem modificação (Alvarez *et al.*, 2001).

O genoma mitocondrial é idêntico, entre diferentes indivíduos, na maior parte de sua seqüência. Diferenças de seqüências são encontradas na região *D-loop* - uma região de aproximadamente 1100 pares de bases com alta taxa de mutação, de 5 a 10 vezes maior que no DNA nuclear (Alvarez *et al.*, 2001). Dentro da região *D-loop* foram definidas duas regiões denominadas regiões hipervariáveis I e II. Estas têm sido amplamente utilizadas para investigar a diversidade dentro e entre as populações.

Os primeiros trabalhos a usar esta abordagem demonstraram uma grande variabilidade das linhagens mitocondriais humanas entre as populações e diferenças entre as linhagens de populações de regiões geográficas diferentes (Vigilant *et al.*, 1989, 1991; Stoneking *et al.* 1991). Analisando as mutações pontuais é possível verificar diferenças entre populações de diferentes regiões geográficas em função das mutações acumuladas e de suas freqüências (Cavalli-Sforza, 1994).

As diferenças observadas entre as seqüências de DNA mitocondrial são devido à presença de mutações. O acúmulo seqüencial de mutações ao longo do tempo levou à constituição de linhagens independentes, os haplótipos, que ao serem agrupados definem haplogrupos (Maca-Meyer *et al.*, 2001). Como exemplo: uma mutação na posição 663 do genoma mitocondrial criou um sítio para a enzima *HaeIII*, o qual é utilizado para a definição do haplogrupo A, independente do restante do genoma.

O DNA mitocondrial de ameríndios modernos é definido primariamente por quatro conjuntos de mutações específicas que se agrupam em quatro haplogrupos, denominados A, B, C e D. Um quinto haplogrupo de nativos americanos, o X, é encontrado no Norte da América do Norte e não está relacionado ao haplogrupo X europeu (Mishmar *et al.*, 2003). Esse haplogrupo ocorre em baixas freqüências entre os ancestrais colonizadores das Américas (Salzano, 2002). Esses cinco haplogrupos (A, B, C, D e X) são responsáveis por 100% da variação do DNA mitocondrial dos ameríndios nas Américas (Mishmar *et al.*, 2003).

Grupos humanos principais de DNA mitocondrial são continentais ou etnicamente específicos. O DNA mitocondrial africano pode ser definido pela presença do sítio de restrição na posição 3592 definido pela enzima *HpaI*, caracterizando o haplogrupo L. Este haplogrupo é o mais divergente de todos aqueles identificados nas populações humanas. Três haplogrupos maiores (L1, L2 e L3) são característicos desta origem, sendo que os haplogrupos menores de L1 (L1a e L1b), de L2 (L2a e L2b) e L3 (L3a, L3b, L3c e L3D) também são componentes do macrohaplogrupo L*. Destes, o haplogrupo L1 é considerado o mais ancestral dos haplogrupos africanos, e o L2, o mais recente (Chen *et al.*, 2000).

A variabilidade genética observada nos haplogrupos europeus de DNA mitocondrial se encontra categorizada dentro de dez linhagens maiores - H, I, J, K, M, T, U, V, W e X. Cada um desses haplogrupos foi definido por sítios polimórficos situados na região codificante do DNA mitocondrial. Estas linhagens foram derivadas primariamente do macrohaplogrupo N (Torroni *et al.*, 1996; Mishmar *et al.*, 2002). Ao menos seis destes haplogrupos europeus (H, I, J, K, T, W) são essencialmente restritos a populações européias. O haplogrupo

H representa aproximadamente 40,0% do DNA mitocondrial europeu. Estes provavelmente se originaram depois que os ancestrais europeus tornaram-se geneticamente separados dos demais (Torroni *et al.*, 1996).

A análise desse tipo de genoma é uma importante ferramenta em estudos antropológicos, evolutivos e forenses (incluindo tecidos antigos e arqueológicos), pois uma única célula possui, em média, mais de 5.000 cópias de DNA mitocondrial e a estrutura circular é resistente à digestão enzimática (Vigilant *et al.*, 1989; Álvarez *et al.*, 2001). Como existem milhares de cópias de DNAm, é mais fácil recuperar a seqüência do que a cópia única do DNA nuclear por célula. Além disso, a natureza haplóide do DNA mitocondrial o torna mais fácil para analisar do que o genoma diplóide (Butler e Levin, 1998). Em decorrência dessas características, em especial herança e distribuição celular, associado à alta variabilidade genética, o DNA mitocondrial tornou-se importante em várias áreas além da evolução humana. Tem sido útil em estudos sobre a origem humana (Cann *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991; Krings *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2002), de evolução humana (Torroni *et al.*, 1996; Cann *et al.*, 1987; Mateu *et al.*, 1997), estudos da dispersão de populações pelos continentes (Wallace e Torroni, 1992; Bonato e Salzano, 1997; Mesa *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2001), diferenciação de grupos humanos (Chen *et al.*, 1995; Torroni *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2002), formação de populações específicas (Batista-dos-Santos *et al.*, 1999), mistura étnica (Alves-Silva *et al.*, 2000), identificação humana (Wallace, 1997; Álvarez *et al.*, 2001; Budowle *et al.*, 2003) e de outras espécies (Wallace, 1997; Höss, 2000), estudos de evolução dos organismos (Strauss, 1999), antropológicos (Leonart *et al.*, 1999) e elucidação de passos envolvidos na biossíntese mitocondrial (Luft, 1994; Wallace, 1997).

I.3. A população brasileira: um relato genético

A população brasileira, como já relatado anteriormente, teve uma formação histórica peculiar, o que refletiu em uma estrutura genética populacional complexa. O país apresenta ainda nos dias de hoje populações isoladas e semi-isoladas, como populações indígenas, em especial na

Amazônia (Zago *et al.*, 1996), e remanescentes de quilombos dispersos pelo país (Cayres-Vallinoto *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003; Cotrim *et al.*, 2004). No início dos estudos de genética de população no país, um grande enfoque foi dado ao estudo das populações ameríndias. Porém, a análise de populações urbanas brasileiras remonta também ao início com o trabalho pioneiro de Krieger *et al.* (1965) sobre mistura gênica em migrantes do nordeste brasileiro.

A análise de populações urbanas dispersas pelo país tem referenciado a grande heterogeneidade da população brasileira. A mistura gênica tem sido estudada com base nas diferenças e similaridades das frequências gênicas de marcadores genéticos entre as populações de interesse e suas populações parentais (grupos étnicos parentais). Existe uma série de trabalhos na literatura relacionados à contribuição genética estimada para as várias regiões brasileiras, com a utilização de marcadores genéticos clássicos, em especial proteínas. Os dados genéticos, em geral, corroboram os dados históricos. Por exemplo, de acordo com análises de mistura, utilizando marcadores polimórficos clássicos (grupos sangüíneos, proteínas séricas e eritrocitárias), a contribuição ameríndia estimada em populações miscigenadas varia de 55,0% na população de Alenquer (Santos e Guerreiro, 1995) no Norte do país a 5,0% em Santa Catarina (Dornelles *et al.*, 1999) no Sul.

Estimativas baseadas em microssatélites mostram uma maior similaridade na comparação das contribuições das diferentes regiões do país, porém ainda mantém o quadro global. Apesar da contribuição ameríndia ainda ser maior no Norte do país (18%) e menor no Sul (7%), a contribuição européia varia pouco e a africana é similar. Com relação a região Centro-Oeste brasileira, o único trabalho até o momento tratando do assunto, utilizando microssatélites autossômicos, relata situação similar à encontrada no resto do país: maior presença européia, seguida de africana e finalmente ameríndia (Callegari-Jacques *et al.*, 2003). Essa maior similaridade observada pode ser decorrente do tipo de amostragem realizada no trabalho de Callegari-Jacques *et al.* (2003), que utilizaram amostras de investigação de paternidade de uma firma particular, associado ao fato dos marcadores microssatélites apresentarem um diferencial de frequência entre as populações parentais muito baixo.

A filogeografia de linhagens do cromossomo Y brasileiro foi analisada em 247 indivíduos de quatro das cinco regiões brasileiras, isso é, sem contemplar a região Centro-Oeste e utilizando uma amostra de indivíduos autodefinidos como “brancos” (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Em uma outra análise, a heterogeneidade do cromossomo Y em populações afro-brasileiras foi investigada utilizando 209 indivíduos dos estados da Bahia e São Paulo (Abe-Sandes *et al.*, 2004).

No Brasil, algumas populações foram estudadas para se conhecer a distribuição dos haplogrupos de DNA mitocondrial com o objetivo de caracterizá-las (Bortolini *et al.*, 1997; Alves-Silva *et al.*, 2000; Bandelt *et al.*, 2001). Quatro regiões geográficas brasileiras foram também investigadas acerca da ancestralidade de linhagens do DNA mitocondrial, para um total de 247 amostras de indivíduos autodeclarados como “brancos” novamente sem contemplar a região Centro-Oeste (Alves-Silva *et al.*, 2000).

A grande contribuição desses artigos foi relatar que o processo de miscigenação no Brasil foi peculiar, pois o padrão de reprodução foi preferencial. Os resultados mostram que as patrilinhagens foram essencialmente européias, enquanto que as matrinhagens foram principalmente ameríndias e africanas (Alves-Silva *et al.*, 2001; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Abé-Sandes *et al.*, 2004). Dessa forma, a análise de marcadores de herança uniparental tem corroborado com dados históricos que relatam o cruzamento preferencial entre homens de origem européia e mulheres de todas as origens, com baixa participação dos homens das demais origens na constituição da população atual (Bortolini *et al.*, 1999; Alves-Silva, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Abé-Sandes *et al.*, 2004; Grattapaglia *et al.*, 2005). Portanto, é possível observar que pode haver diferença em respostas à mesma questão quando marcadores de diferentes níveis hierárquicos são empregados.

Dentre as regiões do país, considerando marcadores uniparentais, a menos extensamente estudada é a região Centro-Oeste. A diversidade haplotípica do cromossomo Y foi avaliada nas cinco regiões brasileiras, contemplando a região Centro-Oeste com 48 indivíduos investigados, porém sem focar a questão de mistura genética (Grattapaglia *et al.*, 2005). A caracterização uni e bi-parental, baseada respectivamente, em haplótipos de

cromossomo Y e marcadores nucleares autossômicos, para populações do Centro-Oeste permitirá obter informações sobre a proporção da incorporação de alelos ameríndios, europeus e africanos na formação da população dessa região, complementando pesquisas históricas e etnográficas.

II. OBJETIVOS

O estudo de marcadores uniparentais em populações urbanas pode contribuir para um melhor entendimento do processo de formação histórica de uma dada região. O presente trabalho visa avaliar a constituição genética amostral de duas populações urbanas, Estado de Goiás e Distrito Federal pertencentes à região Centro-Oeste brasileira e estimar a contribuição parental na constituição das mesmas, utilizando marcadores uniparentais paternos e maternos: Cromossomo Y e DNA mitocondrial. Considerando-se as características peculiares a esses marcadores moleculares, estabelecemos como objetivos:

01. Analisar a variabilidade genética e a diferenciação populacional amostral das populações de Goiás e Distrito Federal quanto a:
 - a. Doze marcadores genéticos bialélicos situados na região específica do cromossomo Y;
 - b. Haplogrupos obtidos da análise de marcadores bialélicos (cromossomo Y);
 - c. Quatro microssatélites Y-específicos;
 - d. Haplótipos obtidos da análise de marcadores microssatélites acrescidos da inserção AluYAP;
 - e. Associação dos dados referentes ao cromossomo Y (SNPs/STRs/AluYAP);
 - f. Quatorze marcadores genéticos bialélicos situados no DNA mitocondrial;
 - g. Haplogrupos obtidos da análise de marcadores situados no DNA mitocondrial;

02. Análise filogeográfica do cromossomo Y;

03. Comparar os dados uniparentais gerados;

04. Estimar a contribuição dos três grupos parentais principais na formação das duas populações utilizando:
 - a. Haplótipos de STR/*Alu*YAP;
 - b. Haplogrupos de cromossomo Y;
 - c. Haplogrupos de DNA mitocondrial;

05. Estimar a constituição genética individual quanto às linhagens maternas e paternas;

06. Comparar as estimativas geradas de mistura genética entre elas e com os dados de outras regiões brasileiras.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Populações

A região Centro-Oeste brasileira é composta por três estados – Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul – e pelo Distrito Federal. Esse trabalho enfocou a análise de amostras de duas populações dessa região: Estado de Goiás e Distrito Federal.

O Estado de Goiás possui uma área territorial oficial de 340.086.698 Km², dividida em 5 mesorregiões e 18 microrregiões administrativas (Figura III.1). Já o Distrito Federal, composto por 23 regiões administrativas (considerando Lago Norte e Lago Sul como duas regiões distintas), localiza-se geograficamente dentro da região Centro-Oeste com uma área territorial oficial de 5.801.937 Km², de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Na época da coleta, o Distrito Federal era composto por 20 regiões administrativas (Figura III.2).

A população urbana é bem maior (~88% em Goiás e 96% no Distrito Federal) que a população rural. O número de habitantes do sexo masculino é levemente inferior em relação aos do feminino no meio urbano, ocorrendo em forma inversa no meio rural. O Estado de Goiás possui mais do que o dobro do número de habitantes do Distrito Federal. A soma das duas populações compõe 60,6% do total de habitantes da região Centro-Oeste (Tabela III.1).

Com relação à distribuição por faixas etárias, os indivíduos com idade de 15 a 64 anos constituem o maior percentual da população residente nas duas populações analisadas. As demais faixas etárias mostram-se em percentuais bem menores e semelhantes para as duas populações (Tabela III.2). Importante salientar que o Distrito Federal foi fundado oficialmente em 1960, portanto indivíduos nascidos anteriormente a essa data são considerados migrantes.

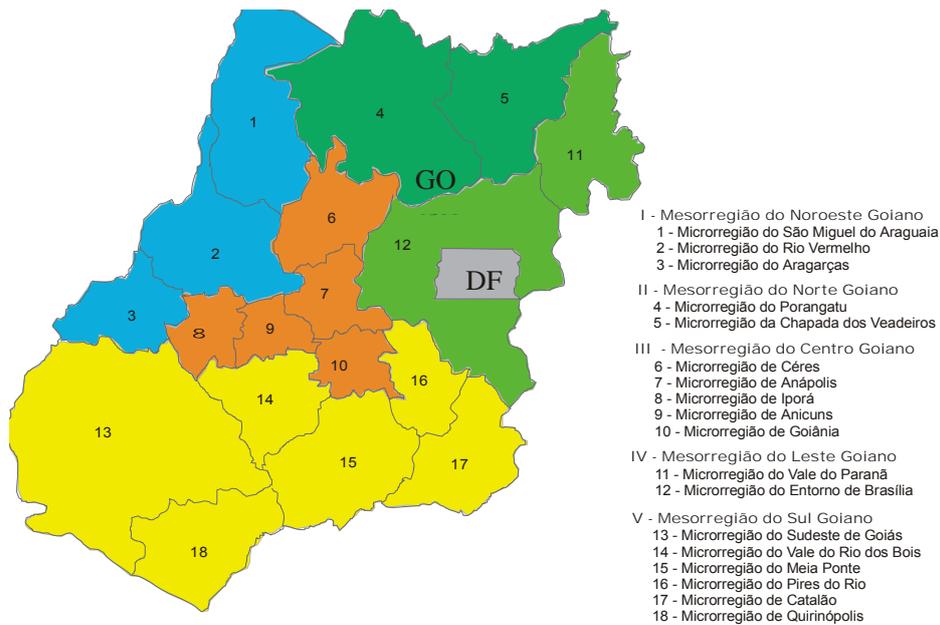


Figura III.1 - Mesorregiões e microrregiões que compõem o Estado de Goiás (Mapa: Albani Borges dos Reis).



Figura III.2 - Regiões Administrativas que compunham o Distrito Federal à época da coleta de material biológico (Fonte: Codeplan, 1997). Quatro outras regiões administrativas foram criadas desde então: Park Way (2003), Setor Complementar de Indústria e Abastecimento (2004), Sobradinho II (2004) e Itapoã (2005) (sítio oficial do Governo do Distrito Federal – www.districtofederal.df.gov.br acessado em 31/01/2006), as quais não estão representadas no presente mapa.

Tabela III.1 – Distribuição dos habitantes do Estado de Goiás e do Distrito Federal por gênero (masculino e feminino), região (urbana ou rural), contingente total em cada população e na região Centro-Oeste como um todo (Dados IBGE – censo 2000 – www.ibge.gov.br).

População	Goiás			Distrito Federal			Centro-Oeste
	Urbano	Rural	Total	Urbano	Rural	Total	Total
Masculino	2.160.766	331.672	2.492.438	933.839	47.517	981.356	5.801.005
Feminino	2.235.879	274.911	2.510.790	1.027.660	42.130	1.069.790	5.835.723
Total	4.396.645	606.583	5.003.228	1.961.499	89.647	2.051.146	11.636.728

Tabela III.2 - Proporção da população residente, por faixas etárias, no Estado de Goiás e no Distrito Federal, conforme dados do IBGE (2000).

Faixa etária	Goiás (%)	Distrito Federal (%)
0 – 14 anos	29,32	28,43
15 – 64 anos	66,00	68,28
> 65 anos	4,68	3,29

III.2. Coleta de material biológico e dados demográficos

A coleta de material biológico foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O protocolo específico desse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília sob o número de registro CEP-FM 024/2005.

Estado de Goiás

Para a realização das coletas das amostras do Estado de Goiás, foram selecionados 43 municípios (Tabela III.3) com base na densidade populacional dos mesmos (dados do IBGE – 1996). Os municípios selecionados foram visitados no período de 07/02/2000 a 09/06/2000.

Os critérios básicos para a escolha dos voluntários em cada município foram: idade acima de 18 (dezoito) anos ou com autorização paterna/materna e ter nascido no local onde a coleta estava sendo processada. Com a finalidade de descartar consangüinidade entre os voluntários, foram realizadas entrevistas com os participantes da pesquisa antes da coleta das amostras. Cada indivíduo assinou um “Termo de Consentimento de Investigação” (Anexo 1) de acordo com as normas da CONEP. Do total de duzentos doadores foram selecionadas 129 de indivíduos do sexo masculino. A faixa etária média dos indivíduos que compuseram a amostra foi de 32,6 anos (D.P. \pm 10,5) à época da coleta.

Distrito Federal

Como a fundação do Distrito Federal ocorreu em 1960, conseqüentemente o povoamento humano efetivo deu-se após essa data. Por esse motivo, foi estabelecido como critério básico de seleção que o local de residência dos pais fosse no Distrito Federal na data de nascimento do indivíduo. O critério de idade superior aos 18 anos ou com autorização dos pais foi também seguido.

Similarmente à coleta do Estado de Goiás, os voluntários também foram esclarecidos sobre o projeto e solicitados a assinarem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). Paralelamente a isso, foi aplicado um questionário demográfico visando à obtenção de dados referentes à taxa de migração e grau de miscigenação étnica. As informações coletadas referiram-se também, no mínimo, a uma geração ascendente (Anexo 3).

A coleta de dados e de sangue venoso dos voluntários ocorreu durante o ano de 2002. Foi coletado um total de 71 indivíduos do sexo masculino com faixa etária média de 21,6 anos (D.P. \pm 3,8) à época da coleta, sendo que 53,5% dos indivíduos se autodeclararam brancos, 39,3% pardos, 3,6% negros e 3,6 % amarelos perfazendo uma amostragem de 13 regiões administrativas do Distrito Federal (Tabela III.4).

Tabela III.3 – Distribuição dos indivíduos do Estado de Goiás de acordo com as mesorregiões, microrregiões, municípios coletados e sua densidade populacional.

Mesorregião	Microrregião	Municípios coletados	População	Nº amostras
Noroeste Goiano	São Miguel do Araguaia	Crixás	14.801	1
		São M. Araguaia	21.980	1
	Rio Vermelho	GOIÁS	28.170	2
		Itapirapuã	9.264	1
		Jussara	18.713	1
Norte Goiano	Aragarças	Aragarças	18.205	1
	Porangatu	Minaçu	37.044	2
		Porangatu	39.011	3
		Uruaçu	33.514	2
	Chapada Veadeiros	Campos Belos	16.009	1
São João da Aliança		15.986	1	
Centro Goiano	Ceres	Ceres	20.292	2
		Goianésia	48.165	4
		Itapuranga	27.677	3
	Anápolis	Anápolis	282.197	7
		Inhumas	41.726	2
		Jaraguá	30.651	2
	Iporá	Fazenda Nova	7.832	1
		Iporá	32.537	2
	Anicuns	Firminópolis	9.605	1
		São L.M. Belos	25.684	2
GOIÂNIA	Aparecida de Goiânia	324.662	10	
	Goiânia	1.056.330	23	
	Trindade	78.222	1	
Leste Goiano	Vão do Paranã	Iaciara	10.163	1
		Posse	25.764	2
	Entorno de Brasília	Águas L. de Goiás	89.200	6
		Luziânia	125.597	6
		Valparaíso de Goiás	88.734	5
Sul Goiano	Sudoeste de Goiás	Jataí	78.945	3
		Mineiros	35.096	2
		Rio Verde	107.755	7
	Vale do Rio dos Bois	Acreúna	15.945	1
		Indiara	12.718	1
		Palmeiras de Goiás	18.377	2
	Meia-Ponte	Caldas Novas	45.222	3
		Itumbiara	81.823	6
		Morrinhos	33.922	3
	Pires do Rio	Silvânia	19.513	1
Vianópolis		9.911	1	
Catalão	Corumbáiba	6.216	1	
	Ipameri	22.856	1	
	Quirinópolis	35.857	1	

Fonte: Censo Demográfico do Brasil publicado no diário oficial da União em 30/08/1999 – Trabalho realizado através da Gerência de Serviços Técnicos e Urbanísticos. Setor de Serviços Cartográficos e Geográficos – 1996 – EMCIDEC.

Tabela III.4 – Distribuição dos doadores do Distrito Federal de acordo com a região administrativa de moradia dos pais à época do nascimento do sujeito da pesquisa.

Regiões administrativas	Número de amostras
Asa Norte	09
Asa Sul	10
Ceilândia	03
Cruzeiro	05
Brazlândia	03
Gama	05
Guará	06
Planaltina	07
Sobradinho	06
Taguatinga	06
Núcleo Bandeirante	03
Lago Sul	03
Lago Norte	05

III.3. Processamento e conservação da amostra e extração de DNA

As amostras biológicas foram obtidas com sistema de coleta a vácuo, utilizando EDTA como anticoagulante. Estas foram processadas para estocagem após a coleta (Anexo 4) e encontram-se armazenadas em freezer à temperatura de 20^oC negativos na Universidade de Brasília, no Laboratório de Genética. Para extração do DNA foram utilizados três protocolos alternativos: (i) Higuchi (1989), (ii) GFXTM *Genomic Blood DNA purification kit* (Pharmacia) e (iii) *Puregene kit* – Gentra systems (Biosystems) (Anexo 5).

Após a extração, as amostras de DNA foram analisadas quanto ao seu estado de integridade e quanto à concentração, utilizando-se gel de agarose a 0,8% e coloração com Brometo de Etídeo - EtBr (Anexo 6).

III.4. Marcadores genéticos

Para a análise das amostras coletadas foram utilizados marcadores uniparentais situados no cromossomo Y e no DNA mitocondrial. Os resultados das análises de marcadores genéticos uniparentais permitem a construção de haplótipos e, por conseguinte, a reconstrução da genealogia dos *loci*. Estes *loci* são freqüentemente utilizados na análise de genética de populações para

esclarecer questões evolutivas e da estrutura populacional (Roewer *et al.*, 1992).

Para a análise laboratorial de todos os marcadores do cromossomo Y e do DNA mitocondrial, os segmentos de interesse foram inicialmente amplificados através da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Saiki *et al.*, 1986; Mullis, 1990), a qual encontra-se descrito no Anexo 7. Uma das grandes vantagens dessa técnica é o potencial de utilização de DNA degradado, quantidades mínimas de DNA e independência da manipulação de materiais marcados radioativamente (Budowle e Monson, 1993).

As amplificações foram realizadas com um volume total de 25,0 µl. A quantidade de cada um dos reagentes variou para alguns sistemas. Para cada marcador genético há uma seqüência de iniciadores (*primers*) que são de suma importância para o processo de amplificação, pois estes iniciadores anelam-se às seqüências flanqueadoras do *locus* a ser analisado e fornecem a base para o início da ação da polimerase. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose em uma concentração de 1%, corados com brometo de etídeo.

III.4.1. Cromossomo Y

Foram analisadas três categorias de marcadores genéticos – inserção *Alu*, SNP e STR - localizadas na região não-recombinante do cromossomo Y, totalizando dezesseis *loci* uniparentais masculinos.

III.4.1.1. Elemento Alu

Dentre as inserções *Alu* encontradas no cromossomo Y humano está o polimorfismo no *locus* *DYS287–AluYAP* (*Y Chromosome Alu Polymorphism*) situado na região Yq11 do cromossomo Y. A região genômica de interesse foi amplificada, via PCR, utilizando os iniciadores (Tabela III.5). A presença ou ausência dessa inserção foi avaliada após eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% e coloração por nitrato de prata dos produtos de amplificação (Anexo 10).

III.4.1.2. Marcadores binários

Foram analisados onze SNPs Y-específicos: 92R7, M89, M213, P2, SRY2627, SRY4064, M2, M3, M60, M34 e P3, que permitem a construção de haplogrupos e a definição da origem geográfica dos indivíduos amostrados, de acordo com o descrito na literatura. A Tabela III.5 mostra os marcadores binários analisados e a mutação que caracteriza o *locus*, a seqüência dos iniciadores utilizados, a temperatura de pareamento, o tamanho do fragmento amplificado e a enzima de restrição utilizada para genotipagem. A metodologia utilizada para análise de grande parte desses SNPs foi amplificação de regiões genômicas específicas por PCR seguida de digestão enzimática (Anexo 7). Os marcadores M89, M213, P2, M60, M34 e P3 foram analisados por seqüenciamento direto utilizando o *Kit Big Dye Terminator*, específico para o equipamento da Perkin-Elmer ABI 377.

A maioria dos marcadores bialélicos foi identificada genotipicamente de acordo com a hierarquia, baseada na filogenia relatada no Y - *The Y-Chromosome Consortium* (YCC, 2002) para haplogrupos binários do cromossomo Y.

Os marcadores moleculares 92R7, M89, M213, P2, SRY2627, SRY4064, M2, M3, M60, M34 e P3 (Tabela III.5) foram analisados no Laboratório de Clonagem da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo), no ano de 2004. Os segmentos de interesse foram amplificados por PCR utilizando um termociclador "*Perkin Elmer-Cetus 9600*". As condições da reação de PCR para todos os SNPs encontram-se descrito no Anexo 7.

Os resultados das amplificações dos SNPs 92R7, SRY2627, SRY4064, M2 e M3 foram analisados através da técnica de RFLP. Esta técnica consiste em amplificar as regiões de interesse do DNA e submeter à digestão enzimática, utilizando-se enzimas específicas para cada marcador. Os produtos da digestão foram identificados utilizando-se géis de poliacrilamida a 6%, corados com nitrato de prata, ou géis de agarose, com concentrações que variaram de 2 a 3%, conforme o tamanho e o número dos fragmentos, corados com Brometo de etídeo (Anexo 8). Após, eram analisados o fenótipo de cada amostra.

Tabela III.5 - Relação dos marcadores binários analisados, mutação característica do locus, seqüência dos iniciadores utilizados, temperatura de pareamento, tamanho do fragmento amplificado e enzima de restrição utilizada.

Marcador	Mutação característica	Iniciadores	TA	SA (pb)	Enzima	Referência
92R7	C⇒T	5'- GAC CCG CTG TAG ACC TGA CT -3' 5'- GCC TAT CTA CTT CAG TGA TTT CT -3'	62°C	709	<i>Hind</i> III	Hurles <i>et al.</i> (1999)
M89	C⇒T	5' – AGA AGC AGA TTG ATG TCC CAC T – 3' 5' – TCC AGT TAG GAG ATC CCC TCA – 3'	59°C	527	*	Underhill <i>et al.</i> , (2000)
M213	T⇒C	5' – TAT AAT CAA GTT ACC AAT TAC TGG – 3' 5' – TTT TGT AAC ATT GAA TGG CAA A – 3'	56°C	409	*	Underhill <i>et al.</i> , (2000)
P2	C⇒T	5'- GAT GCA AAT GAG AAA GAA CT -3' 5'- CTA AAA ACT GGA GGG AGA AA -3'	51°C	536	*	Hammer <i>et al.</i> (1997 e 1998)
SRY2627	C⇒T	5'- CGC GGC TTT GAA TTT CAA GCT CTG -3' 5'- CCA GGG CCC CGA GGG ACT CTT -3'	54°C	391	<i>Ban</i> I	Underhill <i>et al.</i> (2000)
SRY4064	G⇒A	5'- ACA GCA CAT TAG CTG GTA TGA C -3' 5'- TCT CTT TAT GGC AAG ACT TAC G -3'	60°C	509	<i>Bsr</i> BI	Santos <i>et al.</i> (1999)
M2	A⇒G	5' - AGG CAC TGG TCA GAA TGA AG -3' 5' - AAT GGA AAA TAC AGC TCC CC -3'	57°C	209	<i>Nla</i> III	Seielstad <i>et al.</i> (1994)
M3	C⇒T	5' - TAA TCA GTC TCC TCC CAG CA -3' 5' - AGG TAC CAG CTC TTC CCA AAT -3'	61°C	202	<i>Mfe</i> I	Santos <i>et al.</i> , (1999)
M60	insT	'5' – GCA CTG GCG TTC ATC ATC T – 3' 5' – ATG TTC ATT ATG GTT CAG GAG G – 3'	55°C	388	*	Underhill <i>et al.</i> , (2000)
M34	C⇒T	5'- CAC TTC ACA TTT GTT TTT AGG -3' 5'- AGT CAT TAT TTA GTC ATT CCA G -3'	49°C	372	*	Underhill <i>et al.</i> (2000)
P3	G⇒A	5'- GAT GCA AAT GAG AAA GAA CT -3' 5'- CTA AAA ACT GGA GGG AGA AA -3'	51°C	536	*	Hammer <i>et al.</i> (1997 e 1998)
YAP (DYS287)	-⇒+	5'- CAG GGA AGA TAA AGA AAT A -3' 5'- CTG CTA AAA GGG GAT GGA T -3'	51°C	450	**	Hammer (1994)

*seqüenciamento; **visualização direta do produto amplificado; TA – temperatura de pareamento; SA – Tamanho do segmento amplificado

III.4.1.3 Marcadores do tipo STR

Os *loci* STR selecionados foram do tipo tetranucleotídeos: *loci* DYS19 (também conhecido como DYS394), DYS390, DYS391 e DYS393. As principais características destes marcadores, como constituição da seqüência cerne repetida, número de alelos descritos na literatura e localização cromossômica, dentre outros, estão mostrados na Tabela III.6. A figura III.3 ilustra as localizações dos quatro STRs analisados no cromossomo Y humano.

Após a realização da técnica de PCR, os produtos da amplificação dos sistemas de microssatélites e do elemento *Alu* foram analisados em gel vertical de poliacrilamida 10%, sendo utilizado o gel desnaturante para os microssatélites e não-desnaturante, com glicerol, para o marcador *AluYAP*. No anexo 10 estão os protocolos de preparo dos géis utilizados.

A análise desses *loci* foi realizada no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília (UnB), utilizando um aparelho termociclador PT-100 MJ (*Research, Inc*). As condições da reação de PCR para estes marcadores estão descritas no Anexo 7.

Construção dos haplótipos de STRs e haplogrupos de SNPs

Os alelos de STRs foram nomeados de acordo com o número de repetições da seqüência cerne, conforme sugerido por Roewer *et al.* (1992) e Kayser *et al.* (1997a). Para a construção dos haplótipos de STRs, utilizamos a seqüência sugerida por Kayser *et al.* (1997a). O marcador YAP foi utilizado no intuito de se distinguir dois grupos de haplótipos: YAP+ (presença de inserção) e YAP- (ausência de inserção).

Para a construção dos haplogrupos utilizamos marcadores moleculares que conseguissem distinguir os três grupos parentais que colonizaram a região (europeu, africano e ameríndio). As seqüências desses marcadores são as descritas de acordo com Hurles *et al.* (1999), Underhill *et al.*, (2000), Hammer *et al.*(1997 e 1998), Santos *et al.* (1999), Seielstad *et al.* (1994), Hammer (1994), conforme a Tabela III.5.

Tabela III.6 - Relação dos *loci* gênicos do tipo STRs do cromossomo Y analisados, seqüência dos iniciadores, temperatura de pareamento, segmento amplificado, repetição e localização cromossômica.

<i>Locus</i>	Iniciadores*	TA (°C)	SA (pb)	Repetição	Nº alelos	Localização
DYS19	5' - CTA CTG AGT TTC TGT TAT AGT - 3' 5' - ATG GCA GTA GTG AGG ACA - 3'	58 e 54	186-202	CTAT	5	Yp11,2
DYS390	5' - TAT ATT TTA CAC ATT TTT GGG CC - 3' 5' - TGA CAG TAA AAT GAA CAC ATT GC - 3'	63 e 58	199-227	CTAT	8	Yq11,23
DYS391	5' - CTA TTC ATT CAA TCA TAC ACC CA - 3' 5' - GAT TCT TTG TGG TGG GTC TG - 3'	63 e 58	275-291	CTAT	5	Yq11,21
DYS393	5' - GTG GTC TTC TAC TTG TGT CAA TAC - 3' 5' - AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G - 3'	63 e 58	120-132	GATA	4	Yp11,3

TA – temperatura de *pareamento*; SA – Segmento amplificado.

* O iniciador *DYS19* foi desenhado por Roewer *et al.*(1992) e, os demais por Kayser *et al.* (1997a).

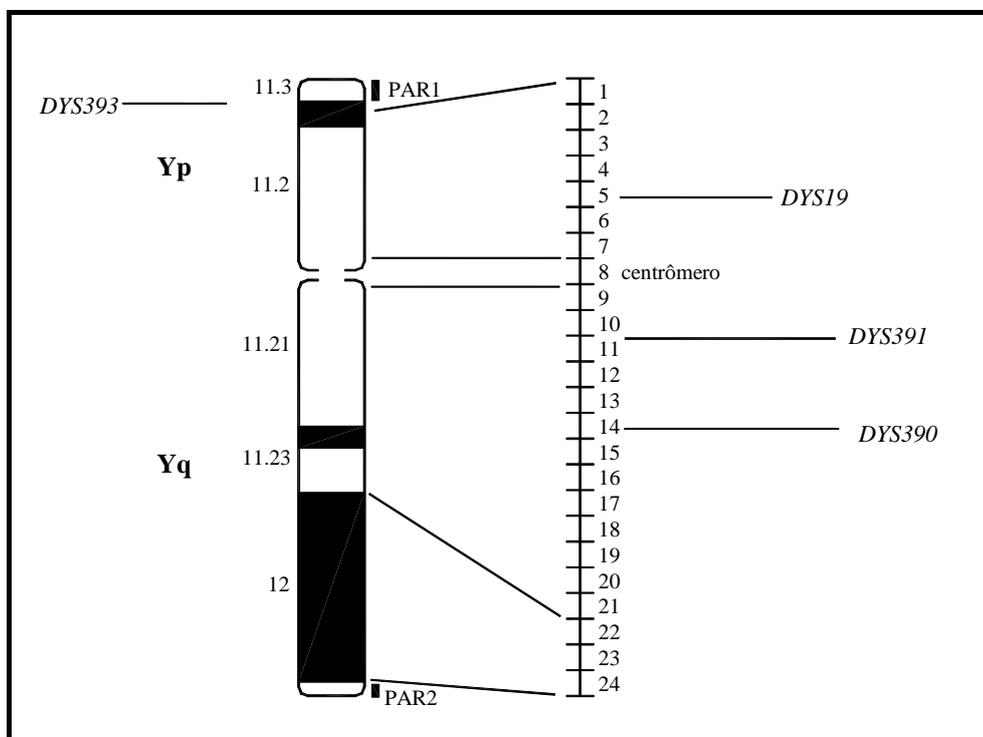


Figura III.3 - Estrutura do cromossomo Y humano e a localização dos quatro STRs analisados

III.4.2. DNA mitocondrial

Os marcadores genéticos localizados no DNA mitocondrial pertencem basicamente a duas categorias: SNPs e Inserções/Deleções (Indels). Os SNPs podem ser identificados por seqüenciamento ou, alternativamente, pela análise dos produtos amplificados via PCR seguido de digestão enzimática, os denominados RFPL (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (Torrioni *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995). Nesse caso, os SNPs são identificados através da presença ou ausência de sítios de reconhecimento das enzimas de restrição as quais podem “cortar” o DNA (dependendo da presença ou ausência do nucleotídeo em uma dada região) (Salzano, 2002). O conjunto de resultados para o genoma de um dado indivíduo permite a construção de haplogrupo de DNA mitocondrial (Chen *et al.*, 1995).

Para a definição dos haplogrupos do DNA mitocondrial dos indivíduos foram analisados 13 SNPs localizados na região codificadora do DNA mitocondrial e uma deleção de 9pb em um pequeno segmento não codificante, entre os genes COII/tRNALys. Para ambas categorias de marcadores foi empregada a técnica de PCR para amplificação de fragmentos específicos. Para análise dos SNPs, os fragmentos foram digeridos por endonucleases específicas e características para a definição dos haplogrupos (*HaeIII*, *HincII*, *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *TaqI*, *DdeI*, *BstNI*, *HaeII* e *BamHI*). Os fragmentos, tanto os da amplificação direta como da digestão enzimática, foram separados em eletroforese para genotipagem.

III.4.2.1 Marcadores situados no DNA mitocondrial

O protocolo da PCR e a quantidade dos reagentes utilizados para amplificação em todos os marcadores situados no DNA mitocondrial estão descritos no Anexo 7.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corados, com nitrato de prata ou em gel de agarose com concentração de 2% ou 3%, corado com brometo de etídeo (Anexo 10).

A relação dos haplogrupos, iniciadores utilizados para amplificação dos segmentos e das enzimas utilizadas na digestão, estão listados na Tabela III.7. Os

SNPs foram analisados por PCR-RFLP de acordo com Chen *et al.* (1995) e Torroni *et al.* (1996).

As digestões foram feitas com endonucleases apropriadas seguindo as especificações dos fabricantes (Gibco BRL ou Biolabs) e obedeceram a uma hierarquia:

1. As amostras das populações de Goiás e Distrito Federal foram testadas, de conformidade com os dados de seu povoamento, para a mutação *HpaI* 3.592; quando positivas, foram testadas para os subhaplogrupos L: L1 e L2;
2. Quando os resultados foram negativos para *HpaI* na posição 3.592, foram testadas para os haplogrupos L3a, L3b, L3c e L3d.
3. As amostras negativas para esses haplogrupos foram então testadas para os demais haplogrupos;
4. As amostras positivas para + 663 *HaeIII* foram definidas como pertencentes ao haplogrupo A;
5. As amostras positivas para deleção de 9pb foram testadas para os subhaplogrupos L3.
6. As amostras que foram negativas para os haplogrupos descritos acima foram testadas para outros haplogrupos que também caracterizavam ameríndios e europeus.

Tabela III.7 - Relação dos haplogrupos analisados, iniciadores, temperatura de pareamento, segmento amplificado, polimorfismos analisados por digestão enzimática para caracterização dos haplogrupos de DNA mitocondrial e sua distribuição geográfica. As amplificações foram feitas utilizando-se iniciadores específicos e as condições descritas por Torroni *et al.* (1992, 1993 e 1996).

Haplogrupo	Mutação característica	Iniciadores	TA (°C)	SA (pb)	Enzima	Distribuição geográfica do haplogrupo
A	+663	5'-ACC TCC TCA AAG CAA TAC ACT G-3' 5'-GTG CTT GAT GCT TGT TCC TTT TG-3'	52	176	<i>HaeIII</i>	América/Ásia
B	Deleção 9pb	5'-ATG CTA AGT TAG CTT TAC AG-3' 5'-ACA GTT TCA TGC CCA TCG TC-3'	49	178	--	América/Ásia
C	-13259	5'-CGC CCT TAC ACA AAA TGA CAT CAA-3' 5'-TCC TAT TTT TCG AAT ATC TTG TTC-3'	50	208	<i>HincII</i>	América/Ásia
D	-5176	5'-TAA CTA CTA CCG CAT TCC TA-3' 5'-AAA GCC GGT TAG CGG GGG A-3'	51	146	<i>AluI</i>	América/Ásia
L	+3592	5'-CGC TGA CGC CAT AAA ACT CT-3' 5'-GAG ATT GTT TGG GCT ACT GCT-3'	56	255	<i>HpaI</i>	África Subsaariana
L1	+10.806	5'-CCA ACA CAT ATG GCC TAG ACT-3' 5'-GGT TGG GGA ACA GCT AAA TA-3'	50	210	<i>HinfI</i>	África Subsaariana
L2	-10.806	5'-GGA ACG TGT GGG CTA TTT AGG-3' 5'-GCC CGA ATG ATA TTT CC-3'	54	994	<i>HinfI</i>	África Subsaariana
L3a	+2349	5'-AAC ACA AAG CAC CCA ACT TAC ACT TAG GA-3'	52	278	<i>MboI</i>	África Subsaariana

Haplogrupo	Mutação característica	Iniciadores	TA (°C)	SA (pb)	Enzima	Distribuição geográfica do haplogrupo
		5'-CTT TGG CTC TCC TTG CAA AGT-3'				
L3b*	-8616	5'-AAC CCT GAG AAC CAA AAT GAA CGA-3' 5'-ATG GGG ATA AGG GGT GTA GGT-3'	54	434	<i>Mbol</i>	África Subsaariana
L3c	+10084	5'-CGA AGC CGC CGC CTG ATA CTG G-3' 5'-GTA GTA AGG CTA GGA GGG TG-3'	50	818	<i>TaqI</i>	África Subsaariana
L3d	-10394	5'-TCC TTT TAC CCC TAC CAT GAG-3' 5'-ATT ATT CCT TCT AGG CAT AGT AG-3'	49	309	<i>Ddel</i>	África Subsaariana
H	-7025	5'-AAG CAA TAT GAA ATG ATC TGC-3' 5'-CGT AGG TTT GGT CTA GG-3'	53	241	<i>AluI</i>	Europa
K	-9052	5'-CCT AGC CAT GGC CAT CC-3' 5'-GGC TTA CTA GAA GTG TGA AAA C-3'	52	355	<i>HaeIII</i>	Europa
J	-13704	5'-CCT CCC TGA CAA GCG CCT ATA GC-3' 5'-CTA GGG CTG TTA GAA GTC CT-3'	52	260	<i>BstNI</i>	Europa
T	+13366	5'-GCT TAG GCG CTA TCA CCA C-3' 5'-ATA TCT TGT TCA TTG TTA AG-3'	48	231	<i>BamHI</i>	Europa

* Iniciador desenhado no Laboratório de Clonagem do Hemocentro – RP – SP

III.5. Análise estatística

Para a análise dos dados obtidos no presente estudo, considerando tanto os marcadores Y-específicos, quanto os situados no DNA mitocondrial, realizamos algumas análises em comum, a saber:

1. A análise da estimativa da frequência de cada marcador e do haplogrupo para os marcadores analisados no presente estudo, foi realizada pelo método de contagem direta, de acordo com a equação:

$p_i = n_i/n$, onde n_i é o número de ocorrências (frequência absoluta do haplogrupo i na amostra) e n é o número total de indivíduos amostrados.

2. As frequências alélicas e haplotípicas e seus desvios padrão foram calculados utilizando o programa Arlequin 2000 (Schneider *et al.*, 2000). Este cálculo foi baseado em tabelas de contingências geradas para cada *locus*, onde se analisam o número de populações estudadas e o número de alelos para o *locus*.

3. Para análise da variância molecular foi também utilizado o programa Arlequin 2000 (Schneider *et al.*, 2000). A análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi aplicada para analisar a distribuição da diversidade intra e interpopulacional.

A entrada dos dados no programa ARLEQUIN pode ser realizada pelos tipos de dados: DNA, RFLP, MICROSAT, STANDART ou FREQUÊNCIA. Em nosso conjunto de marcadores utilizamos três alternativas: RFLP, Microsat e frequência.

Quando da análise de haplótipos conjugados STRs/SNPs foi escolhido a opção MICROSAT no programa ARLEQUIN v.2000, pois esta permite enquadrar alelos múltiplos. No entanto, os *loci* de marcadores binários, que deveriam ser analisados como RFLPs, foram adaptados para representarem microssatélites. Ou seja, o Estado ancestral e o derivado foram identificados como números, 10 e 11, que representavam os dois alelos.

4. Para o cálculo da diversidade gênica por *locus* foi utilizado o programa PopGENE (versão 1.32, 1997) disponível gratuitamente no sítio <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>. A diversidade gênica é uma medida de variação

gênica, similar a heterozigose para *locus* do genoma de uma população (Nei, 1973).

5. Para avaliar se há ou não diferença entre as proporções obtidas quanto às contribuições parentais na constituição das populações do Distrito Federal e Goiás, foi utilizado o teste z. O teste foi realizado utilizando uma planilha em Excel, correlacionando as proporções par a par entre cada origem geográfica. Para todos os casos foi considerado como hipótese nula a igualdade entre as proporções e um nível de significância de 5%.

Cromossomo Y

Como já explicitado, no presente trabalho foram investigadas duas categorias de marcadores genéticos - binários (a inserção *AluYAP* e do tipo SNPs) e microssatélites, todos situados na região não recombinante do cromossomo Y. Por possuírem histórias evolutivas distintas, em decorrência das diferenças nas taxas de mutação (Jobling e Tyler-Smith, 1995), esses marcadores foram analisados separadamente e posteriormente em conjunto. A inserção *AluYAP* foi analisada tanto dentro do banco de dados dos SNPs quanto dos microssatélites, para compor os haplótipos desses marcadores.

Neste estudo buscou-se averiguar o grau de diferenciação entre e dentro das populações estudadas em relação à linhagem patrilinear. Ou seja, buscou-se investigar a ocorrência de efeito do fundador masculino e de fluxo gênico para estas populações.

Dois tipos de dados foram utilizados para testar a hipótese de existência de diferenciação genética entre as populações do Estado de Goiás e do Distrito Federal: frequência de alelos e de haplótipos, estes últimos definidos com base na consolidação dos alelos determinados para cada *locus*. O valor crítico de p considerado no teste foi de 0,05.

a) Marcadores binários:

Com relação aos marcadores de eventos únicos do cromossomo Y, os resultados estatísticos consideram o Estado ancestral e o derivado para determinar os haplótipos e, conseqüentemente, formar os haplogrupos,

específicos de cada região no Mundo. A nomenclatura dos haplogrupos do cromossomo Y seguiu a classificação adotada pelo Consórcio do Cromossomo Y - *The Y-Chromosome Consortium* (YCC, 2002).

Baseando-se nos estados alélicos ancestral e derivado para todos os marcadores do tipo SNPs, construímos manualmente uma árvore (*network*) (Figura IV.3) que reflete a relação entre os diferentes haplogrupos observados nas populações do Estado de Goiás e Distrito Federal. Para essa classificação foi denominado como zero (0) o Estado alélico ancestral e como um (1) o alelo derivado.

Para avaliar a composição das populações quanto à origem geográfica baseada nos haplogrupos do cromossomo Y, foi realizado o teste z. Para efeito de comparação, agrupou-se os dados no conjunto amostral Centro-Oeste brasileiro em função de não existir diferenças entre elas.

Para a análise de mistura dos marcadores binários, a distribuição geográfica dos haplogrupos foi considerada da seguinte forma: o haplogrupo F*, de distribuição ampla mundial (YCC, 2002) caracterizou-se europeu porque em nosso país não houve migração significativa do Oriente Médio e Índia; o haplogrupo P* também foi considerado europeu porque em nossa colonização não tivemos migração importante de países como Norte da África e Ásia.

Na análise utilizando o teste z, a correlação das proporções par a par foi realizada entre cada origem geográfica. Por exemplo, foi comparada a proporção de europeus em Goiás com a do Distrito Federal e, da mesma forma entre as proporções de africanos e ameríndios.

b) Marcadores do tipo STRs:

Além das análises em comum para todos os marcadores analisados nesse estudo, realizamos uma análise de variância molecular (AMOVA). Com o resultado obtido, foi construída uma matriz de comparação par a par para cada marcador STR Y-específico. Essa comparação foi realizada utilizando os dados da literatura (Grattapaglia *et al.*, 2005), correlacionando as cinco regiões brasileiras.

As frequências alélicas parentais utilizadas no cálculo da estimativa de mistura genética para o conjunto de cinco marcadores genéticos uniparentais (STRs e *AluYAP*) estão ilustradas na Tabela III.8.

5.2 DNA mitocondrial

Conforme relatada anteriormente, a análise estatística dos resultados dos marcadores do DNA mitocondrial foi realizada de forma semelhante aos marcadores do cromossomo Y. Para a análise de mistura foi realizado o agrupamento de acordo com a origem geográfica. Todos os haplogrupos característicos de linhagem africana foram agrupados como africanos; os característicos de linhagens européias, como europeus. Somente os haplogrupos de linhagem ameríndia não foram agrupados visto que, tanto em nossa análise, quanto na de Alves-Silva *et al.* (2000), todos os haplogrupos foram observados.

Os dados das populações aqui analisadas foram também agrupados em dados da região Centro-Oeste em decorrência da não diferença entre as populações do Distrito Federal e Goiás. Após o agrupamento, foi realizada uma comparação par a par dos dados de DNA mitocondrial gerados no presente estudo com dados da literatura (Alves-Silva *et al.*, 2000) das quatro regiões brasileiras e o Brasil como um todo.

Tabela III.8: Frequências alélicas parentais utilizadas nos cálculos das estimativas de contribuições étnicas para a constituição da população da região Centro-Oeste brasileira.

Marcador	Alelos	População Parental		
		Europeu ¹	Africano ²	Ameríndio ³
DYS19	12	0,000	0,010	0,000
	13	0,121	0,078	0,980
	14	0,585	0,165	0,013
	15	0,227	0,494	0,007
	16	0,053	0,126	0,000
	17	0,014	0,117	0,000
	18	0,000	0,010	0,000
N		207	103	150
DYS390	20	0,000	0,010	0,000
	21	0,029	0,639	0,014
	22	0,130	0,078	0,000
	23	0,184	0,078	0,212
	24	0,531	0,146	0,514
	25	0,121	0,039	0,253
	26	0,000	0,010	0,007
27	0,005	0,000	0,000	
N		207	103	150
DYS391	09	0,087	0,010	0,007
	10	0,493	0,602	0,941
	11	0,406	0,359	0,052
	12	0,014	0,029	0,000
N		207	103	150
DYS393	12	0,178	0,058	0,033
	13	0,682	0,573	0,735
	14	0,135	0,252	0,113
	15	0,005	0,107	0,119
	16	0,000	0,000	0,000
17	0,000	0,010	0,000	
N		207	103	150
YAP ⁴	Presença	0,070	0,740	0,007
	Ausência	0,930	0,260	0,993
N		192	611	150

¹ Carvalho *et al.*, 2003.

² Trovoada *et al.*, 2003.

³ Wanderley-Santos, 2001.

⁴ Hammer, 1994.

IV. RESULTADOS

Amostras de duas populações – Goiás (GO) e Distrito Federal (DF) - pertencentes a região Centro-Oeste brasileira foram investigadas quanto a marcadores uniparentais situados no cromossomo Y e no DNA mitocondrial. Os resultados foram divididos para apresentação em: contribuição uniparental masculina, contribuição uniparental feminina e comparação dos dados gerados por esses marcadores uniparentais.

IV.1. Contribuição uniparental masculina

A contribuição uniparental masculina foi analisada para as populações do Estado de Goiás e do Distrito Federal utilizando 16 marcadores genéticos situados na região não-recombinante do cromossomo Y, sendo que 12 eram marcadores binários (uma inserção Alu e 11 SNPs) e 4 do tipo microsatélites.

IV.1.1. Inserção AluYAP

A frequência da inserção *AluYAP* nas duas populações está apresentada na Tabela IV.1. O alelo YAP^- (ausência de inserção) foi observado em 72,9% da população de Goiás e em 84,5% do Distrito Federal. De acordo com a AMOVA, não há diferença estatisticamente significativa entre as duas populações ($F_{st}=0,029$; $p=0,076\pm 0,003$) com relação a esse marcador. A maior parte da variação foi encontrada dentro das populações (97,31%).

IV.1.2. Marcadores binários do tipo SNPs situados no cromossomo

Y

IV.1.2.1. Caracterização genética populacional por locus

Na Tabela IV.1 e na Figura IV.1 estão apresentadas as distribuições das freqüências alélicas dos 11 marcadores binários do tipo SNPs - 92R7, M89, M213, P2, SRY2627, SRY4064, M2, M3, M60, M34, P3 – nas populações de Goiás e do Distrito Federal. Foram encontradas similaridades entre as freqüências alélicas observadas nas duas populações para a maioria dos *loci* analisados.

Considerando como *locus* polimórfico aquele em que o alelo mais comum tenha uma freqüência máxima de 99%, a população de Goiás apresentou uma menor porcentagem de *loci* polimórficos (58,3%) do que o Distrito Federal (75,0%), conforme pode ser verificado na Tabela IV.1. Ambas as populações apresentaram monomorfismo para os *loci* M60, M34 e P3 enquanto que o *locus* SRY2627 apresentou-se monomórfico quanto ao alelo ancestral no Estado de Goiás.

A diversidade gênica (Nei, 1973) observada considerando os doze *loci* bialélicos analisados (incluindo a inserção *AluYAP*) foi similar nas duas populações (Distrito Federal - $h^* = 0,164 \pm 0,153$; Goiás- $h^* = 0,216 \pm 0,206$). Dentre os marcadores que apresentaram polimorfismo, a maior diversidade gênica foi observada para o *locus* 92R7 em ambas as populações e a menor para o M3 no Estado de Goiás e M2 no Distrito Federal (Tabela IV.1).

O teste de heterogeneidade mostrou que as populações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas freqüências alélicas para a maioria dos *loci*. Exceções foram observadas quanto aos *loci* P2, SRY 2627 e SRY4064 que apresentaram valores de χ^2 maior que 3,84 ($p < 0,05$).

Tabela IV.1: Frequência dos alelos ancestrais dos marcadores genéticos do tipo SNP situados no cromossomo Y analisados nas populações do Estado de Goiás e Distrito Federal, parâmetros de variabilidade genética (índice de diversidade gênica (Nei, 1973) e % loci polimórfico) e teste de heterogeneidade intra *locus*.

<i>Locus</i>	<i>Goiás</i>		<i>Distrito Federal</i>		<i>Teste de heterogeneidade</i>	
	<i>N=129</i>	<i>h*</i>	<i>N=71</i>	<i>h*</i>	χ^2_1	<i>p</i>
92R7	0,496	0,500	0,535	0,498	0,280	0,597
M89	0,271	0,395	0,155	0,261	3,502	0,061
M213	0,271	0,395	0,155	0,261	3,502	0,061
P2	0,760	0,365	0,887	0,200	4,752	0,029***
SRY2627	--	--	0,916	0,155	11,239	0,0008***
SRY4064	0,729	0,395	0,859	0,242	4,470	0,034***
M2	0,930	0,129	0,972	0,055	1,525	0,217
M3	0,992	0,015	0,986	0,278	0,186	0,667
YAP	0,729	0,395	0,845	0,262	3,503	0,061
M60	-	-	-	-	0,000	1,000
M34	-	-	-	-	0,000	1,000
P3	-	-	-	-	0,000	1,000
% <i>loci</i> polimórfico	58,33	-	75,00	-		
<i>h**</i> (DP)	-	0,216 (0,206)	-	0,164 (0,153)		

*h = diversidade gênica (Nei 1973);** diversidade gênica média e, entre parênteses, Desvio Padrão (DP) ;*** valores significativos ao nível de 5%

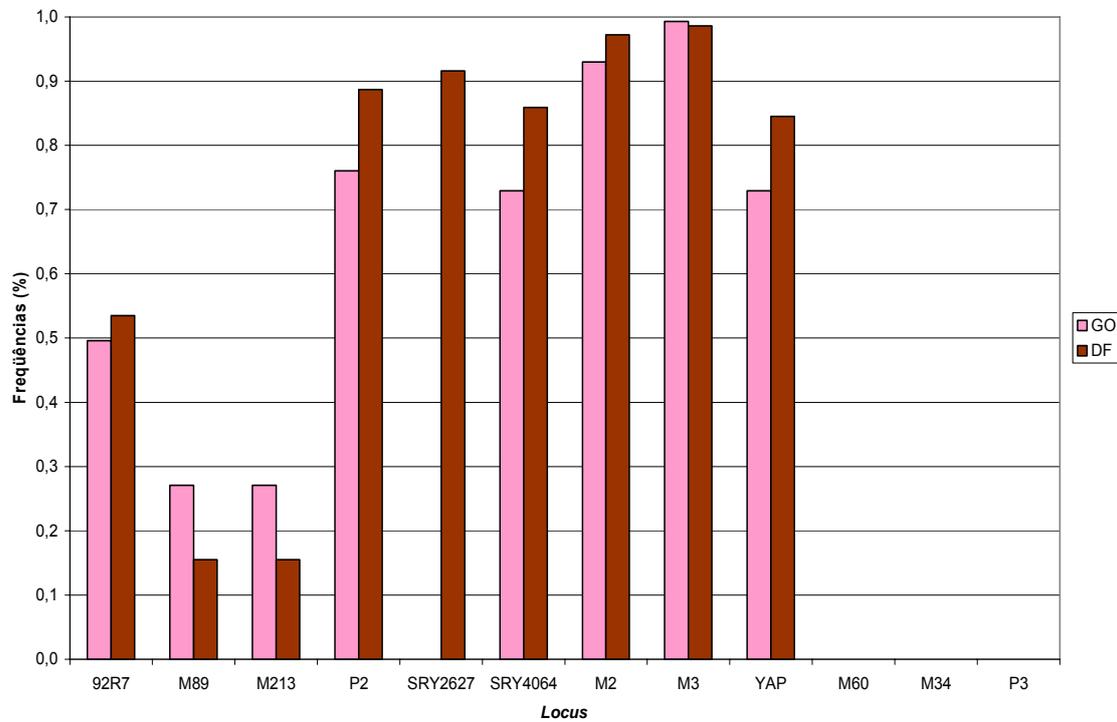


Figura IV.1: Distribuição das freqüências dos alelos ancestrais dos marcadores genéticos do tipo SNP situados no cromossomo Y nas populações do Estado de Goiás e Distrito Federal

IV.1.2.2. Caracterização genética populacional por haplótipos e haplogrupos

Os marcadores bialélicos analisados localizam-se na região não recombinante do cromossomo Y. De acordo com a literatura (YCC, 2002), os marcadores bialélicos permitem a identificação dos haplogrupos do cromossomo Y, o que possibilita a identificação da origem geográfica do indivíduo. A Tabela IV.2 e a Figura IV.2 apresentam a distribuição dos haplogrupos observados, gerados a partir da combinação dos dados dos doze marcadores binários Y-específicos, nas populações de Goiás e Distrito Federal e no Centro-Oeste (conjunto amostral total). A distribuição mundial dos haplogrupos Y-específicos observados no presente trabalho estão também apresentadas nessa Tabela com o objetivo de identificar a origem geográfica dos mesmos nas populações amostradas.

Foram identificados seis haplogrupos em Goiás, todos compartilhados com o Distrito Federal. Adicionalmente, foram observados dois outros haplogrupos - R1b8 e D1 – no Distrito Federal, totalizando oito. Em Goiás o mais freqüente foi o P* (49,6%), seguido pelo F* (38,0%), somando 87,6% dos indivíduos analisados. No Distrito Federal 74,6% dos indivíduos pertencem a um desses haplogrupos. Porém, diferentemente de Goiás, a distribuição destes dois haplogrupos foi quase eqüitativa (Tabela IV.2). A diversidade haplotípica (diversidade gênica de Nei, 1973) foi similar nas duas populações ($h_{DF} = 0,697 \pm 0,034$; $h_{GO} = 0,670 \pm 0,029$).

Com relação à divergência populacional, analisada por AMOVA, a maior fonte de variação foi encontrada dentro das populações (98,03%). Como evidenciado pela análise de F_{st} , não há diferença entre as populações de Goiás e Distrito Federal ($F_{st} = 0,020$; $p = 0,068 \pm 0,002$).

Tabela IV.2: Haplogrupos do cromossomo Y observados e respectivas freqüências nas populações de Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste e populações parentais.

Haplogrupo [#]	Goiás	Distrito Federal	Centro-Oeste	População parental ^{##}
P* ^{###}	0,496	0,366	0,450	Europa (excluindo Q* e R1b8)
F*	0,225	0,380	0,280	Europa
E3*	0,170	0,084	0,140	Mediterrâneo
R1b8	-	0,084	0,030	Europa (em especial Bascos e Catalães)
E*	0,031	0,029	0,030	África Subsaariana
E3a*	0,070	0,029	0,055	África Subsaariana
Q3*	0,008	0,014	0,010	América
D1	-	0,014	0,005	Japão

[#] Classificação dos haplogrupos de acordo com o Consórcio do Cromossomo Y (2002).

^{##}População parental: população em que o haplogrupo considerado é encontrado e que participou da constituição da população brasileira de forma significativa.

^{###} Os haplogrupos Q3* e R1b8 pertencem ao haplogrupos P*. No presente trabalho os indivíduos portando essas mutações foram discriminados e, portanto, excluídos da soma dos haplogrupos mais amplos.

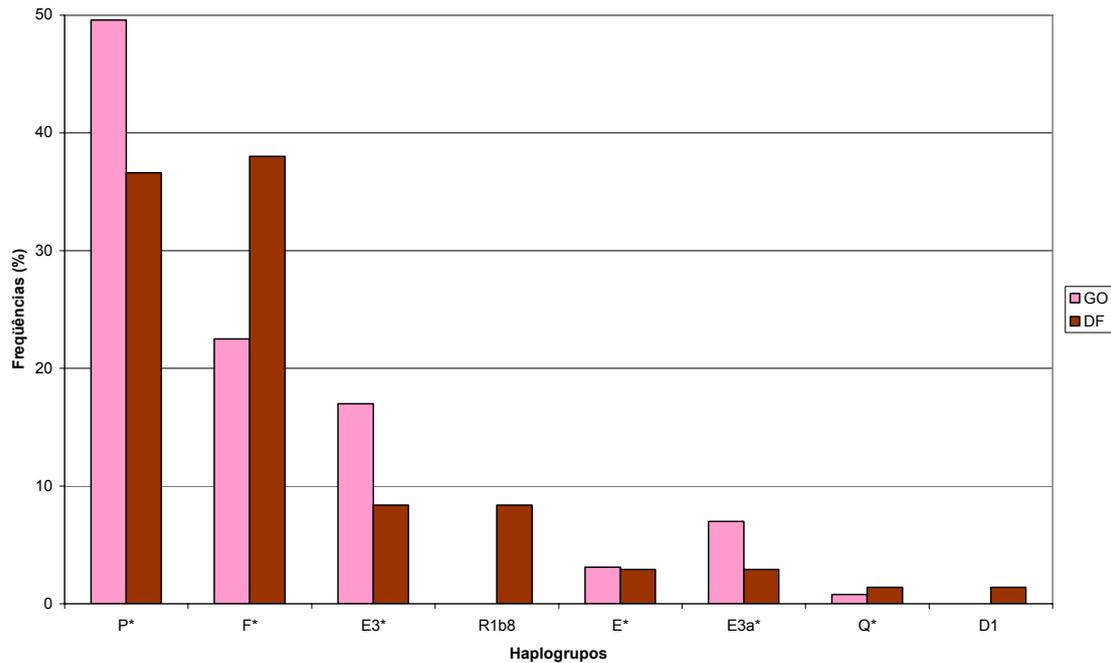


Figura IV.2: Distribuição dos haplogrupos do cromossomo Y nas populações de Goiás e Distrito Federal.

IV.1.2.3. Análise de mistura: marcadores binários Y-específicos

A Tabela IV.3 apresenta a estimativa de composição quanto a origem geográfica das populações de Goiás e Distrito Federal e comparação das mesmas utilizando o teste z. A contribuição parental principal foi a europeia para ambas as populações, seguidas da africana e uma pequena contribuição ameríndia. A composição das populações é similar em relação à origem europeia ($p=0,295$) e à africana ($p=0,142$), mas uma diferença estatisticamente significativa foi observada com relação à contribuição ameríndia/asiática ($p<0,05$).

Considerando o conjunto amostral, visto que não há diferença entre as estimativas nas duas populações analisadas, foi observado que a maioria, 90% dos homens da amostra da região Centro-Oeste, apresentam linhagens europeias. As linhagens africanas perfizeram 8,5% do total, sendo que 1,5% foi contribuição ameríndia e asiática.

Tabela IV.3: Estimativas de composição quanto à origem geográfica das populações de Goiás e Distrito Federal e do conjunto amostral (Centro-Oeste brasileiro) baseada nos haplogrupos do cromossomo Y e comparação das estimativas obtidas para as duas populações (teste z).

Origem Geográfica	Goiás	Distrito Federal	z (p)	Centro-Oeste
Europa	0,892	0,916	0,54 (0,295)	0,900
África	0,100	0,056	1,07 (0,142)	0,085
Ásia e América	0,008	0,028	2,67 (0,004)	0,015

IV.1.2.4. Análise Filogeográfica

Combinando a distribuição dos alelos dos 11 marcadores binários e uma inserção *AluYAP*, foi possível classificar os haplótipos encontrados em oito haplogrupos diferentes. A Figura IV.3 mostra a relação entre os haplogrupos observados nas duas populações analisadas. Cada círculo representa um haplogrupo e tem uma área proporcional à sua frequência. Os nomes dos haplogrupos estão representados nos braços. As diferenças observadas entre as duas árvores (*network*) são decorrentes da presença de haplogrupos exclusivos na população do Distrito Federal e da diferença na frequência de observação dos haplogrupos.

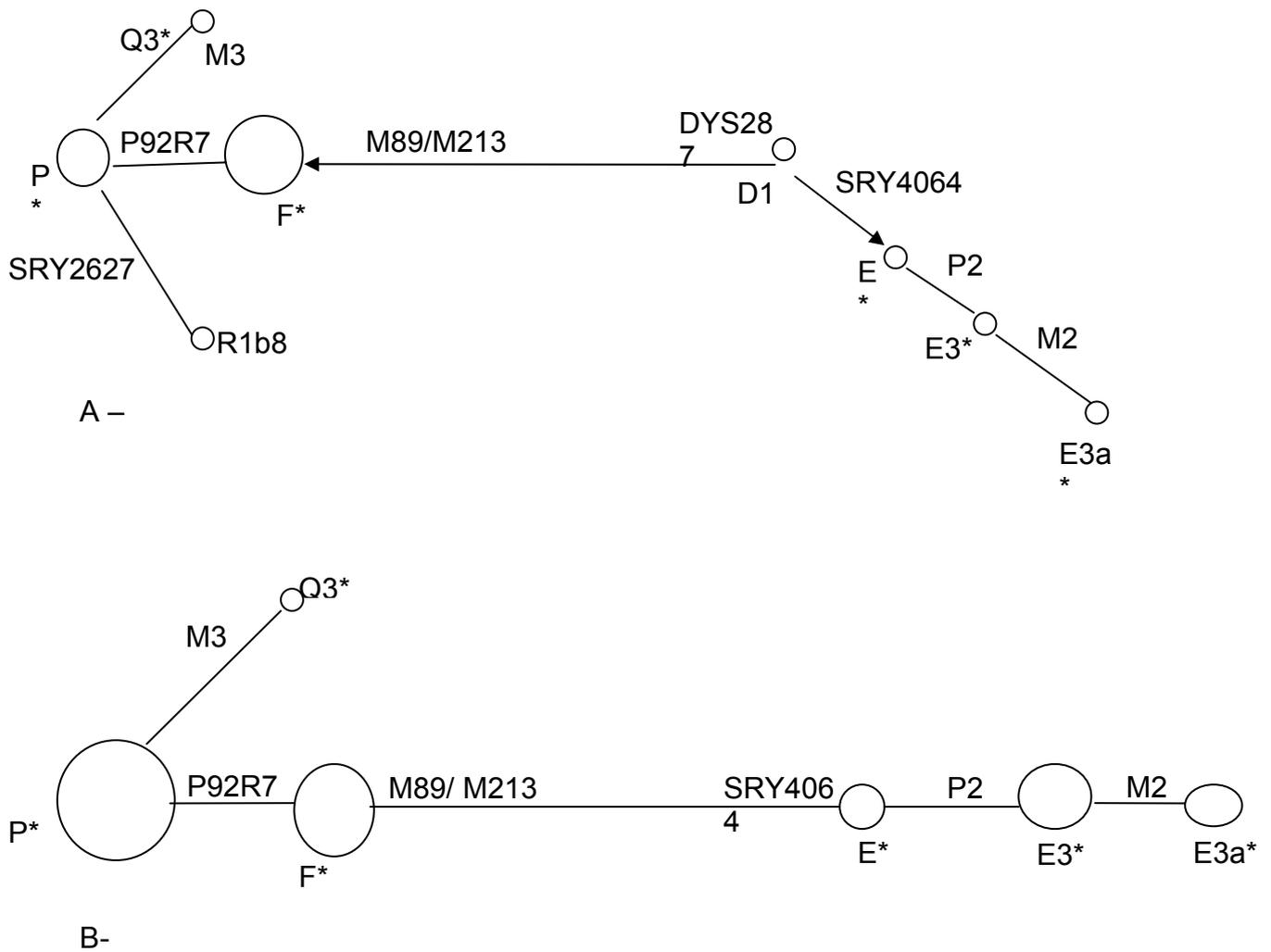


Figura IV.3: Relacionamento dos haplogrupos do cromossomo Y observados nas populações do Distrito Federal (A) e Goiás (B). Os haplogrupos são representados pelos círculos (o diâmetro do círculo é proporcional à frequência dos haplogrupos) e estão indicados ao lado dos mesmos; as mutações estão indicadas ao lado dos ramos.

IV.1.3. Microssatélites situados no cromossomo Y

IV.1.3.1. Caracterização genética populacional por *locus*

A Tabela IV.4 apresenta a distribuição das freqüências alélicas dos quatro microssatélites do cromossomo Y nas populações de Goiás e Distrito Federal aqui analisadas. Dados da literatura (Grattapaglia *et al.*, 2005) referentes à análise dos mesmos marcadores em populações urbanas das cinco regiões geopolíticas brasileiras também estão apresentados na Tabela. As figuras IV.4 a IV.7 apresentam a distribuição dos alelos dos marcadores do tipo microssatélites nas populações em estudo e nas principais populações parentais brasileiras.

Foram encontrados 4,25 e 3,50 alelos em média nas amostras do Estado de Goiás e Distrito Federal, respectivamente, sendo que foi observado de 3 (DYS19 e DYS391 no Distrito Federal) a 5 (DYS19 em Goiás) alelos em cada população para cada marcador (Tabela IV.4).

Para o marcador DYS19, foram encontrados cinco alelos na população de Goiás e três no Distrito Federal. O alelo modal para ambas as populações foi o DYS19*14. A Figura IV.4 mostra que esse alelo modal é o mesmo encontrado na população parental européia. Os alelos DYS19*16 e DYS19*17 foram identificados apenas na população do Estado de Goiás e mostraram baixa freqüência.

Em relação ao marcador DYS390 (Figura IV.5), as duas populações apresentaram quatro alelos. Ambas as populações da região Centro-Oeste apresentaram o alelo DYS390*24 como modal, semelhante a duas das populações parentais - européia e ameríndia.

Já o marcador DYS391 apresentou quatro alternativas alélicas para a população do Estado de Goiás e três para o Distrito Federal. Ambas as populações apresentaram o alelo DYS391*10, o mesmo descrito para as três populações parentais principais (Figura IV.6).

Quanto ao *loci* DYS393 (Figura IV.7), foram identificados quatro diferentes alelos nas duas populações. O alelo modal, o DYS393*13, é o mesmo tanto para as populações analisadas no presente trabalho quanto para as populações parentais. O alelo DYS393*15 foi o menos freqüente.

Tabela IV.4 - Distribuição das frequências alélicas de quatro microssatélites do cromossomo Y nas populações de Goiás e Distrito Federal (DF) e em cinco regiões geográficas brasileiras (Grattapaglia *et al.*, 2005) (N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul; CO = Centro-Oeste)

Locus Alelos	Presente estudo						Grattapaglia <i>et al.</i> (2005)*												
	GO		DF		CO		N		NE		CO		SE		S		Brasil		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
DYS19																			
12	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,024	-	-	-	-	-	-	01	0,005	
13	29	0,224	16	0,225	45	0,225	01	0,040	10	0,238	10	0,208	06	0,167	05	0,106	32	0,162	
14	70	0,543	34	0,479	104	0,520	17	0,680	18	0,429	25	0,521	20	0,556	32	0,681	112	0,566	
15	27	0,209	21	0,296	48	0,240	03	0,120	12	0,286	07	0,146	10	0,278	07	0,149	39	0,197	
16	01	0,008	-	-	01	0,005	04	0,160	01	0,024	04	0,083	-	-	02	0,043	11	0,056	
17	02	0,016	-	-	02	0,010	-	-	-	-	02	0,042	-	-	01	0,021	03	0,015	
Total	129		71		200		25		42		48		36		47		198		
DYS390																			
21	-	-	-	-	-	-	02	0,080	01	0,024	03	0,063	01	0,028	-	-	07	0,035	
22	12	0,093	06	0,085	18	0,090	04	0,160	03	0,071	03	0,063	10	0,278	02	0,043	22	0,111	
23	24	0,186	23	0,324	47	0,235	03	0,120	08	0,190	12	0,250	06	0,167	09	0,191	38	0,192	
24	86	0,667	37	0,521	123	0,615	15	0,600	23	0,548	23	0,479	16	0,444	30	0,638	107	0,540	
25	07	0,054	05	0,070	12	0,060	01	0,040	06	0,143	07	0,146	02	0,056	01	0,021	17	0,086	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,024	-	-	01	0,028	05	0,106	07	0,035	

Locus	Presente estudo						Grattapaglia <i>et al.</i> (2005)*											
	GO		DF		CO		N		NE		CO		SE		S		Brasil	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Total	129		71		200		25		42		48		36		47		198	
DYS391																		
8	02	0,016	-	-	02	0,010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	36	0,278	07	0,099	43	0,215	-	-	01	0,024	02	0,042	01	0,028	-	-	04	0,020
10	49	0,380	35	0,493	84	0,420	15	0,600	18	0,429	28	0,583	21	0,583	23	0,489	105	0,530
11	42	0,326	29	0,408	71	0,355	10	0,400	23	0,548	17	0,354	13	0,361	23	0,489	86	0,434
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,021	01	0,028	01	0,021	03	0,015
Total	129		71		200		25		42		48		36		47		198	
DYS393																		
11	-	-	-	-	-	-	01	0,040	-	-	-	-	01	0,028	02	0,043	04	0,020
12	11	0,085	11	0,155	22	0,110	03	0,120	08	0,190	14	0,292	08	0,222	09	0,191	42	0,212
13	89	0,690	43	0,606	132	0,660	15	0,600	30	0,714	29	0,604	23	0,639	27	0,574	124	0,626
14	26	0,202	11	0,155	37	0,185	05	0,200	04	0,095	04	0,083	04	0,111	07	0,149	24	0,121
15	03	0,023	06	0,084	09	0,045	01	0,040	-	-	01	0,021	-	-	02	0,043	04	0,02
Total	129		71		200		25		42		48		36		47		198	

* N de cada alelo foi estimado a partir da frequência alélica e N total.

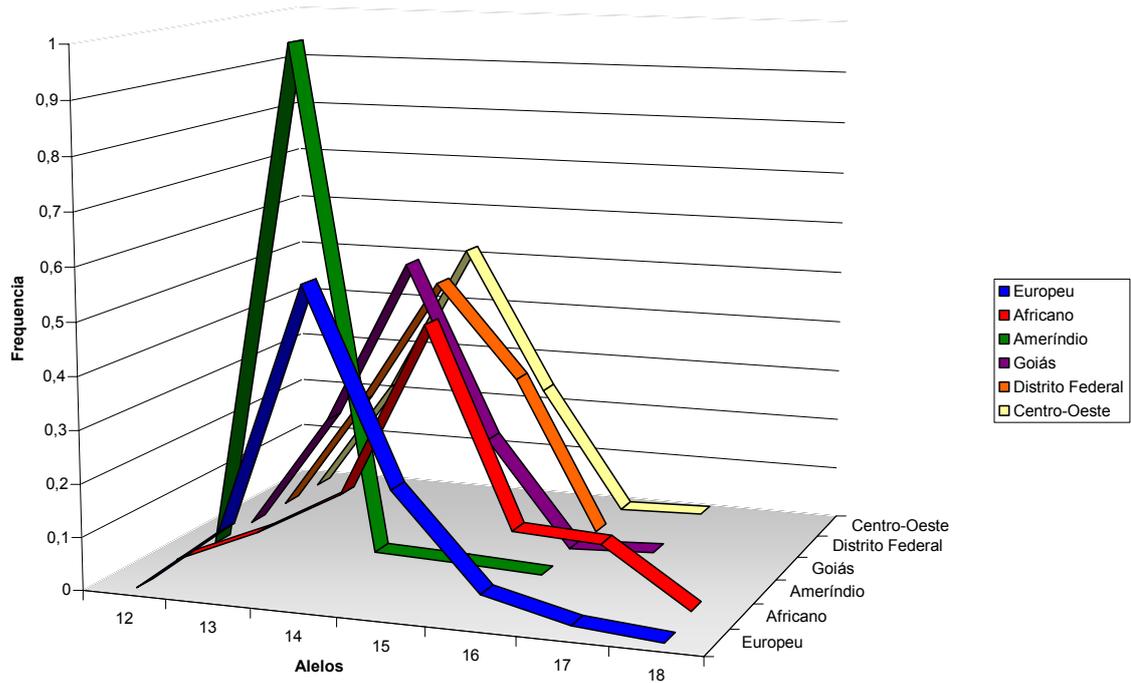


Figura IV.4: Distribuição de freqüências alélicas para o marcador DYS19 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste.

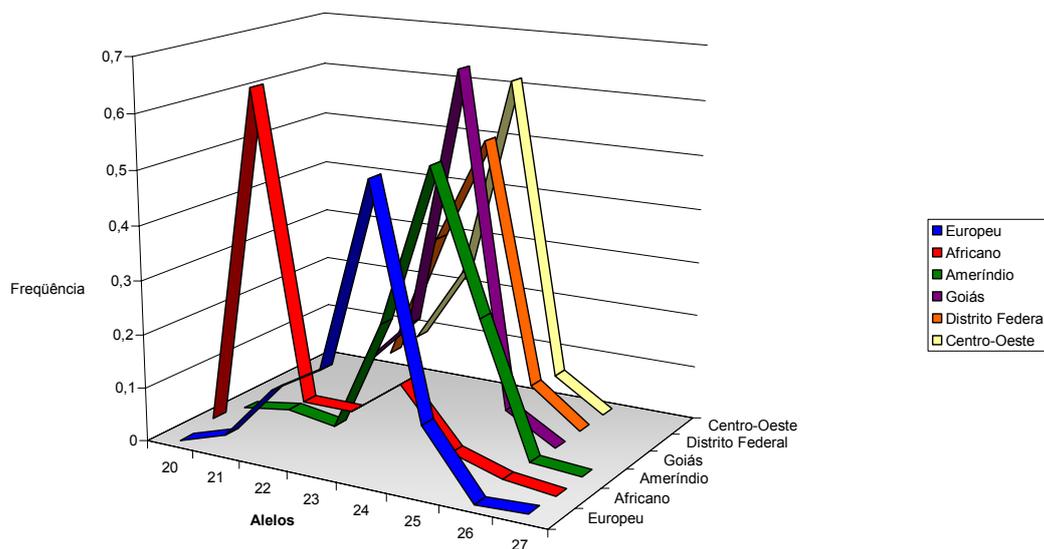


Figura IV.5: Distribuição de freqüências alélicas para o marcador DYS390 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste.

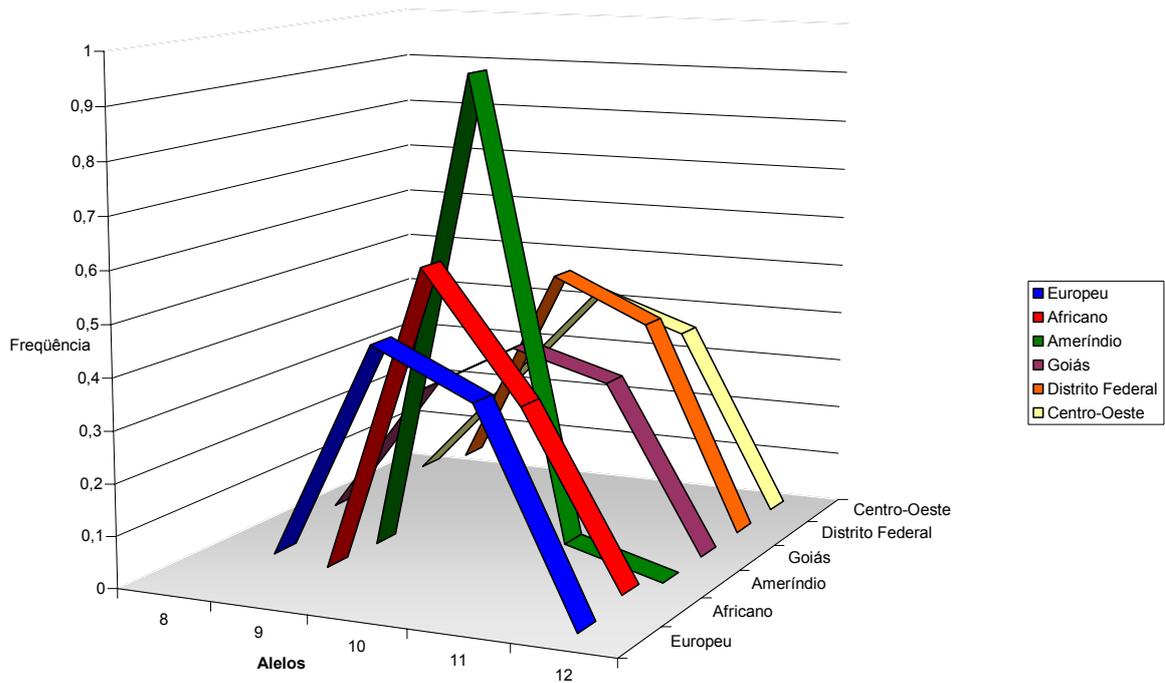


Figura IV.6: Distribuição de frequências alélicas para o marcador DYS391 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste

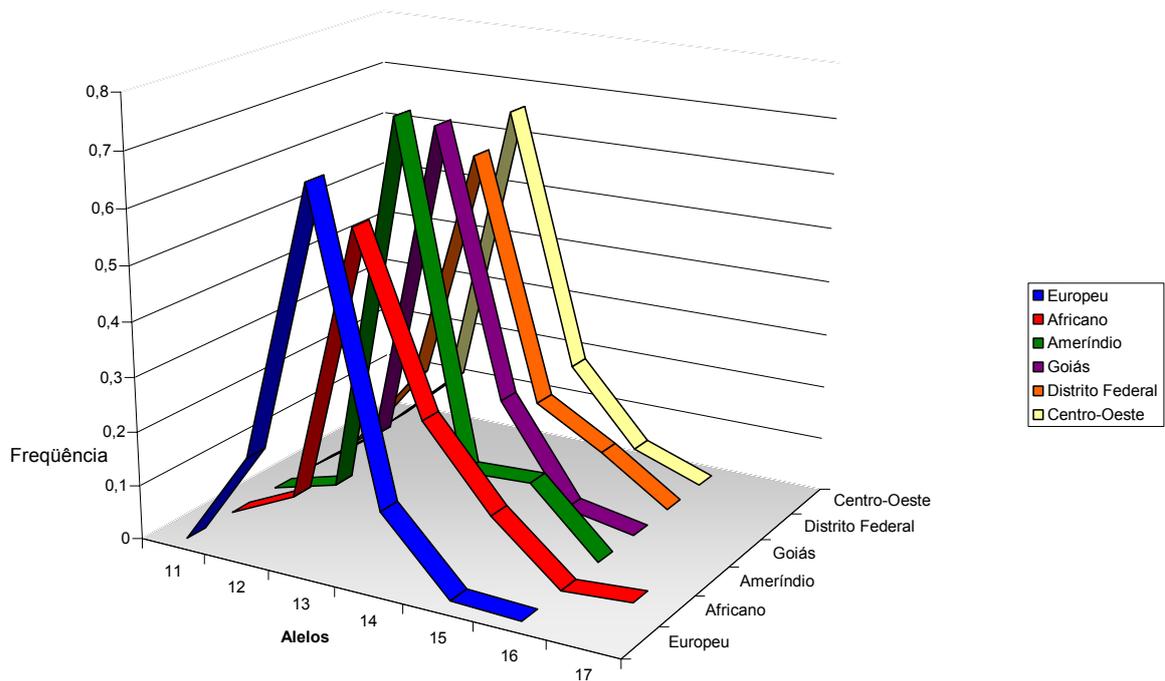


Figura IV.7: Distribuição de frequências alélicas para o marcador DYS393 nas populações parentais e em Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste

De acordo com a análise de variância molecular – AMOVA, utilizando os loci do tipo marcadores STR, foi observado que há uma diferença estatisticamente significativa ($F_{st}=0,143$; $p=0,016\pm 0,001$) entre as populações de Goiás e Distrito Federal, indicando subestruturação populacional. Essa diferença observada entre as populações é reflexo da diferença estatisticamente significativa quanto às frequências alélicas observadas para os loci DYS390 ($F_{st}=0,025$, $p=0,033$) e DYS391 ($F_{st}=0,029$, $p=0,027$). Os resultados mostraram uma alta variabilidade dentro das populações (98,56%).

As Figuras IV.8 a IV.11 mostram a análise de variância molecular (AMOVA) entre o conjunto amostral do Centro-Oeste aqui apresentado e os dados publicados por Grattapaglia *et al.* (2005) utilizando os loci STRs - DYS19, DYS390, DYS391 e DYS393.

O marcador DYS19 foi o que apresentou o maior número de diferenças entre as populações dentre os marcadores aqui analisados. A amostra do Centro-Oeste aqui analisada mostrou diferença estatisticamente significativa com a população do Norte e Sul. A região Sudeste e o conjunto amostral “Brasil” não apresentaram diferenças com nenhuma outra região brasileira. A região Sul foi a que apresentou o maior número de diferenças significativas com as outras regiões (Norte, Centro-Oeste do presente estudo e Nordeste).

Com relação ao marcador DYS390, a amostra analisada no presente estudo não apresentou diferença estatisticamente significativa com a maioria das outras regiões, com exceção da região Sudeste. A comparação das demais regiões apresentou diferença estatisticamente significante entre a região Sul e a Sudeste.

Já o marcador DYS391 apresentou o maior número de diferenças estatisticamente significativas na comparação entre a amostra do Centro-Oeste e o publicado por Grattapaglia *et al.* (2005), sendo que não foi observada diferença apenas com as regiões Sudeste e Norte.

O marcador DYS393 apresentou-se semelhante aos outros marcadores, ou seja, sem diferenças estatisticamente significativas com a maioria das regiões (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste).

	Presente estudo	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Brasil
Presente estudo	*****	0,028±0,002	0,534±0,005	0,362±0,005	0,750±0,005	0,041±0,001	0,168±0,004
Norte	0,055	*****	0,019±0,001	0,177±0,003	0,106±0,003	0,607±0,005	0,053±0,022
Nordeste	-0,006	0,080	*****	0,003±0,000	0,512±0,005	0,000±0,000	0,126±0,004
Centro-Oeste	-0,000	0,020	0,003	*****	0,395±0,004	0,197±0,003	0,235±0,004
Sudeste	-0,012	0,037	-0,087	-0,002	*****	0,235±0,004	0,652±0,005
Sul	0,028	-0,012	0,058	0,011	0,010	*****	0,291±0,004
Brasil	0,004	0,015	0,012	-0,006	-0,008	0,003	*****

Figura IV.8: Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método Fst, para o marcador do tipo STR Y-específico DYS19. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia et al., 2005). Abaixo valores de Fst e acima valores de p; Número de permutações: 10100.

	Presente estudo	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Brasil
Presente estudo	*****	0,348±0,004	0,413±0,005	0,110±0,003	0,022±0,001	0,278±0,004	0,143±0,004
Norte	-0,000	*****	0,528±0,004	0,265±0,005	0,401±0,005	0,332±0,004	0,650±0,005
Nordeste	-0,001	-0,009	*****	0,814±0,004	0,146±0,003	0,297±0,004	0,883±0,003
Centro-Oeste	0,013	0,009	-0,015	*****	0,118±0,003	0,079±0,002	0,443±0,005
Sudeste	0,042	-0,001	0,019	0,021	*****	0,024±0,001	0,144±0,003
Sul	0,003	0,003	0,003	0,026	0,054	*****	0,200±0,004
Brasil	0,004	-0,010	-0,010	-0,002	0,013	0,006	*****

Figura IV.9: Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} , para o marcador do tipo STR Y-específico DYS390. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia et al., 2005). Abaixo valores de F_{st} e acima valores de p ; Número de permutações: 10100.

	Presente estudo	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Brasil
Presente estudo	*****	0,063±0,002	0,020±0,001	0,030±0,001	0,050±0,002	0,017±0,001	0,000±0,000
Norte	0,039	*****	0,152±0,003	0,816±0,004	0,100±0,000	0,463±0,005	0,702±0,005
Nordeste	0,042	0,018	*****	0,107±0,003	0,136±0,003	0,600±0,005	0,226±0,004
Centro-Oeste	0,031	-0,027	0,034	*****	0,100±0,000	0,271±0,005	0,400±0,004
Sudeste	0,032	-0,032	0,029	-0,025	*****	0,318±0,005	0,551±0,005
Sul	0,040	-0,011	-0,015	0,006	-0,000	*****	0,615±0,004
Brasil	0,041	-0,016	0,008	-0,004	-0,009	-0,008	*****

Figura IV.10: Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método Fst, para o marcador do tipo STR Y-específico DYS391. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia et al., 2005). Abaixo valores de Fst e acima valores de p; Número de permutações: 10100.

	Presente estudo	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul	Brasil
Presente estudo	*****	0,850±0,004	0,255±0,004	0,033±0,002	0,270±0,004	0,283±0,005	0,041±0,002
Norte	-0,018	*****	0,346±0,005	0,274±0,004	0,592±0,005	0,917±0,003	0,538±0,005
Nordeste	0,005	-0,000	*****	0,337±0,005	0,784±0,004	0,350±0,005	0,552±0,005
Centro-Oeste	0,031	0,009	0,000	*****	0,745±0,004	0,502±0,005	0,550±0,005
Sudeste	0,004	-0,015	-0,018	-0,017	*****	0,831±0,004	0,100±0,000
Sul	0,003	-0,024	0,001	-0,006	-0,018	*****	0,769±0,004
Brasil	0,010	-0,008	-0,005	-0,005	0,016	-0,009	*****

Figura IV.11: Matriz de comparação par a par entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} , para o marcador do tipo STR Y-específico DYS393. A população do Centro-Oeste (Presente estudo) é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos que utilizaram um serviço de investigação de paternidade e a população denominada “Brasil” é o conjunto de todas as amostras de paternidade (dados de Grattapaglia *et al.*, 2005). Abaixo valores de F_{st} e acima valores de p ; Número de permutações: 10100.

IV.1.3.2. Caracterização genética populacional por haplótipos e haplogrupos

Os resultados dos haplótipos observados foram categorizados em dois grupos de acordo com o genótipo observado para o *locus* *AluYAP*: YAP^+ (presença de inserção) e YAP^- (ausência de inserção). A ocorrência destes em cada população (compartilhados e não compartilhados) está apresentada na Figura IV.12 e na Tabela IV.5. Os haplótipos, definidos usando os genótipos dos quatro *loci* microssatélites, apresentam a seguinte ordem de registro dos alelos: DYS19, DYS390, DYS391 e DYS393.

Foram identificados 72 haplótipos (YAP/STRs) diferentes para os 200 cromossomos Y analisados, sendo que a maioria é YAP^- (77,8%). A população do Estado de Goiás apresentou 53 haplótipos e a do Distrito Federal, 43. Os valores encontrados de diversidade gênica (haplotípica), segundo Nei (1973), foram elevados: $h = 0,964 \pm 0,007$ para Goiás e $h = 0,976 \pm 0,008$ para o Distrito Federal. Dos haplótipos identificados, 24 foram compartilhados entre as duas populações. Destes, o conjunto gênico mais freqüente em Goiás foi o haplótipo h11 (-/14/24/10/13) e no Distrito Federal, o h13 (-/14/24/11/13).

Na população do Estado de Goiás, 40,3% dos haplótipos do cromossomo Y observados foram exclusivos para esta população, dentre os quais o haplótipo h68 (+/15/24/09/13) foi o mais freqüente (5,4%). Já na população do Distrito Federal, foi observado percentual bem menor de haplótipos exclusivos (26,4%), sendo que os haplótipos h36 (-/15/23/11/13) e h58 (+/13/24/09/13) apresentaram as maiores incidências (4,2%) dentre esses.

Tabela IV.5 – Haplótipos observados em quatro microssatélites situados no cromossomo Y, suas freqüências em cada população e a diversidade haplotípica. Os haplótipos foram divididos em dois grupos YAP e YAP⁺

Haplótipo	Número de repetições STR				Populações			
	DYS19	DYS390	DYS391	DYS393	Goiás (N=129)		Distrito Federal (N=71)	
					N	%	N	%
Grupo YAP -								
01	13	24	10	13	06	0,046	02	0,028
02	13	24	11	13	04	0,031	01	0,014
03	13	24	11	14	03	0,023	02	0,028
04	14	22	11	13	01	0,008	01	0,014
05	14	23	09	13	01	0,008	01	0,014
06	14	23	10	12	03	0,023	01	0,014
07	14	23	10	13	02	0,015	03	0,042
08	14	23	11	13	03	0,023	02	0,028
09	14	24	09	13	10	0,077	01	0,014
10	14	24	10	12	02	0,015	02	0,028
11	14	24	10	13	15	0,116	05	0,070
12	14	24	10	14	02	0,015	02	0,028
13	14	24	11	13	11	0,085	08	0,113
14	14	24	11	14	04	0,031	01	0,014
15	14	25	09	13	01	0,008	01	0,014
16	14	25	10	13	02	0,015	01	0,014
17	15	23	10	13	03	0,023	03	0,042
18	15	24	10	13	02	0,015	02	0,028
19	15	24	11	13	02	0,015	02	0,028
20	15	24	11	14	03	0,023	01	0,014
21	15	24	11	15	01	0,008	01	0,014
22	13	22	11	13	-	-	01	0,014
23	13	23	10	12	-	-	01	0,014
24	13	24	10	12	-	-	01	0,014

Haplótipo	Número de repetições STR				Populações			
	DYS19	DYS390	DYS391	DYS393	Goiás (N=129)		Distrito Federal (N=71)	
					N	%	N	%
25	13	25	10	14	-	-	01	0,014
26	14	22	10	12	-	-	01	0,014
27	14	23	11	12	-	-	01	0,014
28	14	25	10	12	-	-	01	0,014
29	14	25	11	13	-	-	01	0,014
30	15	23	10	14	-	-	02	0,028
31	15	24	10	12	-	-	01	0,014
32	15	23	11	15	-	-	01	0,014
33	15	22	10	15	-	-	01	0,014
34	15	23	10	15	-	-	01	0,014
35	15	23	11	12	-	-	01	0,014
36	15	23	11	13	-	-	03	0,042
37	15	24	11	12	-	-	01	0,014
38	13	23	11	13	01	0,008	-	-
39	13	23	11	14	01	0,008	-	-
40	13	24	08	13	01	0,008	-	-
41	14	22	09	13	01	0,008	-	-
42	14	22	10	13	01	0,008	-	-
43	14	22	11	14	01	0,008	-	-
44	14	23	09	12	01	0,008	-	-
45	14	23	10	14	02	0,015	-	-
46	14	23	11	14	01	0,008	-	-
47	14	24	09	14	02	0,015	-	-
48	14	24	11	12	02	0,015	-	-
49	14	25	09	14	01	0,008	-	-
50	14	25	10	14	01	0,008	-	-
51	15	22	09	13	01	0,008	-	-
52	15	22	10	13	01	0,008	-	-
53	15	23	09	13	01	0,008	-	-
54	15	24	08	12	01	0,008	-	-

Haplótipo	Número de repetições STR				Populações			
	DYS19	DYS390	DYS391	DYS393	Goiás (N=129)		Distrito Federal (N=71)	
					N	%	N	%
55	15	25	11	14	01	0,008	-	-
56	16	22	10	13	01	0,008	-	-
Grupo YAP+								
57	13	23	10	13	04	0,031	02	0,028
58	13	24	09	13	05	0,040	03	0,042
59	15	22	11	15	01	0,008	01	0,014
60	13	23	09	15	-	-	01	0,014
61	13	24	10	14	-	-	01	0,014
62	14	22	10	14	-	-	01	0,014
63	13	22	10	13	01	0,008	-	-
64	13	23	09	13	01	0,008	-	-
65	13	24	09	14	01	0,008	-	-
66	13	24	11	12	01	0,008	-	-
67	15	22	11	12	01	0,008	-	-
68	15	24	09	13	07	0,054	-	-
69	15	24	09	14	01	0,008	-	-
70	15	25	09	14	01	0,008	-	-
71	17	22	09	14	01	0,008	-	-
72	17	22	10	15	01	0,008	-	-
F_{st}	-0,001	0,025	0,029	0,006				
p	0,440	0,033	0,027	0,195				

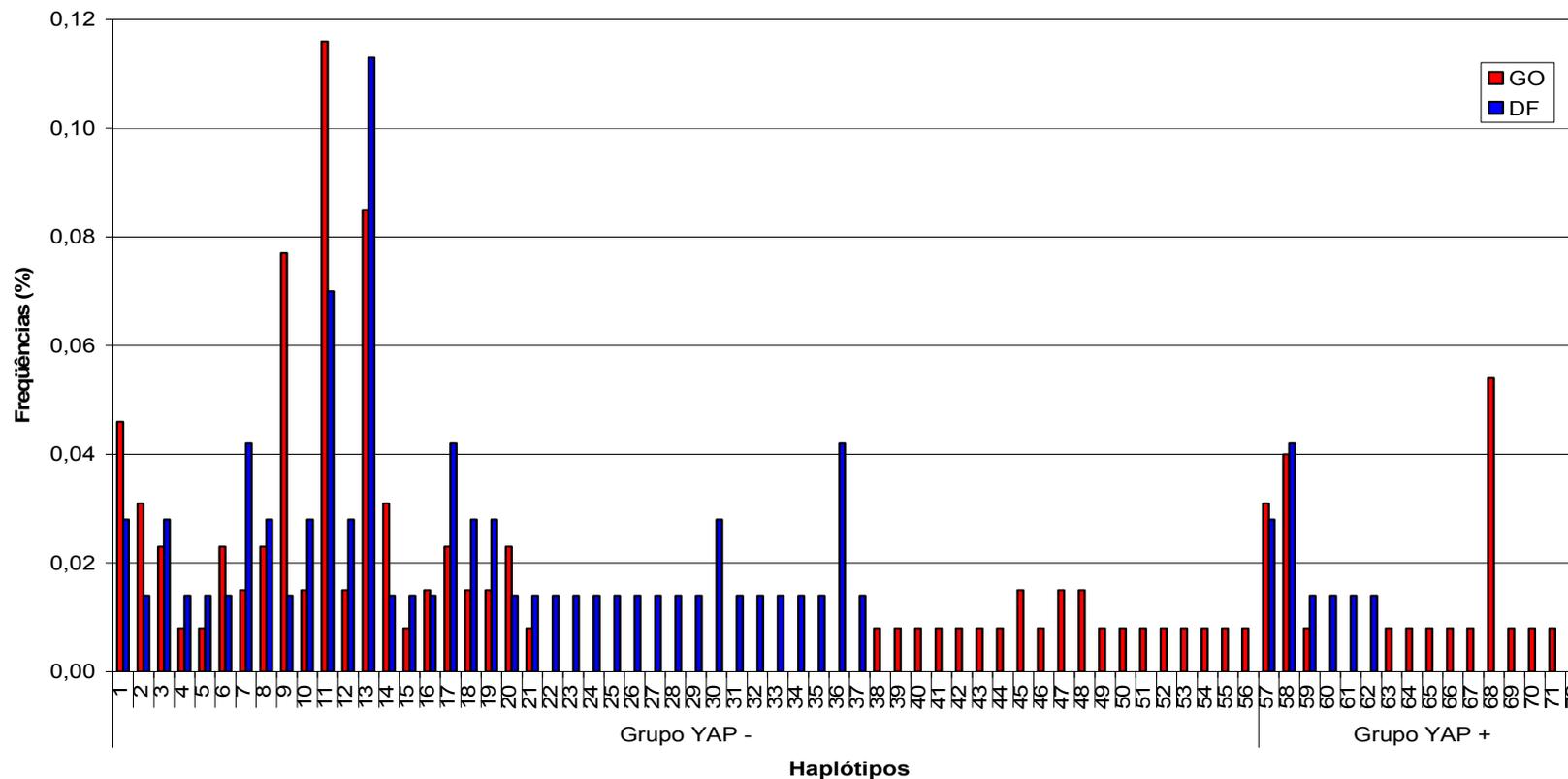


Figura IV.12: Haplótipos de microssatélites do cromossomo Y e suas freq ncias nas popula es de Goiás e Distrito Federal. Os haplótipos foram agrupados em YAP+ e YAP-. Haplótipos compartilhados entre as popula es: 1 a 21 e 57 a 59; Haplótipos YAP- específicos da popula o do Distrito Federal (22 a 37) e do Estado de Goiás (38 a 56). Haplótipos YAP+ específicos da popula o do Distrito Federal (60 a 62) e do Estado de Goiás (63 a 72).

IV.1.3.3. Diferenciação genética analisada por marcadores do tipo STR

De acordo com a análise de variância molecular – AMOVA, utilizando os loci do tipo STR, foi observado que há diferença estatisticamente significativa ($F_{st}=0,143$; $p=0,016\pm 0,001$) entre as populações de Goiás e Distrito Federal, indicando subestruturação populacional. Essa diferença observada entre as populações é reflexo da diferença estatisticamente significativa quanto as frequências alélicas observadas para os loci DYS390 ($F_{st}=0,025$; $p=0,033$) e DYS391 ($F_{st}=0,029$; $p=0,027$). Os resultados obtidos através da presente análise mostraram uma alta variabilidade dentro das populações (98,56%) e baixa entre as populações (1,44%).

IV.1.3.4. Mistura genética utilizando marcadores STR Y-específicos

As estimativas de contribuições dos principais grupos parentais brasileiros (europeu, africano e ameríndio) na constituição das populações do Centro-Oeste, com base nos marcadores uniparentais do tipo STR e na inserção *AluYAP* estão apresentadas na Tabela IV.6. As análises mostram uma predominância da parental europeia na constituição dessa população. Os valores observados para os outros dois grupos parentais apresentaram-se baixos, sendo que a contribuição parental africana foi mais expressiva que a ameríndia.

A comparação de mistura genética gerada a partir dos dados dos marcadores bialélicos e microssatélites (Tabela IV.7) mostra que não há diferença estatisticamente significativa entre a estimativa obtida utilizando ambas as categorias de marcadores Y-específicos uniparentais ($p>0,05$).

Tabela IV.6 – Estimativas de mistura genética (erro padrão em parênteses) das populações de Goiás e Distrito Federal e para o conjunto amostral (Centro-Oeste brasileiro) considerando um conjunto de cinco marcadores genéticos uniparentais (STRs e *AluYAP*) e comparação das estimativas obtidas para as duas populações (teste z).

População Parental	Goiás	Distrito Federal	z (p)	Centro-Oeste
Europeu	0,797 (0,036)	0,841 (0,060)	0,763 (0,224)	0,858 (0,082)
Africano	0,119 (0,016)	0,101 (0,032)	0,395 (0,348)	0,125 (0,044)
Ameríndio	0,083 (0,025)	0,058 (0,036)	0,656 (0,258)	0,017 (0,050)

Tabela IV.7. Comparação entre as estimativas de mistura genética geradas a partir dos dados dos marcadores bialélicos e microssatélites para o conjunto amostral do Centro-Oeste brasileiro.

População Parental	Centro-Oeste (SNPs)	Centro-Oeste (STRs)	z (p)
Europeu	0,900	0,858	1,288 (0,099)
Africano	0,085	0,125	1,305 (0,095)
Ameríndio	0,015	0,017	0,159 (0,436)

IV.1.4 Associação SNPs/STRs/AluYAP

Considerando o conjunto haplotípico formado pela união dos dados dos marcadores do tipo STRs e SNPs, foram observados 118 haplótipos em 200 cromossomos analisados. Ambas as populações compartilharam 10% dos haplótipos, sendo que a população do Distrito Federal apresentou 39 haplótipos específicos e o Estado de Goiás apresentou um maior polimorfismo haplotípico específico (59 haplótipos). A diversidade gênica, segundo Nei (1973), da população do Distrito Federal foi similar ($0,990 \pm 0,0002$) à do Estado de Goiás ($0,993 \pm 0,0001$).

A análise de AMOVA realizada para esse conjunto de dados mostrou resultados semelhantes aos já descritos para os marcadores STR analisados separadamente. As populações apresentam diferenças estatisticamente significativas ($F_{st}=0,016$, $p=0,029 \pm 0,002$). A maior porcentagem de variação encontra-se dentro das populações (98,35%). A variação interpopulacional foi responsável por uma pequena parcela da variação (1,65%).

IV.2. Contribuição uniparental feminina

Com o intuito de avaliar a contribuição uniparental feminina nas duas populações do Centro-Oeste brasileiro estudadas, foram analisados treze marcadores do tipo SNPs e a presença da deleção de 9 pb situada na região COII-tRNALys do genoma mitocondrial.

A Tabela IV.8 e a Figura IV.13 apresentam as freqüências dos haplogrupos de DNA mitocondrial observados nas amostras do Estado de Goiás e do Distrito Federal e a distribuição geográfica (origem das linhagens) das mesmas. Os dados obtidos por Alves-Silva *et al.* (2000), para amostras de indivíduos autodeclarados “brancos” originários de quatro regiões geopolíticas brasileiras (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul), constam também da Tabela para efeito de comparação. Esses autores não contemplaram a região Centro-Oeste. Os haplogrupos foram definidos como descrito em Material e Métodos e a nomenclatura seguiu a proposta por Chen *et al.* (2000).

Os haplogrupos A, B, C e D, característicos de linhagens ameríndias, foram observados em maior freqüência em ambas às populações analisadas. Destes, o

haplogrupo A foi o mais freqüente e o haplogrupo D o menos. Dentre os haplogrupos analisados que caracterizam a linhagem africana, foram observados seis haplogrupos no Estado de Goiás e cinco no Distrito Federal. As freqüências desses haplogrupos variaram de 0,016 a 0,101 em Goiás e de 0,028 a 0,085 no Distrito Federal. Com relação aos haplogrupos característicos de linhagem européia (H, J, K e T), apenas o haplogrupo H foi observado na presente amostra tendo uma freqüência de 10,8% em Goiás e 18,3% no Distrito Federal. Das amostras analisadas, 5,4% do Estado de Goiás e 11,3% do Distrito Federal não pertencem a nenhum dos haplogrupos analisados. Essas amostras não categorizadas foram identificadas como “não-ameríndias/não-africanas” e, possivelmente, devem pertencer a outras linhagens européias que não H, J, K e T.

Avaliando a diferenciação genética das populações do Estado de Goiás e do Distrito Federal, utilizando a análise de AMOVA *locus a locus*, não observamos diferença estatisticamente significativa entre as populações ($0,193 < p < 1,000$), indicando uma homogeneidade entre elas. Com relação ao índice de diversidade gênica (no caso haplotípica) de Nei (1973), ambas as populações apresentaram a mesma estimativa: Goiás = $0,894 \pm 0,009$ e Distrito Federal = $0,894 \pm 0,013$. Na AMOVA utilizando o conjunto dos haplótipos, observa-se também que não há diferença significativa estatisticamente entre as populações ($F_{st} = -0,003$; $p = 0,680 \pm 0,004$), sendo que toda a variância se encontra dentro das populações.

Tabela IV.8 – Distribuição geográfica e freqüências dos haplogrupos de DNA mitocondrial observados no Centro-Oeste brasileiro e em dados da literatura (indivíduos autodeclarados brancos de quatro regiões geopolíticas brasileiras - N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul - e do Brasil sem a região Centro-Oeste (Alves-Silva *et al.*, 2000)). A nomenclatura de haplogrupos no presente trabalho foi baseada em Chen *et al.* (2000).

Distribuição geográfica/ Haplogrupo	Mutação	Presente estudo						Alves-Silva <i>et al.</i> (2000)									
		Goiás		Distrito Federal		Centro-Oeste		N		NE		SE		S		Brasil	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ásia/América																	
A	+663 <i>HaeIII</i>	23	0,178	11	0,155	34	0,170	04	0,081	04	0,080	13	0,134	03	0,059	24	0,098
B	Deleção 9pb	21	0,163	08	0,113	29	0,145	08	0,167	03	0,060	10	0,103	03	0,059	24	0,098
C	-13259 <i>HinII</i>	13	0,101	09	0,127	22	0,110	10	0,205	01	0,020	06	0,062	03	0,059	20	0,081
D	-5176 <i>AluI</i>	06	0,047	03	0,042	9	0,045	04	0,081	03	0,060	04	0,041	02	0,040	13	0,053
Total			0,489		0,437		0,470		0,534		0,220		0,339		0,217		0,330
África																	
L1	+10.806 <i>HinfI</i>	13	0,101	05	0,070	18	0,090	02	0,042	07	0,140	11	0,112	03	0,061	23	0,093
L2	-10.806 <i>HinfI</i>	12	0,093	04	0,056	16	0,080	01	0,021	05	0,100	08	0,082	-	-	14	0,058
L3a	+2349 <i>Mbol</i>	04	0,031	02	0,028	6	0,030	03	0,062	07	0,140	11	0,112	-	-	21	0,086
L3b	-8616 <i>Mbol</i>	02	0,016	02	0,028	4	0,020	-	-	02	0,040	-	-	02	0,040	04	0,016
L3c	+10084 <i>TaqI</i>	03	0,023	-	-	3	0,015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3d	-10394 <i>Ddel</i>	11	0,085	06	0,085	17	0,085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L3*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,022	02	0,020	-	-	03	0,012
U6	+12308 <i>HinfI</i>	-	-	-	-	-	-	02	0,042	-	-	02	0,020	01	0,020	05	0,020
Total			0,349		0,267		0,320		0,167		0,440		0,347		0,121		0,285

Distribuição geográfica/ Haplogrupo	Mutação	Presente estudo						Alves-Silva <i>et al.</i> (2000)									
		Goiás		Distrito Federal		Centro-Oeste		N		NE		SE		S		Brasil	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Europa																	
H	-7025 <i>AluI</i>	14	0,108	13	0,183	27	0,135	04	0,084	11	0,220	14	0,142	13	0,257	42	0,171
pré*V	*	-	-	-	-	-	-	01	0,022	-	-	01	0,010	01	0,020	03	0,012
V	-4577 <i>NlaIII</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,020	04	0,041	01	0,020	06	0,024
HV*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,020	01	0,004
U	+12308 <i>HinfI</i>	-	-	-	-	-	-	02	0,040	03	0,060	05	0,051	05	0,099	15	0,061
Pré*HV	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	0,020	01	0,004
J	-13704 <i>BstNI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	06	0,119	06	0,024
K	-9052 <i>HaeII</i>	-	-	-	-	-	-	02	0,047	01	0,020	01	0,009	-	-	04	0,016
T	+13366 <i>BamHI</i>	-	-	-	-	-	-	04	0,084	01	0,020	04	0,041	04	0,079	13	0,053
I	-4529 <i>HaeII</i> , +8249 <i>AvaI</i> , +16389 <i>BamHI</i> , +10032 <i>AluI</i>	-	-	-	-	-	-	01	0,022	-	-	-	-	-	-	01	0,004
X	-1715 <i>DdeI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	02	0,019	01	0,020	03	0,012
Total			0,108		0,183		0,135	0,299		0,340		0,314		0,654		0,385	
Não-ameríndios e Não-africanos																	
		07	0,054	08	0,113	15	0,075	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N Total		129		71		200		48		50		98		50		246	

* Seqüenciamento

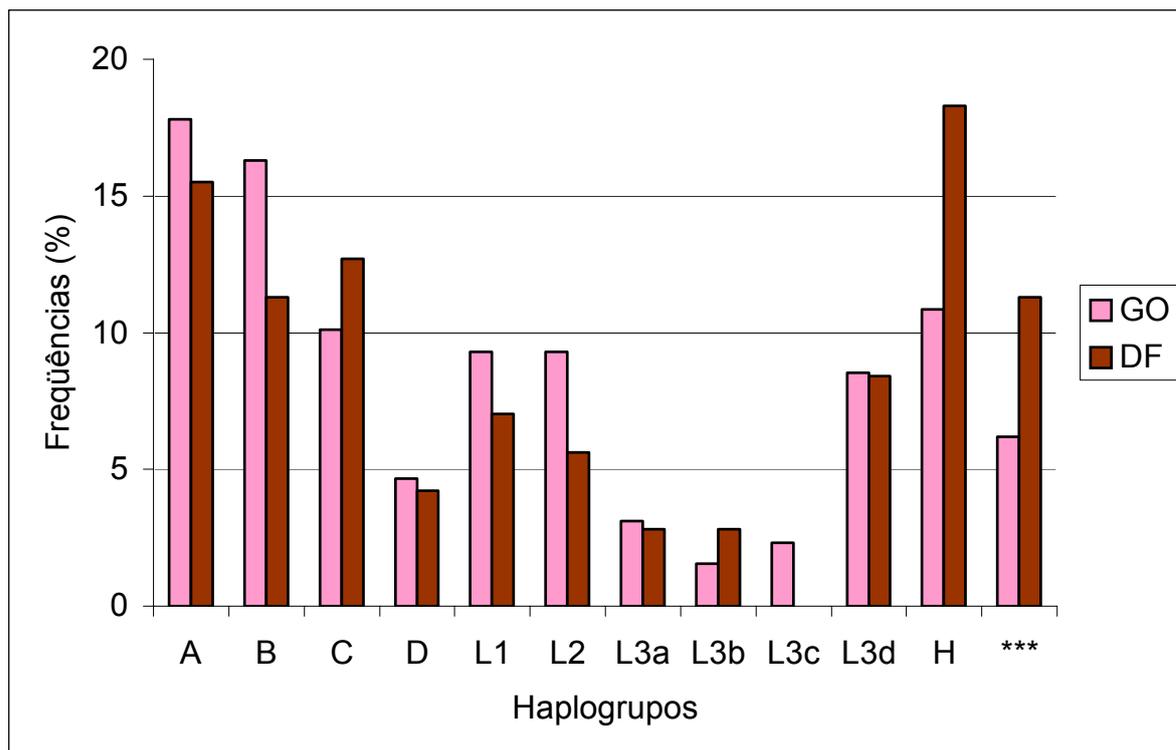


Figura IV.13: Distribuição das freqüências dos haplogrupos de DNA mitocondrial observados no Estado de Goiás e no Distrito Federal classificados de acordo com suas linhagens. ***Não Ameríndios/Asiáticos

Como não há diferenças entre as duas populações analisadas, o conjunto amostral aqui utilizado foi agrupado e denominado “Centro-Oeste”. A comparação entre a população do Centro-Oeste e as outras regiões brasileiras mostraram discrepância (Figura IV.14). Foram observados valores de F_{st} estatisticamente significativos ($p < 0,05$) entre o Centro-Oeste e todas as outras regiões. Com relação à amostra de Alves-Silva *et al.* (2000), foi observada diferença estatisticamente significativa entre as regiões Sudeste e Nordeste e entre a região Sul e todas as regiões do país.

	Centro Oeste	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Brasil
Centro Oeste	*****	0,043±0,001	0,022±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Norte	0,018	*****	0,006±0,000	0,111±0,003	0,000±0,000	0,053±0,022
Nordeste	0,022	0,058	*****	0,003±0,000	0,000±0,000	0,126±0,004
Sudeste	0,043	0,014	0,059	*****	0,023±0,001	0,068±0,003
Sul	0,142	0,097	0,128	0,033	*****	0,001±0,000
Brasil	0,021	0,017	0,010	0,011	0,058	*****

Figura IV.14: Matriz de comparação par a par dos resultados obtidos pelos marcadores de DNA mitocondrial entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil como um todo utilizando o método F_{st} . A população do Centro-Oeste é o conjunto formado pelas populações de Goiás e Distrito Federal enquanto que as das demais regiões são compostas por indivíduos auto-declarados como “brancos” e a população denominada “Brasil” é o conjunto amostral das regiões brasileiras excetuando o Centro-Oeste (dados de Alves-Silva *et al.*, 2000). Abaixo valores de F_{st} e acima valores de P. Número de permutações: 10100.

IV.2.1. Mistura genética: marcadores do DNA mitocondrial

A Tabela IV.9 mostra a distribuição da frequência de cada haplogrupo de DNA mitocondrial com suas respectivas origens geográficas para o Estado de Goiás, Distrito Federal e para o conjunto amostral do Centro-Oeste. Os dados compilados na Tabela IV.9 foram obtidos a partir dos dados apresentados na Tabela IV.8. Os dados foram agrupados de acordo com a origem geográfica de cada haplogrupo (Figura IV.15). Por exemplo, os indivíduos pertencentes aos haplogrupos A, B, C e D observados foram agrupados na categoria Ameríndios. Não há diferença estatisticamente significativa quando se compara as estimativas obtidas para as duas populações ($p > 0,05$).

Tabela IV.9 – Composição quanto a origem geográfica das populações de Goiás e Distrito Federal e do conjunto amostral (Centro-Oeste brasileiro) baseada nos haplogrupos do DNA mitocondrial e comparação das estimativas obtidas para as duas populações (teste z).

População Parental	Goiás	Distrito Federal	z (p)	Centro-Oeste
Europeu	0,108	0,183	1,487 (0,068)	0,135
Africano	0,349	0,267	1,190 (0,117)	0,320
Ameríndio/asiático	0,489	0,437	0,705 (0,239)	0,470
Não-ameríndio	0,054	0,113	1,516 (0,064)	0,075

A Tabela IV.10 apresenta a distribuição das frequências dos haplogrupos do DNA mitocondrial agrupados por origem geográfica (ancestralidade) no conjunto amostral da região Centro-Oeste e dados da literatura para as demais regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul) de indivíduos autodefinidos como “brancos” (Alves-Silva et al., 2000). Destaca-se que a região Centro-Oeste não foi contemplada na literatura citada. A população denominada Brasil é um agrupamento dos dados da literatura (soma dos haplogrupos das quatro regiões descritas na literatura)

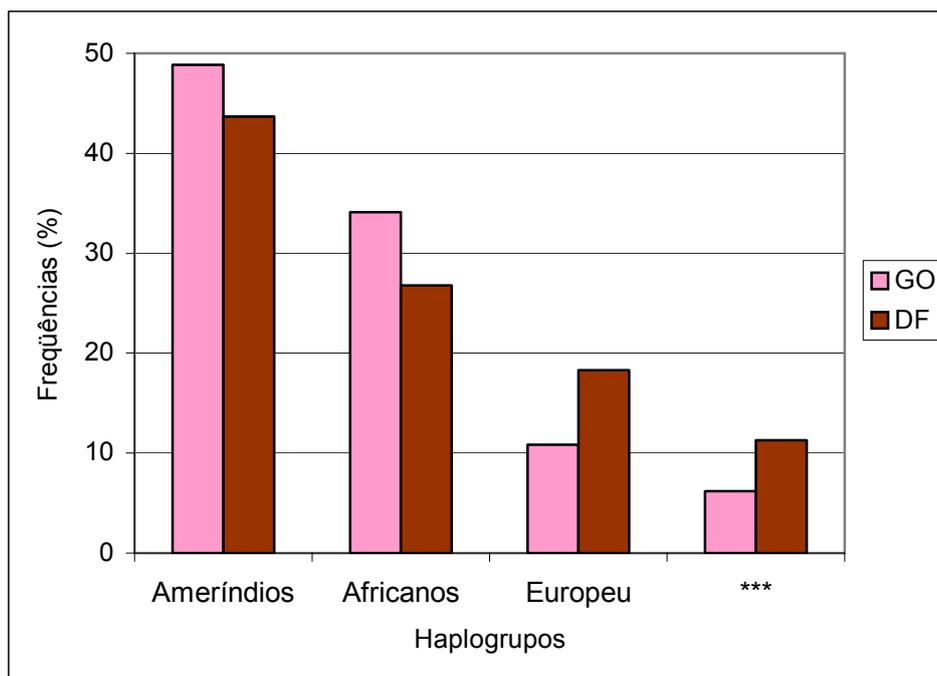


Figura IV.15: Distribuição dos haplogrupos de DNA mitocondrial observados em Goiás e no Distrito Federal distribuídos pelas origens geográficas. ***Não ameríndios/Asiáticos

Os dados da Tabela IV.10 foram utilizados para comparação das proporções das estimativas de mistura genética entre a região Centro-Oeste e as demais regiões brasileiras e destas com o Brasil. Por não haver diferenças estatisticamente significativas entre as populações aqui analisadas com esse conjunto de marcadores, os dados gerados foram agrupados em Centro-Oeste. Para efeito de cálculo, as amostras da região Centro-Oeste pertencentes aos haplogrupos não-ameríndios foram somados ao haplogrupo europeu.

A Tabela IV.11 apresenta a comparação das proporções de contribuição das três origens geográfica principais na região Centro-Oeste e no Brasil com relação as demais regiões geográficas brasileiras. O teste z mostra diferença estatisticamente significativa em relação a região Sul para as três origens geográficas da região Centro-Oeste ($p < 0,05$). Já no agrupamento do conjunto Brasil dos dados da literatura, a região Sul mostra diferença estatisticamente significativa com as origens europeia e africana ($p < 0,05$). Dentre as regiões brasileiras comparadas, apenas a região Sul não apresentou diferença estatisticamente significativa com o Brasil.

Tabela IV.10 – Distribuição das freqüências dos haplogrupos do DNA mitocondrial agrupados por origem geográfica (ancestralidade) da região Centro-Oeste (CO) e dados de brasileiros autodefinidos como brancos da literatura (N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul) (Alves-Silva *et al.*, 2000). Destaca-se que a região Centro-Oeste não foi contemplada na literatura citada.

Origem do haplogrupo	Presente estudo		Brasileiros autodefinidos como brancos			
	CO	N	NE	SE	S	Brasil (sem CO)
Europeu	0,135	0,299	0,340	0,314	0,654	0,385
Africano	0,320	0,167	0,440	0,347	0,121	0,285
Ameríndio/asiático	0,470	0,534	0,220	0,339	0,217	0,330
Não-ameríndio	0,075	-	-	-	-	-

Tabela IV.11 – Teste z (valores de p entre parênteses) para a comparação das proporções de contribuição das três origens geográficas principais (Europa, África e América/Ásia) na região Centro-Oeste e no Brasil com relação às demais regiões geográficas brasileiras (N = Norte; NE = Nordeste; SE = Sudeste; S = Sul). Valores de z estatisticamente significativos estão em negrito.

		Regiões brasileiras				Brasil (sem Centro-Oeste)
		N	NE	SE	S	
Centro-Oeste	Europa	1,320 (0,093)	1,940 (0,026)	1,960 (0,025)	6,130 ($p < 0,050$)	3,990 ($p < 0,050$)
	África	2,100 (0,018)	1,600 (0,055)	0,470 (0,319)	2,800 (0,003)	0,800 (0,212)
	América/Ásia	0,800 (0,212)	3,200 (0,001)	2,150 (0,016)	3,240 (0,001)	3,010 (0,001)
Brasil (sem Centro-Oeste)	Europa	1,130 (0,129)	0,600 (0,274)	1,230 (0,109)	3,500 ($p < 0,050$)	-
	África	1,690 (0,046)	2,160 (0,015)	1,130 (0,129)	2,420 (0,008)	-
	América/Ásia	2,690 (0,004)	1,530 (0,063)	0,160 (0,436)	1,570 (0,058)	-

IV.3 Comparação: Y versus DNA mitocondrial

IV.3.1. Análise indivíduo a indivíduo

As Figuras IV.16 e IV.17 apresentam a contribuição uniparental na constituição de cada indivíduo amostrado das populações do Distrito Federal e Goiás, respectivamente. As linhagens de DNA mitocondrial não categorizadas foram excluídas dessa análise. A Tabela IV.12 apresenta um sumário da constituição genética individual obtida dessa maneira.

Na amostra do Distrito Federal quatorze indivíduos (19,7%) apresentaram tanto o cromossomo Y quanto o mitocondrial de mesma origem, sendo treze de linhagens européias e um de africana. Já no Estado de Goiás, foram observados 19 indivíduos (14,7%) com as linhagens uniparentais de mesma origem: seis africanos, um ameríndio e doze europeus. Os demais indivíduos apresentaram a linhagem materna de origem geográfica distinta da paterna, sendo que o predomínio foi de linhagens do cromossomo Y de origem européia e a do DNA mitocondrial, ameríndia (45,0% em Goiás; 39,4% no Distrito Federal; 43% da amostra total). No Distrito Federal não foi identificado caso de Y africano e ameríndio associado a DNA mitocondrial europeu.

IV.3.2. Análise populacional

A Tabela IV.13 apresenta o contraste da contribuição uniparental baseado nas duas categorias de marcadores analisados no presente trabalho (cromossomo Y e DNA mitocondrial). A mistura genética estimada com base na origem geográfica dos haplogrupos dos marcadores uniparentais situados no cromossomo Y e no DNA mitocondrial, revelou um predomínio das linhagens de cromossomo Y européias enquanto que as linhagens ameríndias de DNA mitocondrial foram as mais numerosas. Linhagens de cromossomo Y ameríndias foram observadas em frequências extremamente baixas. Com relação à contribuição africana, esta foi muito inferior à européia com relação ao Y enquanto que o quadro se inverte quando se considera o DNA mitocondrial. Os valores das estimativas baseadas nas duas categorias de linhagens são estatisticamente distintos, de acordo com teste z cujos valores

obtidos apresentaram uma probabilidade de desvio do valor esperado ao acaso muito menor que o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

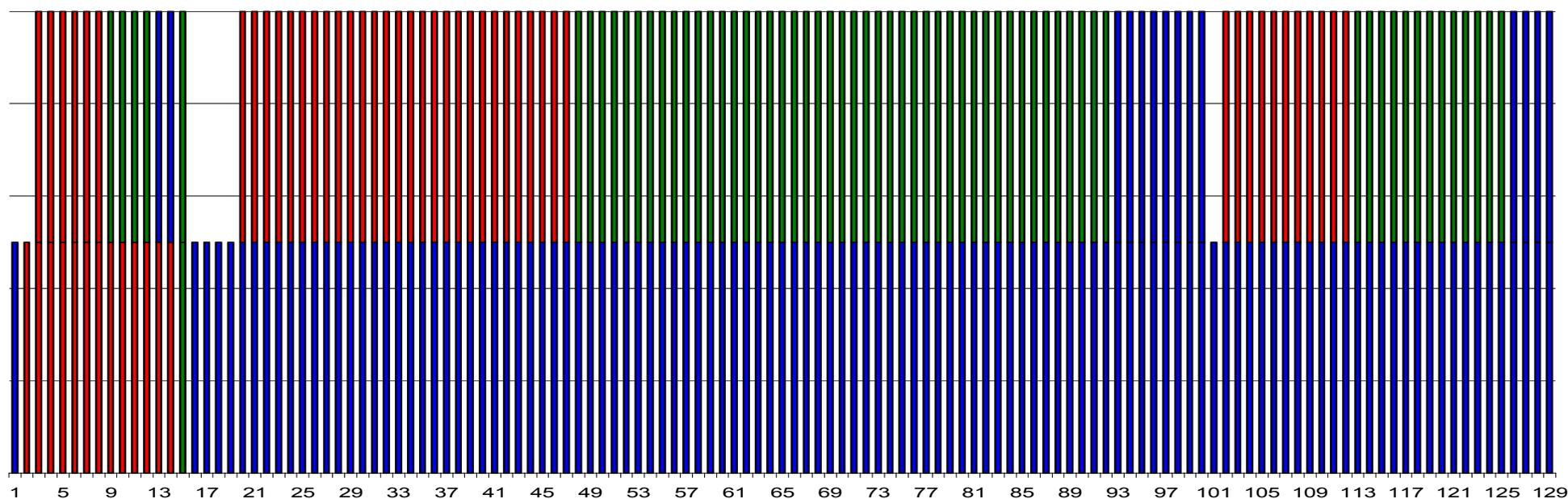


Figura IV.16: Contribuição uniparental na constituição de cada indivíduo amostrado na população do Estado de Goiás. Na parte inferior da figura estão representadas as linhagens referentes ao cromossomo Y e, na superior, as do DNA mitocondrial. As amostras caracterizadas como linhagens europeias estão representadas na cor azul, as africanas na cor vermelha, as ameríndias na cor verde.

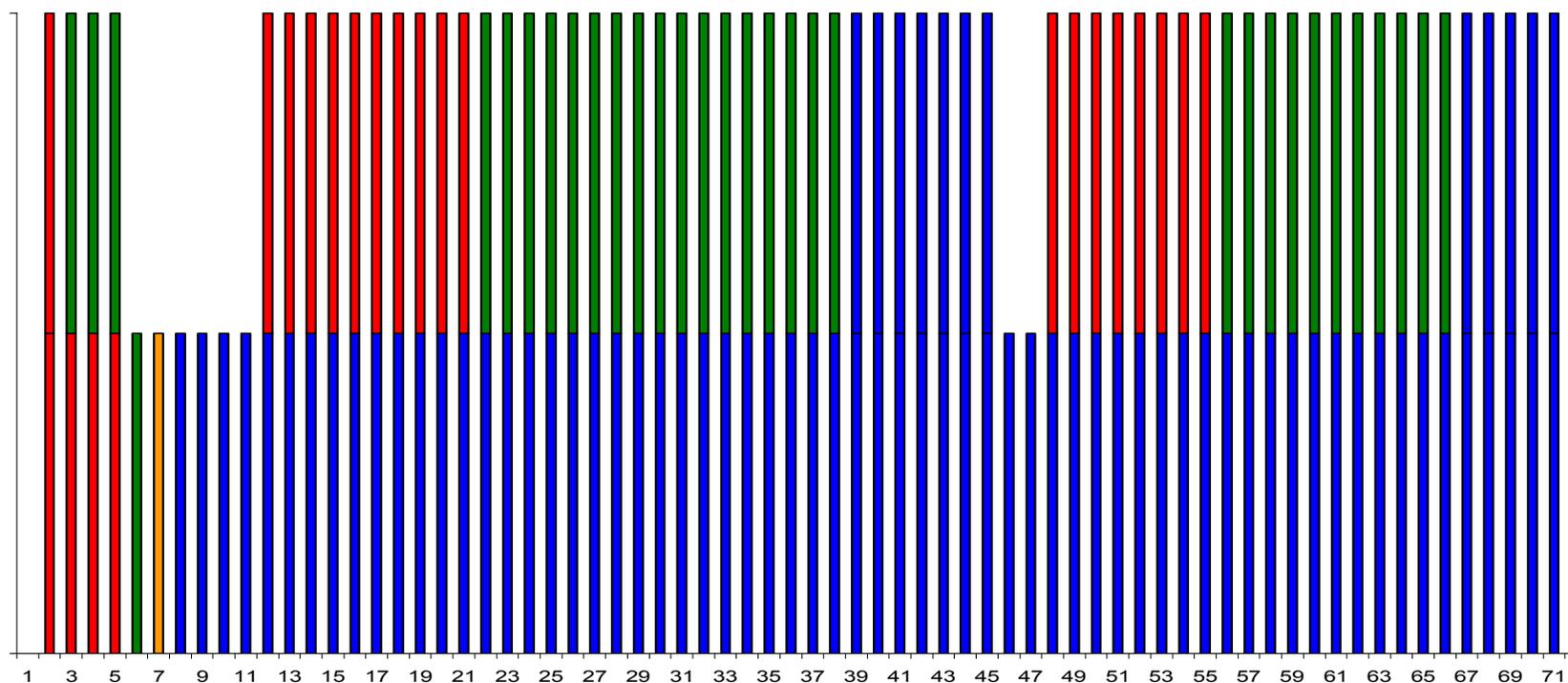


Figura IV.17: Contribuição uniparental na constituição de cada indivíduo amostrado na população do Distrito Federal. Na parte inferior da figura estão representadas as linhagens referentes ao cromossomo Y e, na superior, as do DNA mitocondrial. As amostras caracterizadas como linhagens europeias estão representadas na cor azul, as africanas na cor vermelha, as ameríndias na cor verde e a asiática na cor laranja.

Tabela IV.12 – Constituição genética individual definida pela associação das linhagens de DNA mitocondrial e cromossomo Y nas populações de Goiás, Distrito Federal e Centro-Oeste brasileiro

Linhagem do DNA mitocondrial Frequência		Linhagem do Cromossomo Y Frequência		
		Européia	Africana	Ameríndia/asiática
Goiás	Européia	0,093	0,016	-
	Africana	0,302	0,047	-
	Ameríndia/ Asiática	0,450	0,031	0,007
	Não-ameríndia*	0,047	0,007	-
Distrito Federal	Européia	0,183	-	-
	Africana	0,254	0,014	-
	Ameríndia/ Asiática	0,394	0,042	-
	Não-ameríndia*	0,085	-	0,028
Centro-Oeste	Européia	0,125	0,010	-
	Africana	0,285	0,035	-
	Ameríndia/ Asiática	0,430	0,035	0,005
	Não-ameríndia*	0,060	0,005	0,010

* Considera-se não-ameríndia as amostras em que não foi possível a categorização da linhagem do DNA mitocondrial.

Tabela IV.13 – Comparação das estimativas de mistura genética geradas a partir das linhagens do cromossomo Y e do DNA mitocondrial para o conjunto amostral da região Centro-Oeste brasileiro e comparação das estimativas obtidas para as duas categorias de marcadores (teste z).

Origem geográfica	Estimativas de mistura genética		z (p)
	Cromossomo Y	DNA mitocondrial	
Europa	0,900	0,210	13,88 ($p << 0,05$)
África	0,085	0,320	5,85 ($p << 0,05$)
América/Ásia	0,015	0,470	10,62 ($p << 0,05$)

V. DISCUSSÃO

A população brasileira atual foi constituída, nos últimos 500 anos, com base em uma mistura populacional multiétnica, porém majoritariamente tri-híbrida. No Brasil, os diferentes povos que aqui aportaram se mesclaram, se reproduziram, diferentemente de alguns outros países onde os casamentos inter-étnicos são exceções. Porém, o contingente de cada população na composição das diferentes regiões brasileiras, não foi equitativo. Por exemplo, ocorreu um maior fluxo de africanos para o Nordeste e Sudeste do Brasil, enquanto que os extremos do país, Norte e Sul, tiveram menor participação desses migrantes (IBGE, 2000). No Norte, a contribuição ameríndia foi numericamente relevante para a composição populacional local, enquanto nas outras regiões do país essa participação foi pequena ou até mesmo ausente.

A região Centro-Oeste brasileira foi colonizada por migrações internas advindas de todas as partes do Brasil, principalmente dos estados vizinhos, e foi uma das últimas regiões brasileiras a ser povoada (Palacín e Moraes, 1994). O povoamento do Estado de Goiás foi iniciado em meados do século XIX, enquanto que o Distrito Federal começou a ser ocupado a partir de 1960. O povoamento do Distrito Federal ocorreu em decorrência da criação da nova Capital Federal no Planalto Central e foi oriundo de populações pré-estabelecidas das cinco regiões brasileiras, especialmente do Nordeste e Sudeste, o que torna o brasiliense um caso ímpar do ponto de vista de formação (dados da CODEPLAN, 1997). Essa é a região brasileira menos conhecida quanto à caracterização genética, mas é possível que sua constituição possa representar a constituição brasileira média em decorrência da sua história de povoamento.

Os dados genéticos são utilizados na busca de melhor compreender os fatos históricos, porém, podem mostrar diferenças quando se comparam distintas categorias de marcadores genéticos. Marcadores uniparentais (cromossomo Y e DNA mitocondrial) podem auxiliar a entender melhor o processo de povoamento, pois permitem distinguir o quanto da mistura herdada deriva da contribuição diferencial entre homens e mulheres. No Brasil, sabe-se que o cruzamento inter-étnico foi assimétrico em relação ao sexo na época da

colonização brasileira, onde homens europeus e mulheres africanas e ameríndias contribuíram desproporcionalmente para esse processo (Callegari-Jacques et al., 2003).

Nesse trabalho analisamos a constituição uniparental masculina e feminina de duas populações do Centro-Oeste brasileiro - Estado de Goiás e Distrito Federal - com vistas a contrastar os dados e colaborar para um melhor conhecimento do povoamento dessa região em que a população residente representa 60,6% da população do Centro-Oeste (dados do IBGE - 2000).

V.1 Contribuição uniparental masculina

A maior parte do cromossomo Y é não recombinante e, desse modo, as mutações nesse cromossomo representam um registro de seu passado evolutivo que pode ser usado na reconstrução da história de populações (Jobling e Tyler-Smith, 2003). O cromossomo Y, a exemplo dos demais cromossomos humanos, apresenta as diferentes categorias de marcadores genéticos com diferentes taxas de mutação. Porém, a proporção de marcadores nesse cromossomo é menor do que nos demais cromossomos humanos.

Dentre os marcadores encontrados estão os bialélicos. Essa categoria de marcador apresenta uma baixa taxa de mutação, pois são advindos de eventos mutacionais lentos, tais como substituição de bases (SNPs) e inserções/deleções (Indels), que podem ser registrados como eventos únicos na evolução humana (Hurles *et al.*, 1999). Em contraste, apresenta também marcadores do tipo microssatélites que apresentam altas taxas de mutação e, portanto, possibilidade de mutações recorrentes (Heyer, *et al.*, 1997; Carvalho-Silva, *et al.*, 1999).

Os marcadores genéticos situados no cromossomo Y mais utilizados em análises populacionais são os situados na região não recombinante desse cromossomo (Underhill *et al.*, 2000; Underhill *et al.*, 2001; Martinez-Marignac *et al.*, 2004). O conjunto de informações gerado a partir da análise desses marcadores possibilita a definição de haplótipos e haplogrupos, aumentando assim o potencial discriminatório.

V.1.1. Inserção AluYAP

As amostras das populações de Goiás e Distrito Federal apresentaram valores altos e estatisticamente similares para o alelo YAP^- (ausência da inserção) e, dessa forma, podemos dizer que a população do Centro-Oeste foi fundada prioritariamente por indivíduos YAP^- .

A distribuição mundial dessa inserção apresenta diferenças marcantes entre os vários continentes (Hammer *et al.*, 1997). Populações portuguesas e indígenas brasileiras são praticamente monomórficas para o YAP^- (Bianchi *et al.*, 1997; Oliveira, 1999; Rodriguez-Delfin, 1999). Na Itália, foi observada uma frequência variando de 7 a 17% (Hammer *et al.*, 1997). Em contraste, esse alelo é raro no continente africano. Nessa região do mundo, o alelo presença de inserção é predominante, em especial na África Subsaariana (Hammer, 1994; Karafet *et al.*, 1997), fonte de ondas migratórias (tráfico de escravos) para o Brasil. Na África Ocidental, a frequência foi estimada em 100% na Nigéria, 95,0% na Costa do Marfim e 86,0% em Gâmbia (Hammer, 1994; Hammer *et al.*, 1997; Rodriguez-Delfin, 1999). Em bantos da África do Sul, a frequência varia de 65,0 a 83,0% (Hammer, 1994; Karafet *et al.*, 1999).

Dessa forma, a alta frequência do alelo YAP^- nas populações aqui analisadas pode ser reflexo de uma alta contribuição de homens europeus e eurodescendentes para o povoamento dessa região, assim como pode evidenciar uma participação ameríndia. Por outro lado, sugere-se que a contribuição parental africana no delineamento da frequência alélica desse marcador nas populações analisadas não deve ter tido um papel relevante.

V.1.2 Marcadores binários do tipo SNPs situados no cromossomo Y

Na região não recombinante do cromossomo Y foi descrita uma série de polimorfismos que possibilitam a definição de haplogrupos que representam linhagens associadas a origens geográficas (YCC, 2002; Underhill, 2003). Dessa série de polimorfismos, foram selecionados para esse estudo 11 marcadores bialélicos (SNPs) que foram analisados juntamente com os dados da inserção *AluYAP*.

A análise desses polimorfismos permite a reconstrução “genealógica”, determinando, assim, a origem filogeográfica de cada cromossomo analisado. Cada haplogrupo representa uma única linhagem que foi originada de um único homem no passado em algum lugar do mundo (Zerjal *et al.*, 2001). Os haplogrupos podem ser nomeados pelas mutações que definem as linhagens (YCC, 2002; Hammer e Zegura, 2002).

V.1.2.1. Caracterização genética populacional por *locus*

A distribuição das freqüências alélicas desses doze marcadores binários possibilitou a caracterização genética de ambas populações analisadas. No Estado de Goiás foi observado que 58,3% desses loci eram polimórficos enquanto que no Distrito Federal esse número foi maior, 75,0%. Apesar disso, considerando esse conjunto de marcadores como loci independentes, não há diferença estatisticamente significativa entre essas populações, evidenciando uma similaridade entre elas.

A variação na freqüência gênica em uma população subestruturada pode ser analisada diretamente em termos de diversidade gênica. Este método pode ser aplicado para qualquer população independente das forças evolutivas atuantes, tais como mutações, seleção e migração, e do sistema reprodutivo. A diversidade gênica (h) é uma medida de variação genética em uma população e pode ser analisada dentro e entre populações distintas (Nei, 1973). A média da diversidade gênica no Estado de Goiás foi levemente maior que o Distrito Federal, porém baixa nas duas populações, como era esperado em decorrência de serem sistemas bialélicos e da ocorrência de monomorfismo para uma porcentagem de loci.

V.1.2.2. Haplogrupos do cromossomo Y no Centro-Oeste

Como os marcadores analisados no presente trabalho estão situados na região não recombinante do cromossomo Y e, portanto, ligados, a análise considerando o conjunto de marcadores genéticos é mais adequada. O conjunto específico de marcadores genéticos aqui investigados em homens do Centro-Oeste permitiu a identificação de haplogrupos, o que possibilitou a

definição da origem filogeográfica de cada cromossomo analisado. Com essa análise, foram identificados oito haplogrupos distintos - P*, F*, E3*, R1b8, E*, E3a*, Q3* e D1 - sendo que os haplogrupos R1b8 e D1 não foram encontrados no Estado de Goiás. Importante frisar que os haplogrupos – F*, R1b8, Q3* e D1 - são sub-haplogrupos do P* e o E3* e o E3a* do E*. A análise filogeográfica gerada para os haplogrupos observados (*network*) mostrou pequenas diferenças decorrentes da ocorrência de haplogrupos exclusivos na população do Distrito Federal e da diferença na frequência de observação dos haplogrupos.

O maior número de haplogrupos observados na população do Distrito Federal é um provável reflexo do histórico de povoamento que relata a migração interna para o Distrito Federal de um maior número de regiões brasileiras do que para o Estado de Goiás. Enquanto Goiás foi formado prioritariamente por indivíduos migrantes dos estados vizinhos (Palacín, 1994), o Distrito Federal recebeu uma contribuição importante também de estados do Nordeste e Sudeste (dados da CODEPLAN, 1997).

Apesar do maior número de haplogrupos no Distrito Federal, a diversidade haplotípica estimada foi similar nas duas populações. Esse dado deve ser decorrente das baixas frequências dos haplogrupos adicionais (R1b8 e D1). As similaridades genéticas, decorrentes das similaridades das frequências haplotípicas, entre as duas populações foi confirmada pela análise de AMOVA que mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre as populações.

Distribuição dos haplogrupos de Y no Centro-Oeste e contextualização

No Estado de Goiás o haplogrupo P* foi o mais frequente (49,6%) e o segundo do Distrito Federal (36,6%), o que o caracteriza como o mais frequente nessa amostra da região Centro-Oeste (45%). Esse haplogrupo, caracterizado pela mutação 92R7, apresenta vários sub-haplogrupos, dentre os quais o Q3* e R1b8, que serão discutidos posteriormente. Excluindo esses dois sub-haplogrupos, o haplogrupo P* é encontrado em alta frequência entre as populações europeias e está ausente na África (Flores *et al.*, 2003) e no Japão

(Pandya, 1998 *in* Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Também é observado nas populações do Oriente Médio e Índia (Underhill *et al.*, 2001; YCC, 2002). O encontro desse haplogrupo nas populações do Centro-Oeste, assim como nas demais populações brasileiras, deve refletir contribuição européia, visto que a contribuição de povos do Oriente Médio e Índia na constituição genética do povo brasileiro é negligenciável.

O haplogrupo P* é também o mais comum entre indivíduos autodefinidos como “brancos” das outras quatro regiões do Brasil. Nesse caso é observada uma discreta variação regional nas freqüências desse haplogrupo (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Freqüências similares foram observadas em euro-descendentes brasileiros do Estado de São Paulo, situado na região Sudeste (Abé-Sandes *et al.*, 2004).

A observação do haplogrupo P* em remanescentes de quilombos é considerada reflexo de mistura genética e auxilia na reconstrução histórica das populações. Por exemplo, as observações de altas freqüências desse haplogrupo devem ser reflexo de efeito do fundador, remetendo a uma fundação dessas comunidades por indivíduos previamente miscigenados (Ribeiro, 2005). A ocorrência do haplogrupo P*, em uma amostra de indivíduos afro-derivados da população urbana de Ribeirão Preto (região Sudeste), também reflexo de miscigenação (Abé-Sandes *et al.*, 2004), contribui para a discussão acerca da ausência de correlação entre cor da pele e ancestralidade genética. Já entre brasileiros descendentes de asiáticos, esse haplogrupo não foi observado (Abé-Sandes *et al.*, 2004).

O haplogrupo F* foi o mais freqüente no Distrito Federal (38,0%) e o segundo mais freqüente no Estado de Goiás (22,5%). Esse haplogrupo, caracterizado pela presença das mutações M89/213, apresenta-se distribuído na maioria dos continentes (Santos *et al.*, 1999). Essa distribuição inclui a Europa, América, Ásia e Leste da África e é decorrência de ser um haplogrupo ancestral originado em um período anterior às grandes migrações. É sugerido que essa linhagem tenha sido transportada via migração de um povo que se dispersou da África para Europa e Ásia há 40 milhões de anos (Underhill *et al.*, 2001).

Devido sua antiguidade, estima-se que no máximo 3,0% das mutações do haplogrupo F* não estão associadas a outro evento mutacional. Por exemplo, a mutação M3*T (haplogrupo Q3*), que caracteriza ancestralidade ameríndia, é um sub-haplogrupo de F*. Essa mutação foi identificada em baixa frequência nas populações do Estado de Goiás e Distrito Federal (0,8 e 1,4%, respectivamente). Outro exemplo é o haplogrupo R1b8, que foi observado em 8,4% das amostras do Distrito Federal e será discutido abaixo. Outros haplogrupos derivados de F* são observados distribuídos em quase todo o mundo, em especial na Europa, Ásia e Leste da África, e estão ausentes na África Subsaariana (Underhill *et al.*, 2001). Portanto, de acordo com a história da colonização brasileira, de que não houve um fluxo gênico importante de países asiáticos e do Leste da África, é possível concluir que a presença do haplogrupo F* (excluindo o sub-haplogrupo Q3*) no Centro-Oeste brasileiro deve ser consequência da migração européia, a exemplo do concluído para o haplogrupo P*.

As frequências observadas do haplogrupo F* nas populações aqui averiguadas foram similares àquelas encontradas por Abé-Sandes *et al.* (2004) em eurodescendentes do Sudeste brasileiro. A presença deste haplogrupo em remanescentes de quilombos e entre afro-descendentes brasileiros é provável consequência de mistura inter-étnica (Abé-Sandes *et al.*, 2004; Ribeiro, 2005), a exemplo do discutido para o haplogrupo P*. Esse haplogrupo não foi analisado por Carvalho-Silva *et al.* (2001).

O haplogrupo R1b8, caracterizado pela mutação R1b8, foi observado no Distrito Federal. Este haplogrupo é encontrado em alta frequência entre as populações Ibéricas, principalmente no País Basco e Catalunha, embora o mesmo seja raro ou ausente na maioria das outras populações do mundo (Hurles *et al.*, 1999), incluindo o Nordeste da África (Flores *et al.*, 2003). É observado em populações com ancestralidade ibérica, como na Argentina (Bianchi *et al.*, 1997). As populações brasileiras comumente não apresentam este haplogrupo, porém baixas frequências (2,0 a 2,6%) foram observadas em populações urbanas do Sudeste brasileiro (Abé-Sandes *et al.*, 2004; Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Este haplogrupo, indicador de ancestralidade européia,

também foi observado em *Mocambo* e *Kalunga*, duas populações rurais afrodescendentes brasileiras (Ribeiro, 2005).

A presença ameríndia nas populações do Centro-Oeste brasileiro investigada neste trabalho foi indicada pela observação do haplogrupo Q3*, definido pela presença do alelo T no *locus* M3 e restrito geograficamente às populações ameríndias (Underhill *et al.*, 1996). O alelo T está presente em 78,0% dos índios da região amazônica (Vallinoto *et al.*, 1999) e ocorre em mais de 90,0% dos nativos da América Central e do Sul (Underhill *et al.*, 1996). Este haplogrupo não foi encontrado em brasileiros que se autodefiniram como “brancos” (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Por outro lado, este alelo foi observado em 4,0% de uma amostra de afro-brasileiros de Salvador e com valor superior a 3,0% em duas populações remanescentes de quilombo, *Rio das Rãs* e *Kalunga* (Abé-Sandes *et al.* 2004; Ribeiro, 2005). A presença deste alelo na região Centro-Oeste brasileira, reflexo da contribuição indígena para o desenvolvimento desta população, está em concordância com dados históricos (Palacín e Moraes, 1994; Palacín *et al.*, 1995).

O haplogrupo E3* também é um indicativo de contribuição européia (Mediterrâneo) e/ou africana (Norte da África) na constituição das linhagens patrilineares destas comunidades. Ele é observado em altas freqüências entre populações, por exemplo, do Norte da África (50,0%) e italianos (29,0%) (Hammer *et al.*, 2000). Em Portugal, fonte primordial do fluxo migratório europeu para o Brasil, foi observada uma freqüência de 9,7% (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Em populações brasileiras, o haplogrupo E3* é observado em pessoas que se autodefiniram como “brancos” e em eurodescendentes (Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Abé-Sandes *et al.*, 2004). Foi também encontrado em amostras de afrodescendentes residentes em populações urbanas, como Ribeirão Preto e Salvador, e em comunidades rurais, tais como *São Gonçalo*, *Rio das Rãs* e *Kalunga* (Abé-Sandes *et al.*, 2004; Ribeiro, 2005).

O haplogrupo E3* é considerado como um marco da invasão africana na Europa nos tempos em que os mouros conquistaram a Península Ibérica (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Entretanto, a observação desta mutação entre brasileiros não pode ser considerada como um resultado de migrações originadas de comunidades humanas do Norte da África. É mais plausível

pensar que possa ser consequência de mistura prévia das populações mediterrâneas fornecedoras de migrantes para o Brasil, especialmente Portuguesas e Italianas, com populações do Norte africano.

Os haplogrupos E* e E3a* identificam ancestralidade da África Subsaariana (Hammer et al., 1998; YCC, 2002). Assim, podemos deduzir que a presença desse haplogrupo em nossa análise é uma consequência da participação masculina afrodescendente na constituição das populações do Centro-Oeste.

O haplogrupo E*, observado em 3,1% da amostra de Goiás e 2,9% do Distrito Federal, foi também encontrado em diversas populações brasileiras, como em eurodescendentes brasileiros, afrodescendentes urbanos e em remanescentes de quilombos como São Gonçalo, Kalunga e Mocambo (Abé-Sandes et al., 2004; Ribeiro, 2005). Entre indivíduos autodefinidos como “brancos”, esse haplogrupo é encontrado em baixa frequência (2%) na região Norte (Carvalho-Silva et al., 2001).

O haplogrupo E3* foi observado em ambas populações do Centro-Oeste analisadas: Goiás = 7,0%; Distrito Federal = 2,9%. Entre populações brasileiras, foi observado no Sudeste (4,0%) e Nordeste (4,1%) em indivíduos autodeclarados “brancos” (Carvalho-Silva et al., 2001). Em remanescentes de quilombos do Nordeste brasileiro, a frequência desse haplogrupo variou de 4,5% em Mocambo a 77,3% em Barra (Abé-Sandes et al., 2004; Ribeiro, 2005).

A ocorrência desses haplogrupos corrobora os dados históricos que afirmam que o subsaara foi a região africana que mais contribuiu com escravos para o Brasil colonial. Porém, a baixa frequência observada no presente trabalho pode ser um reflexo do cruzamento diferencial, onde os homens europeus obtiveram um maior sucesso reprodutivo que os africanos, como melhor discutido adiante.

O haplogrupo D1, definido pela presença do alelo YAP⁺ associado à ausência das mutações nos *loci* SRY4064, P2, M34 e M2, é observado no Japão e Tibet (Karafet et al., 1999; YCC, 2002). Esse haplogrupo foi observado em baixa frequência na população do Distrito Federal (1,4%). No Brasil, esse haplogrupo foi analisado em eurodescendentes, afrodescendentes e

nipodescendentes, tendo sido encontrado em 25,0% dos nipodescendentes e estando ausente nos demais grupos (Abé-Sandes *et al.*, 2004). A ocorrência deste haplogrupo no Centro-Oeste também corrobora dados históricos. O Brasil recebeu uma grande migração japonesa no início do século XX no Estado de São Paulo. Depois eles se moveram para outras regiões, incluindo a centro-oeste onde existem comunidades fundadas por indivíduos advindos da Ásia (Palacín e Moraes, 1994), assim como se encontram descendentes de japoneses na área urbana.

Mistura Genética: Haplogrupos

Na análise da constituição dos homens de Goiás e Distrito Federal avaliada pelos haplogrupos do cromossomo Y, foram encontrados haplogrupos característicos dos três principais grupos étnicos fundadores da população brasileira: europeus, africanos e ameríndios. Esse achado era esperado em decorrência do relato histórico de povoamento da região. As estimativas de frequência de contribuição genética para as duas populações são similares em relação à origem europeia e africana e diferente estatisticamente com relação à contribuição ameríndia/asiática ($z=2,670$; $p=0,004$).

A linhagem europeia apresenta-se em grande maioria (90,0% do conjunto amostral – Centro-Oeste). Esse dado é similar ao observado para indivíduos autodeclarados como “brancos” do Brasil, onde 97,5% também são de linhagem europeia (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Porém, com relação às linhagens africanas e ameríndia foi observado uma maior discrepância na comparação com os dados de Carvalho-Silva *et al.* (2001). Com relação às africanas, foi observado um valor bem superior na amostra do Centro-Oeste (8,5%) e no Brasil (2,5%). Referente à ameríndia, 1,5% da amostra total apresentou a mesma, sendo que esta não foi observada entre os indivíduos autodeclarados como “brancos”.

Foi observada uma discrepância entre as linhagens encontradas, as quais refletem ancestralidade, e a autodeclaração dos indivíduos. No caso da amostra do Distrito Federal, onde a porcentagem de linhagens europeias foi de 91,6%, essa idéia é muito clara: essa estimativa é muito superior à proporção

de indivíduos que se autodeclararam “brancos” (53,5%). Das linhagens encontradas no Distrito Federal, 5,6% do total são africanas. Esse valor é baixo quando comparado ao número de indivíduos que se autodeclararam como tendo ancestrais africanos na amostra (pardos = 39,3%; negros = 3,6%). Apesar do cromossomo Y carregar uma parcela ínfima do genoma individual, este reflete diretamente a ancestralidade paterna. Esses dados corroboram a idéia de que a forma que os brasileiros se autodenominam é um pobre indicativo de ancestralidade (Parra *et al.*, 2003) e também o maior sucesso reprodutivo por parte dos homens europeus.

V.1.3. STRs (Short Tandem Repeats)

A utilização da análise dos polimorfismos dos microssatélites Y-específicos no estudo da variação, identificação de linhagem paterna e evolução humana e sido ilustrada por vários autores (González-Neira *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2001; Wanderley-Santos, 2001; Bosch *et al.*, 2001; Gusmão *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2001; Law *et al.* 2001; Oliveira, 2001; Trovoada *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Grattapaglia *et al.*, 2005; Palha *et al.*, 2006, dentre outros). Porém, apesar do uso dos microssatélites em comparações populacionais, não é possível afirmar que distribuições similares de frequências alélicas seja um reflexo direto de ancestralidade comum. Esse fato é decorrente da taxa de mutação, maior nessas regiões, que pode levar a mutações recorrentes proporcionando a mesma distribuição dos alelos de microssatélites (Santos e Tyler-Smith, 1996).

No presente trabalho analisamos quatro marcadores do tipo microssatélites: DYS19, DYS390, DYS391 e DYS393. Estes estão dentre os marcadores situados no cromossomo Y com maior volume de dados na literatura e fazem parte integrante do haplótipo mínimo do cromossomo Y (DYS19, DYS385-I, DYS385-II, DYS389-I, DYS389-II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) que é recomendado para uso forense (Bar *et al.*, 1997a; Bar *et al.*, 1997b). A escolha desses marcadores é justificada tanto com relação à sua contribuição no entendimento das relações populacionais, foco desse trabalho, como também pelo fato de poder compor um banco de dados com finalidade forense para a região Centro-Oeste.

V.1.3.1. Caracterização genética populacional por *locus*

As populações analisadas no presente trabalho apresentaram polimorfismo para todos os marcadores analisados, sendo a maioria com quatro alelos. A população de Goiás apresentou uma maior variabilidade em relação à do Distrito Federal com relação a dois dos marcadores STRs - DYS19 e DYS391 - e mesma variabilidade com relação aos demais, para os quais foram observadas as mesmas alternativas alélicas.

O marcador DYS19 foi o primeiro microssatélite situado no cromossomo Y a ser descrito na literatura (Roewer *et al.*, 1992). Este marcador mostra uma grande variabilidade em diferentes populações (Santos *et al.*, 1995), sendo que o número de alelos observados varia, assim como os alelos modais, quando se consideram as três principais populações parentais brasileiras.

No Distrito Federal foram encontrados três alelos (DYS19*13, *14 e *15) enquanto que em Goiás foram observados dois adicionais (DYS19*16 e *17), sendo que o DYS19*14 foi o alelo modal para ambas. Na população parental europeia foram encontrados cinco alelos (DYS19*13 ao DYS19*17), sendo que o modal é também o DYS19*14 (Gomolka *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1994; Santos e Tyler-Smith, 1996; Pérez-Lezaun *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2003). Em africanos subsaarianos foram encontrados os mesmos alelos observados na Europa, porém o modal é o DYS19*15 (Santos e Tyler-Smith, 1996; Trovada *et al.*, 2001; Alvaréz *et al.*, 2001).

Entretanto, em ameríndios, o número de alelos varia de uma tribo para outra, sendo, em média, de três. Apesar dessa variação quanto ao número de alelos, na maioria das tribos o modal é o DYS19*13 (Zago *et al.*, 1996; Santos e Tyler-Smith, 1996; Vallinotto *et al.*, 1999). Em algumas populações nativas americanas, o alelo DYS19*15 foi encontrado com uma frequência variando de 6,0%, como nos Ojibwa e ameríndios da Argentina, a 47,0%, como entre os Navajos (Pena *et al.*, 1995; Deka *et al.*, 1996; Underhill *et al.*, 1996; Scozzari *et al.*, 1997). Portanto, há variação quanto ao alelo modal nas populações parentais: alelo DYS19*13 nas populações ameríndias, DYS19*15 nas populações africanas e DYS19*14 nas populações europeias.

Em populações urbanas brasileiras foi observado o mesmo alelo modal, DYS19*14 (Santos e Tyler-Smith, 1996; Costa *et al.*, 2002; Grattapaglia *et al.*, 2005) encontrada na amostra aqui estudada, porém observa-se diferenças quanto à presença/ausência dos alelos. O alelo DYS19*16, não encontrado no Sudeste brasileiro, e o DYS19*17, relatado nas regiões Centro-Oeste e Sul (Grattapaglia *et al.*, 2005) foram encontrados em baixa frequência no Estado de Goiás. Já o alelo DYS19*12 observado no Nordeste brasileiro em baixa frequência, não foi encontrado no presente estudo (Grattapaglia *et al.*, 2005). Em afro-descendentes brasileiros, as mesmas alternativas alélicas foram encontradas, sendo que o alelo mais freqüente foi o DYS19*15 (Rodríguez-Delfin *et al.*, 1997; Ribeiro, 2005), a exemplo das populações africanas subsaarianas (Trovoada *et al.*, 2001).

As duas populações aqui analisadas apresentaram quatro alelos para a repetição tetranucleotídica DYS390 - DYS390*22, *23, *24 e *25 – sendo que o alelo DYS390*24 foi o modal. Em populações européias e ameríndias verificou-se o mesmo alelo modal e foi encontrado de quatro a seis alelos - DYS390*21 a DYS390*25 e o DYS390*27 - (Pérez-Lezaun *et al.*, 1997; Wanderley-Santos, 2001; Carvalho *et al.*, 2003). Em africanos, esse marcador é bimodal apresentando sete alelos (DYS390*20 a *26), sendo que o mais freqüente é o DYS390*21 (Trovoada *et al.*, 2001).

Populações urbanas brasileiras apresentam um máximo de seis alelos para esse marcador (DYS390*21 a DYS390*26) e também apresentam o alelo DYS390*24 como modal (Oliveira *et al.*, 2002; Grattapaglia *et al.*, 2005). No presente trabalho, os alelos DYS390*21 e DYS390*26 não foram observados. Estes mesmos alelos foram encontrados com baixa frequência, mas não em todas as regiões brasileiras. O alelo DYS390*21 não foi encontrado na região Sul, enquanto que o DYS390*26 não foi observado nas regiões Centro-Oeste e Norte (Grattapaglia *et al.*, 2005).

Com relação ao marcador DYS391, foram encontradas quatro alternativas alélicas (DYS391*8 a *11) na população do Estado de Goiás e três para o Distrito Federal (DYS391*9 a *11). O alelo DYS391*8 é raro, tendo sido observado, sempre em baixas frequências, no Norte da África, Hungria e Taiwan (Bosch *et al.*, 2001; Wu e Pu, 2001). O alelo DYS391*12, não

observado no presente estudo, foi relatado nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, em baixas frequências (Grattapaglia *et al.*, 2005).

Em geral, o marcador DYS391 apresenta entre quatro e cinco alelos (Ruiz-Linares *et al.*, 1999; González-Neira *et al.*, 2000; Grattapaglia *et al.*, 2005). Nas populações parentais da população brasileira o alelo modal é o DYS391*10 (Trovoada *et al.*, 2001; Wanderley-Santos, 2001; Carvalho *et al.*, 2003). Em europeus, o alelo DYS391*11 também apresenta altas frequências, sendo modal em algumas populações como, por exemplo, no País Basco e na Catalunha (González-Neira *et al.*, 2000).

No presente estudo o alelo *10 foi o modal em ambas as populações. Em populações urbanas brasileiras tanto o alelo DYS391*10 como o *11 apresentam-se como modal, a depender da região e da amostra considerada. No Nordeste, assim como em uma amostra de euro-descendentes, o alelo DYS391*11 apresentou-se modal, enquanto que, nas demais regiões, o modal é o DYS391*10 (Oliveira *et al.*, 2002; Grattapaglia *et al.*, 2005).

O último tetranucleotídeo aqui avaliado, o DYS393, apresentou quatro alelos (DYS393*12, *13, *14 e *15) na amostra da região Centro-Oeste brasileira, sendo o DYS393*13 o modal. Na população parental européia foram encontrados de quatro a cinco alelos (Pérez-Lezaun *et al.*, 1999; González-Neira *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2003), enquanto que em africanos foi verificado, além dos alelos observados na população do Centro-Oeste brasileiro, o DYS393*17 em baixa frequência (Trovoada *et al.*, 2001). As populações parentais apresentam como modal o mesmo alelo da região Centro-Oeste brasileira.

Populações urbanas e ameríndias do Sul do país apresentaram o mesmo alelo como modal (Rodriguez-Delfin *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2002). O alelo DYS393*15, evidenciado em baixas frequências no presente estudo, não foi observado em duas (NE e SE) das cinco regiões brasileiras. O alelo DYS393*11, não observado aqui, foi encontrado, com frequências inferiores a 1%, nas regiões Norte, Sudeste e Sul do Brasil (Grattapaglia *et al.*, 2005).

Portanto, dos quatro marcadores STR analisados, o único que apresenta alelos modais distintos para cada uma das três populações parentais é o

DYS19, sendo que as populações aqui analisadas apresentaram como alelo modal o mesmo observado na população parental européia. Para o marcador DYS390, o alelo modal observado aqui é o mesmo que o descrito para europeus e ameríndios e distinto do africano. Os alelos modais para os demais marcadores são os mesmos para as populações parentais e as aqui analisadas.

V.1.3.2. Diferenciação populacional

A estrutura genética das populações quanto aos dados dos STRs do cromossomo Y foi avaliada pela análise de variância molecular (AMOVA), a qual analisa o percentual de variação genética a ser calculada em dois níveis: dentro e entre as populações (Excoffier *et al.*, 1992). As populações do Estado de Goiás e do Distrito Federal apresentaram diferença estatisticamente significativa considerando essa categoria de marcadores genéticos, em decorrência das diferenças de frequências para dois dos quatro *loci* analisados: DYS390 e DYS391.

Na comparação entre o banco de dados dos marcadores STRs Y-específicos gerado nesse trabalho e o publicado para o Brasil (Grattapaglia *et al.*, 2005) foi observada que a maior parte das diferenças populacionais encontra-se com relação a amostra do Centro-Oeste aqui apresentada. Essas diferenças podem ser reflexo da amostragem. Enquanto no presente trabalho a estratégia de amostragem visou a coleta de material de indivíduos nascidos no Estado de Goiás e no Distrito Federal, independente do nível socioeconômico e de autodeclaração racial, a amostra de Grattapaglia *et al.* (2005) foi obtida de indivíduos que buscaram um serviço de investigação de paternidade particular.

De acordo com Callegari-Jacques *et al.* (2003) que trabalhou com uma amostra de origem similar à de Grattapaglia *et al.* (2005), essa composição amostral pode causar desvios visto que de acordo com o IBGE, há diferenças na composição de ancestralidade entre as classes socioeconômicas brasileiras. As estimativas de mistura genética obtida para as cinco regiões geográficas brasileiras utilizando essas amostras mostraram uma contribuição européia alta e similar entre as regiões (Callegari-Jacques *et al.*, 2003). Os

valores obtidos são intermediários aos estimados para marcadores do cromossomo Y e do DNA mitocondrial de indivíduos autodeclarados “brancos” (Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001).

Esses dados podem estar refletindo que a amostra de investigação de paternidade é composta majoritariamente por indivíduos euro-descendentes que possivelmente se autodeclarariam “brancos”. No caso da presente amostra, há uma similaridade entre a distribuição por cor da pele obtida pelo IBGE (2000) e a autodeclaração dos sujeitos de pesquisa do Distrito Federal (53,5% Brancos, 39,3 % Pardos, 3,6% Negros e 3,6 % Amarelos).

V.1.3.3. Haplótipos do cromossomo Y

Pelo fato dos microssatélites situados na região não recombinante do cromossomo Y serem completamente ligados, as informações dos vários *loci* são combinadas para construir haplótipos de microssatélites (Roewer *et al.*, 1996; Kayser *et al.*, 1997b). Atualmente, é considerado o sistema haplotípico mais informativo (Underhill, 2003), sendo que uma comparação mais robusta pode ser realizada utilizando os haplótipos ao invés das frequências de um dado *locus* (González-Neira *et al.*, 2000). Estes apresentam particular aplicabilidade na genética de população e na identificação humana do sexo masculino devido à sua alta capacidade discriminatória.

Uma análise utilizando haplótipos de microssatélites do cromossomo Y gerados a partir de um conjunto de nove *loci* STRs em uma população alemã, revelou completa individualização de todos os 70 indivíduos do sexo masculino analisados (Kayser *et al.*, 1997a). Estes dados revelam a alta capacidade discriminatória deste marcador e seu enorme potencial para propósitos forenses e em genética de população (Kayser *et al.*, 1997b).

A análise haplotípica de microssatélites na região Centro-Oeste brasileira mostrou uma grande variabilidade de haplótipos. Dos duzentos cromossomos Y analisados, setenta e dois diferentes haplótipos foram identificados, sendo que a maior frequência de haplótipos distintos foi observada na população do Estado de Goiás.

V.1.3.4. Diversidade genética

A alta diversidade haplotípica em todas as populações analisadas reflete a alta variabilidade intrapopulacional dos haplótipos STR do cromossomo Y. A diversidade haplotípica, estimada segundo a metodologia de Nei (1973), foi elevada em ambas as populações ($0,964 \pm 0,007$ para Goiás e $0,976 \pm 0,008$ para o Distrito Federal), justificando, assim, que a análise em conjunto (haplótipos) favorece uma melhor diferenciação das populações.

V.1.3.5. Mistura genética

A proporção de mistura genética das duas populações localizadas na região Centro-Oeste brasileira – Estado de Goiás e Distrito Federal – foi estimada utilizando os quatro marcadores uniparentais do tipo STR situados no cromossomo Y e a inserção *AluYAP*. Esses marcadores são informativos para análise de mistura, pois mostram diferenças de frequências entre as populações parentais.

Os resultados da análise de mistura gênica indicam a participação das três principais populações que povoaram o país, o que corrobora os dados históricos de que a população do Centro-Oeste é trihíbrida, a exemplo do restante do Brasil. A contribuição de linhagem europeia na região Centro-Oeste brasileira foi substancialmente maior - cerca de 80,0% - em ambas as populações em comparação com as outras parentais. A contribuição da linhagem africana foi em torno de 10% e da ameríndia menos de 10,0%. Esses dados, similares aos obtidos para os haplogrupos de cromossomo Y, também evidenciam o sucesso reprodutivo dos homens europeus e euroderivados, também caracterizado por possuírem condições sócio-econômicas melhores que os demais.

V.1.4. Marcadores genéticos Y-específicos: uma comparação

De acordo com os dados gerados a partir de AMOVA utilizando os *loci* STRs observamos uma diferença estatisticamente significativa entre as populações de Goiás e Distrito Federal. Porém, essa diferença não foi observada para os marcadores do tipo SNPs. Para os dois casos, a exemplo

do que sempre ocorre com análises de populações humanas, a maior parte da diferenciação genética foi verificada dentro das comunidades e a menor entre elas. Como há uma diferença entre as populações na análise dos STRs, o percentual da variação observada cuja fonte é definida a partir das diferenças interpopulacionais é maior na análise por STRs. Esse dado é interessante, uma vez que o poder informativo dos STRs suplantou a distinção haplotípica observada na análise de 11 SNPs associado à inserção *AluYAP*.

V.1.4.1. Associação SNPs/STRs/*AluYAP*

A taxa relativamente alta de mutação dos microssatélites do cromossomo Y o faz útil para o propósito de se comparar grupos populacionais relativamente próximos em comparação com populações que divergiram há muito tempo atrás. Estes marcadores sozinhos oferecem pouco auxílio para traçar eventos ancestrais na evolução humana. Mas, combinados com marcadores de mutações pontuais do cromossomo Y podem revelar eficientemente a origem de populações humanas e a história de sua migração. Associados, os marcadores do tipo STRs e SNPs, podem ser, provavelmente, o melhor método de escolha para investigar a evolução humana quanto a contribuição masculina (Kayser *et al.*, 1997a).

Apesar do poder de discriminação já conseguido pela quantidade de alternativas alélicas e, conseqüentemente, haplotípicas obtidas para os marcadores de microssatélites, os dados dos marcadores de evento único (SNPs) foram adicionados visando aumentar ainda mais esse poder. A construção dos haplótipos associados SNPs/STRs/*AluYAP* revelou 118 haplótipos para 200 cromossomos analisados, isto é, aproximadamente 61,0% mais haplótipos do que quando considerou-se os STRs exclusivamente. Com isso, o poder de discriminação aumentou substancialmente.

A diversidade gênica (Nei 1973) da população do Distrito Federal foi similar ($0,990 \pm 0,0002$) à do Estado de Goiás ($0,993 \pm 0,0001$). Já a análise de AMOVA realizada para esse conjunto de dados mostrou resultados semelhantes aos já descritos para os marcadores STR analisados separadamente, isto é, as populações apresentam diferenças estatisticamente

significativas ($p= 0,029\pm 0,002$), sendo que novamente a maior porcentagem de variação encontrou-se dentro das populações.

V.2. Contribuição uniparental feminina

A análise da variabilidade do DNA mitocondrial tem sido uma ferramenta potente no entendimento da evolução humana (Ingman e Gyllensten, 2001). Uma das abordagens que tem levado ao estabelecimento das relações filogeográficas entre grupamentos humanos é a análise da variabilidade desse genoma (Alvaréz et al., 2001). No presente trabalho analisamos treze SNPs localizados na região codificadora do DNA mitocondrial e uma deleção de 9pb na região COII/tRNALys, em amostras de indivíduos não relacionados maternalmente das populações do Distrito Federal e Goiás. Esses marcadores foram selecionados visando à avaliação da presença/ausência de haplogrupos característicos de linhagens ameríndias, africanas e européias, ou seja, das principais populações parentais brasileiras. Essas análises permitiram a definição dos haplogrupos da maioria dos indivíduos amostrados, assim como a determinação da origem filogeográfica dos mesmos.

O haplogrupo mitocondrial mais freqüente em ambas as populações foi o A (Goiás – 17,8% e Distrito Federal – 15,5%), seguido, no Estado de Goiás pelo haplogrupo B e C e no Distrito Federal, pelo C e B. O haplogrupo D apresentou freqüência mais baixa e similar em ambas as populações. Os subhaplogrupos do haplogrupo L foram, em conjunto, também bastante comuns, sendo que os mesmos apresentaram uma freqüência maior no Estado de Goiás do que no Distrito Federal. Porém, em ambos os casos, essa proporção foi menor do que as dos haplogrupos A a D. Já o haplogrupo H foi o menos freqüente nas duas populações.

Análises filogenéticas do genoma mitocondrial de ameríndios revelou que a maioria é classificada dentro de quatro grupos distintos de linhagens, pertencentes aos haplogrupos A, B, C e D (Horai *et al.*, 1993; Salzano, 2002; Starikovskaya *et al.*, 2005). É postulado que os haplogrupos A, C e D, que representam 58,0% do DNA mitocondrial encontrado no Sul da Sibéria, vieram para a América a partir do Norte da Sibéria cruzando o estreito de Bering. A

presença da deleção de 9-pb, característica do haplogrupo B, pode ter chegado mais tarde ou, alternativamente, vindo de outra região, pois está virtualmente ausente na Sibéria e é encontrado em baixa frequência no Norte da América do Norte. Ainda, a diversidade na seqüência dos haplótipos pertencentes ao haplogrupo B em nativos americanos é menor do que a observada quanto aos haplótipos pertencentes aos haplogrupos A, C ou D. Na Ásia, o haplogrupo B é encontrado principalmente na costa, na Mongólia, Tibet e em Taiwan (Torroni *et al.*, 1993a; Merriwether e Ferrell, 1996). Em amostras de ameríndios da Amazônia, os haplogrupos A e C foram os mais freqüentes e o haplogrupo B, o menos freqüente (Mendes-Júnior, 2005). Em outro estudo foram observadas as quatro linhagens, sendo que a frequência dos haplogrupos A, B e C foram similares e o D foi o menos freqüente (Santos *et al.*, 1996).

No estudo aqui apresentado, verificamos a presença de todos os haplogrupos característicos de ameríndios, que somados representaram 48,9 e 43,7% das amostras do Estado de Goiás e Distrito Federal, respectivamente. Esses dados evidenciam a alta contribuição desse grupo parental na constituição da população do Centro-Oeste.

Diversos estudos já foram realizados na América com populações miscigenadas utilizando o genoma mitocondrial na estimativa de contribuição dos grupos parentais. Por exemplo, em populações afro-colombianas nenhum dos haplogrupos característico de ameríndios foi identificado (Rodas *et al.*, 2003). No Uruguai, país em que se assumiu por muito tempo que a população era euroderivada e que a contribuição biológica da população ameríndia e de afrodescendentes era ínfima, foram encontrados, na cidade de Tacuarembó, 62% de haplogrupos ameríndios (Bonilla *et al.*, 2004). Em outra cidade do Uruguai, Melo, o genoma mitocondrial mostrou que 29% das linhagens eram ameríndias (Sans *et al.*, 2002). Em um trabalho com brasileiros autodefinidos como “brancos” foi observado que 33% das linhagens pertencentes a quatro das cinco regiões do país (exceto Centro-Oeste) são ameríndias (Alves-Silva *et al.*, 2000), sendo que a maior frequência foi observada no Norte e a menor no Sul do país. Em populações afrodescendentes urbanas e semi-isoladas brasileiras foram encontradas, em baixa frequência, haplogrupos ameríndios com pequenas variações entre essas comunidades (Abe-Sandes *et al.*, 2002).

No presente trabalho observou-se um predomínio de linhagens ameríndias nas amostras do Centro-Oeste, como já comentado.

Entre europeus, mais de 98,0% da variação dos haplogrupos de DNA mitocondrial são categorizados nos haplogrupos H, I, J, K, M, T, U, V, W e X. Dentre os haplogrupos característicos de origem européia, o H apresenta a mais alta frequência (Torrioni *et al.*, 1996), tendo sido observado em 45,7% dos dados SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) (Budowle *et al.*, 2003). Além do H, os haplogrupos europeus mais comuns no conjunto de dados do SWGDAM são U (15,6%), T (10,5%), J (10,0%) e K (8,9%), sendo que estes valores observados são similares a outras análises publicadas (Budowle *et al.*, 2003). O haplogrupo U é encontrado também em populações africanas, porém em baixas frequências (Torrioni *et al.*, 1996).

Foram investigados os haplogrupos H, J, K e T na população do Centro-Oeste, porém apenas o H foi observado, sendo que 10,85% da população do Estado de Goiás e 11,30% no Distrito Federal pertencem a esse haplogrupo. O haplogrupo H é o mais freqüente (27 a 65%) na maioria dos indivíduos autodeclarados “brancos” brasileiros analisados por Alves-Silva *et al.* (2000) e em brancos do sudeste brasileiro (Abé-Sandes, 2002). Somente a região Norte apresentou dois haplogrupos (H e T) como os mais freqüentes (Alves-Silva *et al.*, 2000).

Os haplogrupos T e J foram encontrados em amostras de brasileiros das quatro regiões analisadas com frequências se estendendo de 3 a 27% (Alves-Silva *et al.*, 2000). Já em amostras de descendentes de asiáticos e afro-brasileiros urbanos e semi-isolados, esses mesmos haplogrupos não foram observados (Abé-Sandes, 2002). O haplogrupo K foi encontrado em baixa frequência em amostras de asiáticos e de “brancos” (Abé-Sandes, 2002).

O macrohaplogrupo L* é africano sendo que a maior parte dos mesmos (68,0% a 100,0%) pertence ao haplogrupo L (Chen *et al.*, 2000). Destes, o haplogrupo L1 é considerado o mais ancestral dos haplogrupos africanos, e o L2, o mais recente (Chen *et al.*, 2000). Os haplogrupos maiores (L1 e L2) são freqüentes em Moçambique e em brasileiros com ancestralidade africana (Brehm *et al.*, 2002). Dentre os haplogrupos analisados que caracterizam as

linhagens africanas, o haplogrupo menor L1 foi o mais freqüente nas populações do Estado de Goiás e do Distrito Federal.

O haplogrupo mais freqüente em três das quatro regiões brasileiras foi o L3e, mas na região Sul o haplogrupo L3d apresentou freqüência preponderante (Alves-Silva *et al.*, 2000). Já em populações afro-descendentes semi-isoladas e urbanas de Salvador, o haplogrupo L3a é o mais freqüente (Abé-Sandes, 2002). Os haplogrupos L3d e L1b, específicos do Oeste da África, ocorrem em uma freqüência de 10% de indivíduos brasileiros autodeclarados “brancos” (Alves-Silva *et al.* 2000). Para este par de haplogrupos, freqüências maiores são encontradas no Oeste da África: 25,0% no Senegal e 17,0% entre os indivíduos de Songhai, Yoruba, Hausa, e Kanuri. Isto sugere que a maioria das linhagens de DNA mitocondrial ancestral africano nas amostras brasileiras teve sua origem na África Central (a qual inclui Camarões e Angola), embora um número substancial deve ter vindo do Oeste da África (Bortolini *et al.*, 1997; Alves-Silva *et al.*, 2000).

Nem todas as amostras analisadas neste trabalho foram classificadas dentro das linhagens de DNA mitocondrial, totalizando 6,2% das amostras estudadas na população de Goiás e 11,3% no Distrito Federal. Consideramos essas como amostras “não-ameríndias/ não-africanas” pois não exibiam nenhum dos sítios de restrição analisados. Possivelmente esses indivíduos pertencem a linhagens européias não analisadas.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as populações ($p > 0,05$) para todos os *loci* de DNA mitocondrial analisados. Valores F_{st} *locus a locus* demonstram a alta homogeneidade da amostra em relação a esse conjunto de marcadores.

V.2.1. Mistura genética utilizando marcadores do DNA mitocondrial

Foram realizadas comparações entre os dados obtidos no presente estudo e dados da literatura referentes a uma amostra de indivíduos autodeclarados como “brancos” de quatro das cinco regiões brasileiras e do Brasil como um todo (Alves-Silva *et al.*, 2000). Como não há diferenças quanto aos haplogrupos de DNA mitocondrial entre as populações de Goiás e do

Distrito Federal, o conjunto amostral foi agrupado e denominado “Centro-Oeste”.

A distribuição das frequências dos haplogrupos do DNA mitocondrial agrupados por origem geográfica (ancestralidade) dos dados da literatura mostra que a proporção das linhagens européias, africanas e ameríndias são muito similares, quando se considera o país como um todo (Alves-Silva *et al.*, 2000). Já nas amostras do Centro-Oeste houve um predomínio de linhagens ameríndias. Porém, as regiões Norte e Sudeste, apresentaram os haplogrupos característicos de linhagens ameríndias/asiáticas com maior frequência, similar ao aqui observado.

A comparação par a par dos resultados obtidos pelos marcadores de DNA mitocondrial entre as cinco regiões brasileiras e o Brasil, utilizando o método F_{st} mostrou valores discrepantes, estatisticamente significativos ($p < 0,05$), entre a população do Centro-Oeste e as regiões Sudeste, Sul e o conjunto amostral denominado Brasil. Apesar da amostra de Alves-Silva *et al.* (2000) ser composta por indivíduos autodeclarados como “brancos”, foi observada diferença estatisticamente significativa nos haplogrupos observados entre as regiões Sudeste e Nordeste e entre a região Sul e todas as regiões do país. Essas diferenças encontradas entre a região Sul e as demais regiões brasileiras devem refletir o processo de povoamento do país e a subsequente miscigenação. A região Sul ainda hoje é a região brasileira com maior contingente de eurodescendentes não miscigenados, sendo encontradas, por exemplo, cidades que são redutos de países europeus, sendo que seus habitantes mantêm laços culturais fortes com os países de origem.

Com relação às estimativas de mistura genética baseada nos haplogrupos do DNA mitocondrial, não foram observadas diferenças na composição das populações de Goiás e Distrito Federal e do conjunto amostral (Centro-Oeste brasileiro). Porém, a comparação dos dados aqui gerados com dados da literatura mostrou diferenças estatisticamente significantes entre o Centro-Oeste e todas as regiões brasileiras para pelo menos um dos grupos parentais. A região Sul do país foi a que mostrou o maior volume de discrepâncias.

Essas diferenças devem ser decorrentes das amostras utilizadas por Alves-Silva et al. (2000) serem de indivíduos autodefinidos como “brancos”. Por outro lado, as diferenças entre o Brasil como um todo e as várias regiões devem refletir as diferenças regionais na composição do povo brasileiro e que indivíduos que se autodeclaram brancos em uma dada região não apresentam o mesmo perfil genético que em outra.

V.3. Comparação entre a contribuição parental masculina e feminina

O objetivo deste trabalho foi a caracterização da contribuição genética parental em duas amostras urbanas da região Centro-Oeste brasileira utilizando marcadores genéticos de herança uniparental. Esses marcadores (Y-específicos e situados no DNA mitocondrial) podem fornecer informações sobre os padrões de fluxo gênico entre homens e mulheres e serem úteis para detectar cruzamento direcional. Esses marcadores, associados aos autossômicos, descrevem a história global de mistura (Martinez-Marignac *et al.*, 2004).

Em populações miscigenadas, a contribuição genética parental específica através da análise de marcadores uniparentais pode ser de diferentes proporções devido ao cruzamento direcional durante o processo de mistura genética. A análise de mistura baseada em DNA, especialmente aquelas que utilizam marcadores situados no cromossomo Y e DNA mitocondrial, são especialmente interessantes porque se pode determinar a contribuição materna e paterna, inclusive ao nível individual (Sans, 2000).

V.4. Comparação individual: Y versus DNA mitocondrial

A avaliação do compartilhamento de origem geográfica entre as linhagens materna e paterna em um mesmo indivíduo revelou que em Goiás menos de 15,0% apresentaram tanto o cromossomo Y e o DNA mitocondrial de mesma origem (doze de linhagem européia, seis de linhagem africana e um de linhagem ameríndia). A grande maioria dos indivíduos apresentou a linhagem paterna distinta da materna. Quando o cromossomo Y foi identificado ser de linhagem européia, a contribuição uniparental feminina mostrou-se pertencer as

três linhagens: ameríndia, africana e européia. A proporção dessa contribuição é diferenciada nessa observação, sendo a contribuição ameríndia com quase 50%, seguida pela africana e menor proporção, a européia. Analisando o Distrito Federal verificamos que a maioria dos indivíduos é oriunda de miscigenação, pois menos de 20% apresentaram tanto o cromossomo Y quanto o mitocondrial de mesma origem (treze de linhagem européia e um de linhagem africana). Os demais indivíduos apresentaram a linhagem materna de origem geográfica distinta da paterna.

Considerando a contribuição uniparental masculina africana no Estado de Goiás, observa-se a contribuição materna das três linhagens sendo, uma maior frequência da africana, seguida da ameríndia e uma pequena parcela da européia. Já na população do Distrito Federal a contribuição materna é predominante de ameríndios seguidos de uma pequena porcentagem de africanos. Não foi encontrado indivíduo portando simultaneamente linhagem paterna africana com linhagem materna européia nessa última população. Para os indivíduos que apresentam Y advindos da Europa (linhagem européia), observamos que a contribuição materna novamente aparece com as três linhagens (ameríndia, africana e européia), caracterizando o cruzamento preferencial de homens europeus com mulheres ameríndias, seguidos em menor proporção, de mulheres africanas seguido de européias.

Analisando a contribuição uniparental paterna como sendo de linhagem ameríndia foi observado apenas um indivíduo em cada população, sendo que a contribuição materna do indivíduo do Estado de Goiás foi ameríndia e o do Distrito Federal não foi possível ser identificada com a utilização dos sítios de restrição analisados. Semelhante a essa contribuição observou-se que a asiática não foi observada na população do Estado de Goiás e foi revelada em apenas um indivíduo na população do Distrito Federal, sendo que a contribuição materna desse indivíduo também não foi identificada.

Em resumo observa-se, claramente, através da análise da contribuição genética individual, que houve um cruzamento preferencial entre homens europeus e mulheres, seqüencialmente, ameríndias, africanas e européias. Os dados do cromossomo Y e do DNA mitocondrial mostram evidências de

contribuição genética advindas das três populações parentais que colonizaram o país.

V.5. Comparação populacional: Y versus DNA mitocondrial

A análise de mistura genética baseada na origem geográfica dos haplogrupos mostrou que a contribuição paterna europeia foi semelhante nas populações de Goiás e no Distrito Federal (~ 90,0%), porém a contribuição materna europeia observada para as mesmas populações foi bem inferior. Goiás apresentou uma contribuição africana paterna (10,0%) e materna (34,9%) maior do que o Distrito Federal (5,6% e 26,7%, respectivamente). A contribuição ameríndia mostrou uma enorme discrepância entre a contribuição materna e paterna: 48,9% e 0,8% em Goiás e 43,7% e 2,8% no Distrito Federal.

As análises mostram uma predominância da parental europeia na constituição da população da região Centro-Oeste brasileira, quando se refere ao cromossomo Y. Os outros dois grupos parentais, africanos e ameríndios, mostraram-se em um pequeno percentual sendo que a contribuição parental africana é mais expressiva que a ameríndia. Já nas análises do DNA mitocondrial observa-se o inverso, sendo a maior contribuição para a região de linhagens ameríndias, seguidas de africanas e europeias.

Como relatado acima, a análise de nossos dados mostra que a maioria dos haplogrupos do cromossomo Y originou da Europa, seguidos pelos haplogrupos africanos e uma limitada participação de haplogrupos ameríndios. Quando a contribuição ameríndia é analisada, todos os resultados são coerentes em sugerir que a contribuição feminina é muito maior do que a contribuição masculina. (Bortolini *et al.*, 1999; Sans, 2000;). Tal afirmativa é confirmada com a análise do DNA mitocondrial que revela resultados diferentes dos obtidos com marcadores situados no cromossomo Y. Observa-se a maioria dos haplogrupos sendo de linhagem ameríndia em ambas as populações, seguidas de linhagens africanas e uma pequena fração de linhagens europeias. Nossos dados demonstram uma diferença entre a contribuição

masculina e feminina para a constituição genética da população da região Centro-Oeste brasileira.

Várias análises têm sido realizadas com o intuito de verificar a proporção de mistura genética em populações. A introdução de genes europeus através dos homens em indivíduos afroderivados habitantes da área urbana do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil foi confirmada utilizando marcadores autossômicos e um uniparental (Bortolini *et al.*, 1999). Em análises de marcadores STRs autossômicos, em cinco regiões brasileiras, a contribuição européia mostra-se substancialmente superior às demais populações parentais (Callegari-Jacques *et al.*, 2003). Dados semelhantes foram observados em populações da América Latina onde se observou o fluxo gênico entre homens europeus e mulheres nativas americanas (Bonilla *et al.*, 2004). O mesmo foi observado em indivíduos afrodescendentes dos Estados Unidos, estimada com alelos específicos de populações, DNA mitocondrial e com o marcador AluYAP onde os resultados indicam que a contribuição masculina européia foi maior que a contribuição feminina (Parra *et al.*, 1998).

A comparação de dados de marcadores STRs autossômicos com dados de DNA mitocondrial (de Alves-Silva *et al.*, 2000) de populações de quatro das cinco regiões do Brasil, revelou contribuições distintas, sendo que as estimativas obtidas com STRs mostrou uma maior contribuição européia enquanto que o DNA mitocondrial mostrou uma presença equitativa entre as três parentais (Callegari-Jacques *et al.*, 2003). Outro trabalho com indivíduos afroderivados do Sul do país utilizando dados de marcadores biparentais, revela a presença de genes europeus e africanos na mesma proporção no *pool* de genes nucleares desta população. Entretanto, sugere uma assimetria, com mulheres africanas e homens europeus contribuindo em proporções maiores para a formação daquela população (Bortolini *et al.*, 1999).

Análises utilizando marcadores situados no DNA mitocondrial em indivíduos brasileiros urbanos autodeclarados como “brancos”, das diferentes regiões geográficas, demonstram que há diferença na contribuição parental feminina. A maior parcela de contribuição de linhagens ameríndias foi nas regiões Norte e Sudeste, enquanto que no Nordeste foi africana e na região Sul, a européia (Alves-Silva *et al.*, 2000). Ressalte-se que esse resultado da

região Sul, com um percentual superior a 60,0% pode ser reflexo da amostra analisada (indivíduos autodeclarados “brancos”), e ainda por essa região ser fundamentalmente formada por comunidades de descendentes de europeus. Já nas análises de marcadores situados no cromossomo Y em indivíduos que se autodeclararam como “brancos” (Carvalho-Silva *et al.*, 2001) de regiões geográficas brasileiras distintas, houve um predomínio de ancestrais europeus (68,0 a 81,0%), com uma ínfima contribuição de linhagens africanas (0,11% a 0,18%) seguidas de ameríndias (0,07 a 0,18%). Esse resultado, reprodução preferencial do homem europeu, é similar ao observado por outros autores, tanto para populações urbanas como a aqui descrita, como para populações semi-isoladas como remanescentes de quilombos (Bortolini *et al.*, 1999; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Alves-Silva *et al.*, 2000)

Estes dados confirmam os relatos históricos e sociológicos do povoamento brasileiro. Houve um cruzamento interétnico assimétrico em relação ao sexo no Brasil colonial, entre homens europeus e mulheres africanas e ameríndias, os quais contribuíram desproporcionalmente para o povoamento do país (Salzano e Freire-Maia, 1970; Callegari-Jacques *et al.*, 2003). Esse cruzamento proporcionou uma mistura genética entre homens derivados de europeus com mulheres derivadas de africanos e/ou ameríndios, com uma ínfima proporção em relação a descendentes de seu próprio continente.

No presente trabalho, uma alta contribuição de homens europeus em relação a homens africanos e ameríndios e uma maior contribuição de mulheres ameríndias do que de outros grupos étnicos. Assim, analisar mistura com o objetivo de entender melhor nosso passado, enriquecido pelo uso de marcadores moleculares uniparentais, mostra a possibilidade de escrever mais claramente a história, considerando a contribuição masculina e feminina.

VI. CONCLUSÕES

1. A população do Centro-Oeste foi fundada predominante por homens *YAP* - (ausência de inserção). A alta frequência do alelo ausência de inserção pode refletir contribuição européia e/ou ameríndia e uma baixa contribuição africana;
2. Os marcadores bialélicos situados no cromossomo Y revelaram que a maioria dos *loci* é polimórfico, a exceção dos *loci* M60, M34 e P3, os quais apresentaram monomorfismo;
3. A diversidade gênica, considerando os doze *loci* bialélicos situados no cromossomo Y, foi similar nas duas populações;
4. A população do Estado de Goiás apresentou seis haplogrupos todos compartilhados com o Distrito Federal, sendo que este apresentou outros dois haplogrupos – R1b8 e D1. Apesar do maior número de haplogrupos, a diversidade gênica foi similar nas duas populações;
5. A análise de AMOVA dos dados dos marcadores binários do cromossomo Y confirmou a similaridade genética entre as duas populações;
6. Haplogrupos Y-específicos característicos dos três principais grupos étnicos fundadores da população brasileira foram observados em ambas as populações. Destes, a linhagem européia perfaz a grande maioria;
7. As estimativas de frequência de contribuição genética para as duas populações, baseados em haplogrupos Y-específicos, são similares em relação à origem européia e africana e são estatisticamente diferente com relação à contribuição ameríndia/asiática;
8. Ambas as populações apresentaram polimorfismo para todos os marcadores do tipo STRs analisados;
9. A análise de AMOVA dos marcadores do tipo STRs mostrou alta variabilidade dentro das populações e uma diferença estatisticamente significativa entre elas;
10. Semelhante ao resultado obtido para os marcadores do tipo SNP, os marcadores do tipo STRs apresentam alta diversidade gênica;

11. De acordo com a análise de mistura genética estimada com os dados dos marcadores STRs, a maior parcela de contribuição para a formação da região Centro-Oeste foi homens com origem europeia;
12. A análise conjugada dos marcadores do tipo SNPs e STRs mostrou que ambas as populações apresentam alta variabilidade e diferenças estatisticamente significativas entre elas;
13. Foi observada a presença dos haplogrupos de DNA mitocondrial característicos das três principais populações parentais. Dentre as três origens, a maior contribuição foi da ameríndia, seguida da africana e, em menor proporção da europeia;
14. Semelhante aos marcadores do tipo SNPs, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as populações para todos os *loci* de DNA mitocondrial analisados;
15. Há diferença significativa quanto à contribuição dos três grupos parentais, europeu, africano e ameríndio, para a população do Centro-Oeste quando se comparam os valores obtidos com os dados dos marcadores do cromossomo Y e com os dados do DNA mitocondrial;
16. Em ambas populações, quando o cromossomo Y identificado foi de linhagem europeia, a contribuição uniparental feminina pertencia a uma das três linhagens parentais, sendo a maioria de origem ameríndia, seguida pela africana, tendo, a europeia sido minoria, o que caracteriza o cruzamento direcional.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abé-Sandes K. (2002) Diversidade genética de afro-brasileiros: DNA mitocondrial e cromossomo Y. Tese de Doutorado em Genética de Populações) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).
- Abé-Sandes K, Silva-Júnior WA, Zago MA. (2004) Heterogeneity of the Y Chromosome in Afro-Brazilian populations. *Hum Biol.* 76 (1): 77-86.
- Affara NA, Lau Y-FC, Briggs H, Davey P, Jones MH, Hhwaja O, Mitchell M, Sargent C. (1994) Report of the First International Workshop on Y Chromosome Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 67:360-387.
- Aler M, Salas A, Gisbert M, Carrecedo A. (2001) Data for nine autosomal STRs markers from Valencia (East Mediterranean coast of the Iberian Peninsula). *Forensic Science International.* 116:37-39.
- Alford RL, Hammond HA, CotoI, Caskey CT. (1994) Rapid and Efficient Resolution of Parentage by Amplification of Short Tandem Repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 55:190-195.
- Alvaréz JC, Entrala C, Lorente JA, Lorente M, Fernández-Rosado FJ, Martínez-Espin E, Rodrigues E, Villanueva E. (2001) Análises de ADN mitocondrial. *Forénsica.* 1(1): 40-59.
- Alves-Silva J, Santos MS, Pena SDJ, Prado VF. (1999) Multiple geographic sources of region V 9-pb deletion haplotypes in Brazilians. *Human Biology.* 71:245-259.
- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, Prado VF.(2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *American Journal Of Human Genetics.* 67(2):444-461.
- Anderson S, Bankier AT, Barriell AG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Sanger F, Scheir PH, Smith AJH, Staden R, Young, C. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457-465.
- Arantes LC. (1999) Análise da variação genética em treze locos STR na população do Distrito Federal. Dissertação de Mestrado. UnB. 150pp.

- Armour JAL, Anttinen T, May CA, Veja EE, Sajantilla A, Kidd JR, Kidd KK, Bertranpetit J, Paabo S, Jeffreys AJ. (1996) Minisatellite diversity supports a recent African origin for modern humans. *Nat Genet.* 13:154-160.
- Balding DJ, Nichols RA. (1995) A method for quantifying differentiation between populations at multi allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. *Genetica.* 96:3-12.
- Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A, Gan YY, Hodge JA, Hassan K., Chen KH, Wallace DC. (1992) Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient Mongoloid migrations. *Genetics.* 130:139-152.
- Bandelt H, Alves-Silva j, Guimarães P, Santos M, Brehm A, Pereira L, Coppa A, Larruga J, Rengo C, Scozzari R, Torroni A, Prata M, Amorim A, Prado V, Pena SD. (2001) Phylogeography of the human mitochondrial L3e: a snapshot of African prehistory and Atlantic slave trade. *Ann. Hum. Genet.* 65:549-563.
- Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B. (1997a) DNA recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Society of Forensic Genetics. Int. J. Legal Med.* 110:175-176.
- Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B. (1997b) DNA recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Society of Forensic Genetics. Forensic. Sci. Int.* 87:181-184.
- Batista-dos-Santos SE, Rodrigues JD, Ribeiro-dos-Santos AKC, Zago MA. (1999) Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the Amazon Region as revealed by mtDNA and Y-DNA. *Am J Phys Anthropol.* 109:175-180.
- Bever RA, Creacy S. (1994) Validation and Utilization of Commercially Available STR Multiplexes for Parentage Analysis. *Fifth Intern. Symp. on Hum. Identif.* 61-68.
- Bianchi NO, Bailliet G, Bravi CM, Carnese RF, Rothhammer F, Martínez-Marignac VL, Imbice SDJP. (1997) Origin of Amerindian Y-Chromosomes

- as Inferred by the Analysis of Six Polymorphic Markers. *Am. Journ. of Phys. Anthrop.* 102:79-89.
- Bobrow M, Pearson PL, Pike MC, El-Alfi OS. (1971) Length variation in the quinacrine banding segment of human Y chromosomes of different sizes. *Cytogenetics.* 10:190-198.
- Bonato SL, Salzano FM. (1997) A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci. USA* 94:1866-71.
- Bonilla C, Bertoni B, Gonzalez S, Cardoso H, Brum-Zorrilla N, Sans M. (2004) Substantial native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *American Journal of Human Biology.* 16 (3): 289-297.
- Bortolini MC, Zago MA, Salzano FM, Silva Júnior WA, Bonatto SL, Silva MCBO, Weimer TA. (1997) Evolutionary and anthropological of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations. *Human Biology.* 69:141-159
- Bortolini MC, Silva Júnior WA, Guerra DC, Remonato G, Mirandola R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MCBO, Zago MA, Salzano FM. (1999) African-derived South American populations: a history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *Am J Hum Biology.* 11: 551-563.
- Bosch E, Clarimón J, Pérez-Lezaun A, Calafell F. (2001) STR data for 21 loci in northwestern Africa. *Forensic Science International.* 116:41-51.
- Bradman N, Thomas M. (1998) Why Y? The Y chromosome in the study of human evolution, migration and prehistory. *Science Spectra.* 14.
- Brehm A, Pereira L, Bandelt HJ, Prata MJ, Amorim A. (2002) Mitochondrial portrait of the Cabo Verde archipelago: the Senegambian outpost of Atlantic slave trade. *Ann. Hum. Genet.* 66, 49-60.
- Brion M, Dupuy DM, Heinrich M, Hohoff C, Hostle B, Ludes B, Mevag B, Morling N, Niederstatter H, Parson W, Sanchez J, Bender K, Siebert N, Thacker C, Vide C, Carracedo A. (2004) A collaborative study of the EDNAP group regarding Y-chromosomal binary polymorphism analysis. *Forensic Sci Int.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.foresciint> - Versão online – acesso em novembro de 2005.

- Budowle B, Monson KL. (1993) The forensic significance of various reference population databases for estimating the rarity of variable number of tandem repeat (VNTR) loci profiles *in* Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ. DNA Fingerprinting: State of the science. Birkhäuser Verlag. Switzerland. 466pp.
- Budowle B, Brown BL. (2001) El uso del análisis de ADN en la identificación forense. *Forénsica*. 1:9-22.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. (2003) Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 4:119-141.
- Butler JM, Levin BC. (1998) Forensic applications of mitochondrial DNA. *Tibtech*. 16:158-162.
- Bydlowski SP, Novak EM, Issa JS, Glannini SD, Diament J. (1996) DNA polymorphisms of apolipoprotein B and AI – CIII – AIV genes in a Brazilian population: a preliminary report. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29:1269-1274.
- Callegari-Jacques SM, Salzano FM. (1999) Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciênc Cult*. 51:166-174.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, Hutz MH. (2003) Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am Jour Hum Biology*. 15:824-834.
- Cann RL, Stokening M, Wilson AC. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 325:31-36.
- Carvalho M, Anjos M, Andrade L, Lopes V, Santos MV, Gamero J, Real, FC, Vide M. (2003) Y-chromosome STR haplotypes in two population samples: Azores Islands and Central Portugal. *Forensic Sci. Intern*. 134:29-35.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Hutz MH, Salzano FM, Pena SDJ. (1999) Divergent human Y-chromosome microsatellite evolution rates. *J. Mol. Evol*. 49:204-214.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. (2001) The phylogeography of Brazilian Y-Chromosome lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 68:281-286.

- Cavalli-Sforza LL, Piazza A, Menozzi P. (1994) History and geography of human genes. Princ. Univ. Press. Princeton, NJ.
- Cayres-Vallinoto IMV, Vallinoto ACR. (2003) Allele frequency distribution of six hypervariable *loci* (D1S80, APOB, D4S43, vW1, F13A and DYS19) in two African-Brazilian communities from the Amazon region. Gen. and Molec. Biol. 26(3):235-240.
- Chantratita W, Rerkamnuaychote B, Jomsawat U, Thanakitgosate J, Ruangvithayanon T, Rojanasunan P. (2001) D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 and D7S820. Forensic Sci. Intern. 115:113-115.
- Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, Wallace DC. (1995) Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. Am. J. Hum. Genet. 57:133-149.
- Chen YS, Olckers A, Schurr TG, Kogelnik AM, Huoponen K, Wallace DC. (2000) mtDNA variation in the South African kung and Khwe – and their genetic relationships to other African populations. Am. J. Hum. Genet. 66:1362-1383.
- Codeplan – www.codeplan.gov.df.com - sítio acessado em 1997, 2005 e 2006.
- Costa NA, Silva R, Moura-Neto R. (2002) Y-chromosome variation in a Rio de Janeiro, Brazil, population sample. Forensic Sci. Intern. 126:254-257.
- Cotrim NH, Auricchio MTBM, Vicente JP, Otto PA, Mingroni-Netto RC. (2004) Polymorphic *Alu* Insertions in six Brazilian african-derived populations. Am. J. Hum. Biol. 16:264-277.
- Cunha MC. (1998) Introdução a uma história indígena. In: Cunha MC (ed) História dos índios no Brasil. Companhia das Letras, São Paulo.
- Curtin PD (1969) The Atlantic slave trace: a census. The University of Wisconsin Press, Milwaukee.
- Deka R, Shriver MD, Yu LM, Ferrell RE, Chakraborty R. (1995) Intra- and inter-population diversity at short tandem repeat loci in diverse populations of the world. Electroph. 16:1659-1664.

- Deka R, Jin L, Shriver MD, Yu LM, Sasha N, Barrantes R, Chakraborty F, Ferrel R. (1996) Dispersion of human Y chromosome haplotypes based on five microsatellites in global populations. *Gen. Res.* 6:1177-1184.
- Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES, Botstein D, Akots G, Rediker KS, Gravius T, Brown VA, Rising MB, Parker C, Powers JA, Watt DE, Kauffman ER, Bricker A, Phipps P, Muller-Kahle H, Fulton TR, Ng S, Schumm JW, Braman JC, Knowlton RG, Barker DF, Crooks SM, Lincoln SE, Daly MJ, Abrahamson J. (1987) A genetic linkage map of human genome. *Cell.* 51:319-337.
- Dornelles CL, Callegari-Jacques SM, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHL, Hickmann AC, Geiger CJ, *et al.* (1999) Genetics, surnames, grandparents' nationalities, and ethnic admixture in southern Brazil - Do the patterns of variation coincide? *Genet. and Mol. Biol.* 22:151-161.
- Drobic K, Budowle B. (2000) The Analysis of Three Short Tandem Repeat (STR) Loci in the Slovene Population by Multiplex PCR. *Jour. For. Sci.* 45(4):893-895.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. (1991) DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49:746-756.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. (1992) Genetic Variation at Five Trimeric and Tetrameric Tandem Repeat Loci in Four Human Population Groups. *Genomics.* 12:241-253.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131:479-491.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. (1995) Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Lumma Consultoria Projetos e Informática, Brasília -DF. 220pp.
- Flores C, Maca-Meyer N, Pérez JA, Hernández M, Cabrera VM. (2001) Y-Chromosome Differentiation in Northwest Africa. *Hum. Biol.* 73(4):513-524.
- Futuyma DJ. (1998) *Evolutionary Biology.* 3.ed. Sinauer, Sunderland, MA. 751pp.

- Gill P, Evett I. (1995) Population genetics of short tandem repeat (STR) loci. *Genetica*. 96:69-87.
- Gomolka M, Hundrieser J, Nurnberg P, Roewer L, Epplen JT, Epplen C. (1994) Selected di- and tetranucleotide microsatellites from chromosomes 7, 12, 14 and Y in various Eurasian populations. *Hum. Genet.* 93:592-596.
- González-Neira A, Gusmão L, Brión M, Lareu MV, Amorim A, Carracedo A. (2000) Distribution of Y-chromosome STR defined haplotypes in Iberia. *Forensic Sci. Intern.* 110:117-126.
- Goodwin W, Scoular C, Linacre A. (2001) 13 STR loci frequency data from a Scottish population. *Forensic Sci. Intern.* 116:187-188.
- Grattapaglia D, Kalupniek S, Guimarães CS, Ribeiro MA, Diener PS, Soares CN. (2005) Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *For Sci Int.* 149: 99-107.
- Gusmão L, Prata MJ, Miranda C, Trovoada MJ, Amorim A. (2001) STR data from S. Tomé e Príncipe (Gulf of Guinea, West Africa). *Forensic Sci. Intern.* 116:53-54.
- Gutierrez G, Sanchez D, Marin A. (2002) A reanalysis of the ancient mitochondrial DNA sequences recovered from Neandertal bones. *Mol. Biol. Evol.* 19:1359-66.
- Hammer MF. (1994) A recent insertion of an *Alu* element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. *Mol. Biol. Evol.* 11:749-761.
- Hammer MF. (1995) A recent common ancestry for human Y chromosome. *Nature*. 378:376-378.
- Hammer MF, Zegura S. (1996) The role of the Y chromosomes in human evolutionary studies. *Evol. Anthropol.* 5:116-134.
- Hammer MF, Spurdle AB, Karafet T, Bonner MR, Wood ET, Novelletto A, Malaspina P, Mitchell RJ, Horai S, Jenkins T, Zegura SL. (1997) The geographic distribution of human Y chromosome variation. *Genetics*. 145:787-805.
- Hammer MF, Karafet T, Rasanayagam A, Wood ET, Altheide TK, Jenkins T, Griffiths RC, Templeton AR, Zegura SL. (1998) Out of Africa and back again: nested cladistic analysis of human Y Chromosome variation. *Mol. Biol. Evol.* 15:427-441.

- Hammer MF, Redd AJ, Wood ET, Bonner MR, Jarjanazi H, Karafet T, Santachiara-Benerecetti S, Oppenheim A, Jobling MA, Jenkins T, Ostrer H, Bonn -Tamir B. (2000) Jewish and Middle Eastern non-Jewish populations share a common pool of Y-chromosome biallelic haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(12):6769-6774.
- Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, Jarjanazi H, Santachiara-Benerecetti S, Soodyall H, Zegura SL. (2001) Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol. Biol. Evol.* 18:1189-1203.
- Hammer MF, Zegura S. (2002) The Human Y Chromosome Haplogroup Tree: Nomenclature and Phylogeography of its major Divisions. *Annu. Rev. Anthropol.* 31:303-321.
- Hammond HA, Caskey CT. (1992) Personal Identification via Short Tandem Repeats. *Proceedings from the Third International Symposium on Human Identification*. Promega Corporation. 162-175.
- Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chackraborty R. (1994) Evaluation of 13 Short Tandem Repeat Loci for Use in Personal Identification Applications. *Am. J. Hum. Genet.* 55:175-189.
- Hancock JM (1996) *Microsatellites and other simple sequences in the evolution of the human genome* in Jackson M, Strachan T and Dover G. Hum. Gen. Evol. BIOS. 306pp.
- Han MS, Kang PW, Choi DH, Lee YH, Choi SK, Kim W. (2001) Genetic variation at eight STR loci in the Korean population. *Forensic Sci. Intern.* 116: 35-36.
- Hashiyada M. (2000) Short tandem repeat analysis in japanese population. *Electroph.* 21:347-350.
- Heyer E, Puymirat J, Deltjes P, de Knijff P. (1997) Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Hum. Mol. Genet.* 6:799-803.
- High KA, Benz EJJr (1985) The ABCs of molecular genetics: a haematologist's introduction. In: *Recent Advances in Hematology* (Hoffbrand ed.) Churchill, London. 25-61.
- Higuchi R. (1989) Simple and rapid preparation of samples for PCR. In Erlich, H.A. *PCR technology: Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York, N. Y., USA.

- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S e Tajima K. (1993) Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10(1):23-47.
- Höss M. (2000). Neanderthal population genetics. *Nature.* 404:453-454.
- Hurles ME, Veitia R, Arroyo E, Armenteros M, Bertranpetit J, Pérez-Lezaun A, Bosch E, Shlumukova M, Cambon-Thomsen A, McElreavey K, López de Munain A, Röhl A, Wilson IJ, Singh L, Pandya A, Santos FR, Tyler-Smith C, Jobling MA. (1999) Recent male-mediated gene flow over a linguistic barrier in Iberia, suggested by analysis of a Y-Chromosomal DNA polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 65:1437-1448.
- IBGE - <http://www.ibge.gov.br/home/estatística/população>. Censo 1991, 2000 e Brasil: 500 anos de povoamento. Site acessado em outubro de 2004, fevereiro e março 2006.
- Ingman M, Gyllensten U. (2001) Analysis of the complete human mtDNA genome: methodology and inferences for human evolution. *The Am. Gen. Assoc.* 92:454-461.
- Inman K, Rudin N. (1997) *An Introduction to Forensic DNA Analysis*. CRC Press. New York. 256pp.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SW. (1985a) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature.* 314:67-73.
- Jobim LF, Costa LR, Silva M. (2006) *Identificação Humana: identificação pelo DNA, Identificação Médico-Legal, Perícias Odontológicas*. Millennium, v.2. 302pp.
- Jobling MA, Tyler-Smith C (1995) Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *TIG.* 11:449-456.
- Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. (1997) The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.* 110:118-124.
- Jobling MA. (2001) In the name of the father: surnames and genetics. *Trends of Genet.* 17:353-357.
- Jobling MA, Tyler-Smith C. (2003) The human Y-chromosome: an evolution marker comes of age. *Nat. Genet.*, volume 4.
- Karafet T, Zegura SL, Vuturo-Brady J, Posukh O, Osipova L, Wiebe V, Romero F, Long JC, Harihara S, Jin F, Dashnyam B, Gerelsaikhan T, Omoto K,

- Hammer MF. (1997) Y chromosome markers and Trans-Bering Strait dispersals. *Am. J. Phys. Anthropol.* 102(3):301-314.
- Karafet T, Zegura SL, Posukh O, Osipova L, Bergen A, Long JC, Goldman D, Klitz W, Harihara S, de Kniff P, Wiebe V, Griffiths RC, Templeton AR, Hammer MF. (1999) Ancestral Asian source(s) of new world Y-chromosome founder haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (3):817-831.
- Kayser M, De Knijff P, Dieltjes P, Krawczak M, Nagy M, Zerjal T, Pandya A, Tyler-Smith C, Roewer L. (1997a) Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping. *Electroph.* 18:1602-1607.
- Kayser M, Cagliá A, Corach D, Fretwell N, Gehring C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Hersog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawcsak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Piccinini A, Pérez-Lezaun A, Prinz M, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Weichhold G, De Kniff P, Roewer L. (1997b) Evaluation of Y chromosomal STRs: a multicenter study. *Int. J. Leg. Med.* 110:125-133.
- Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke L, Henke J. (2000) Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1580-1588.
- Krawczak M (1999) Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphism. *Electrof.* 20:1676-1681.
- Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevedo E, Freire-Maia A, Yasuda N. (1965) Racial admixture in north-eastern Brazil. *Ann. Hum. Genet.* 29:113-125.
- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell.* 90:19-30.
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF. (1998) Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10774-10778.
- Law MY, Wong DM, Fung WK, Chan KL, Li C, Lun TS, Lai KM, Cheung KY, Chiu CT. (2001) Genetic polymorphism at three STR loci – CSF1PO, HUMTH01, and TPOX, and the AMP-FLP locus D1S80 for the Chinese population in Hong Kong. *Forensic Sci. Intern.* 115:103-105.

- Lins AM, Sprecher CJ, Puers C, Schumm JW. (1996) Multiplex Sets for the Amplification of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci – Silver Stain and Fluorescence Detection. *BioTechniques*. 20:882-889.
- Lleonart R, Riego E, Suárez RR, Ruiz RT, de la Fuente J. (1999) Analysis of DNA from ancient bones of a pre-columbian cuban woman and a child. *Genet. and Mol. Biol.* 22(3):285-289.
- Luft R. (1994) The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:8731-8738.
- Maca-Meyer N, González AM, Larruga JM, Flores C, Cabrera VM. (2001) Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. *BMC Genet.* 2:13-21.
- Malaspina P, Cruciani F, Ciminelli BM, Terrenato L, Santolamazza P, Slonso A, Banyko J, Brdicka R, García O, Gaudiano C, Guanti G, Kidd KK, Lavinha J, Avila M, Mandich P, Moral P, Qamar R, Mehdi AQ, Ragusa A, Stefanescu G, Caraghin M, Tyler-Smith C, Scozzari R, Novelletto A. (1998) Network analyses of Y-chromosomal types in Europe, Northern Africa and Western Asia reveal specific patterns of geographic distribution. *Am. J. Hum. Genet.* 63:847-860.
- Martinez-Jarreta BM, Roche PD, Abecia E. (1999) Genetic variation at six STR loci (HUMTH01, HUMPTPOX, HUMCSF1PO, HUMF13A01, HUMFES/FPS, HUMVWFA31) in Aragon (North Spain). *Forensic Sci. Intern.* 100:87-92.
- Martinez-Marignac VI, Bertoni B, Parra EJ, Bianchi NO. (2004) Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. *Hum. Biol.* 76(4):543-557.
- Mateu E, Comas D, Calafell F, Perez-Lezaun, Abade A, Bertranpetit J. (1997) A tale of two islands: population history and mitochondrial DNA sequence variation of Bioko and São Tomé, Gulf of Guinea. *Ann. Hum. Genet.* 61:507-518.
- Mendes-Júnior CT. (2005) DNA mitocondrial na Amazônia brasileira: estrutura genética regional e inferências continentais. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

- Merriwether DA, Ferrel RE. (1996). The Four Founding Lineage Hypothesis for the New World: A Critical Reevaluation. *Molec. Phyl. and Evolut.* 5:1(241-246).
- Mesa NR, Mondragón MC, Soto ID, Parra MV, Duque C, Ortiz-Barrientos D, Garcia LF, Velez ID, Bravo ML, Munera JG, Beboya G, Bortolini MC, Ruiz-Linares A. (2000) Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in amerinds: pre- and post-colombian patterns of gene flow in South America. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1277-1286.
- Meyer T, Arndt R, Stock-Fleth E, Flammann HT, Wolf H, Reischl U. (1995) Strategy for Typing Human Papillomaviruses by RFLP Analysis of PCR Products and Subsequent Hybridization with a Generic Probe. *Biotechniques.* 19(4):632-639.
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD, Sukernik RI, Olckers A, Wallace DC. (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *PNAS.* 100(1):171-176.
- Mitchell J, Hammer MF (1996) Human evolution and the Y chromosome. *Genet. and Develop.* 6:737-742.
- Muller S, Gomolka M, Walter H. (1994) The specific SSLP of the locus DYS19 in four different European samples. *Hum. Hered.* 44:298-300.
- Mullis KB. (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* 36-43.
- Nei M. (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70(12):3321-3323.
- Nielsen R. (2000) Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms. *Genet.* 154:931-942.
- Oliveira RN. (2001) Allele frequency of Y chromosome loci DYS390, DYS391 and DYS393 in Brazilian subjects and their use for identification. *Genet. Mol. Res.* 1(4):371.
- Oliveira RN, Nunes FD, Anzai EK, Daruge E, Mesquita RA, Ozaki NA, Hirata RDC, Hirato MH. (2002) Population studies of the Y-chromosome of loci

- DYS390, DYS391 and DYS393 in Brazilian subjects and its use in human identification. *J. For. Odont.* 20:6-9.
- Oliveira SF. (1999) Inserções Alu em populações indígenas da Amazônia brasileira. Tese (Doutorado em Genética de Populações) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).
- Oliveira SF, Pedrosa MAF, Ribeiro GGBL, Ferreira LB, Inglês AP, Ramos GT, Sousa SMB, Klatau-Guimarães MN, Simões AL. (2003) Uni- and Bi-parental analyses of the genetic contribution in an afro-descendent community in Central Brazil. *Biología de poblaciones humanas: Diversidad, tiempo, espacio*. Organizador: José E. Egocheaga. Editora: Universidad de Oviedo p.609-616, ISBN: 84-609-1519-0.
- Palacín L (1994) O século do ouro em Goiás. UCG Goiânia/ Goiás - Brasil. 150pp.
- Palacín L, Moraes MAS. (1994) História de Goiás. UCG Goiânia/ Goiás - Brasil. 122pp.
- Palacín L, Costa L R, Silva M. (1995) História de Goiás em documentos I. Colônia. UFG Goiânia/ Goiás – Brasil. 222pp.
- Palha TJBF, Rodrigues EMR, Batista dos Santos SE. (2006) Y-chromosomal STR haplotypes in a population from the Amazon region, Brazil. *Forensic Sci. Intern.* www.elsevier/locate/foresciint. Sítio acessado em 03/2006. Versão online.
- Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, Forrester T, Allison DB, Deka R, Ferrell RE, Shriver MD. (1998) Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1839-1851.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS.* 100:177-182.
- Pena SDJ, Jeffreys AJ. (1993) Breve Introdução às Impressões Digitais de DNA. *Rev. Bras. Genet.* 16(3):857–879.
- Pena SDJ, Santos FR, Bianchi NO, Bravi CM, Carnese RF, Rothhammer F, Gerelsaikhan T, Munkhutuja B, Oyunsuren T. (1995) A mahor founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. *Nature Genet.* 11:15-16.

- Pereira L, Macaulay V, Torroni A; Scozzari Prata MJ, Amorim A. (2001) Prehistoric and historic traces in the mtDNA of Mozambique: insight into the Bantu expansions and the slave trade. *Ann.Hum.Genet.* 65:439-458.
- Pérez-Lezaun A, Calafell F, Seielstad M, Mateu E, Comas D, Bosch E, Bertranpetit J. (1997) Population genetics of Y-chromosome Short Tandem Repeats in humans. *J. Mol. Evol.* 45:265-270.
- Pérez-Lezaun A, Calafell F, Comas D, Mateu E, Bosch E, Martinez-Arias R, Clrimón J, Fiori G, Luiselli D, Facchini F, Pettener D, Bertranpetit J. (1999) Sex-specific migration patterns in Central Asian populations, revealed by analysis of Y-chromosome short tandem repeats and mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 65:208-219.
- Petkovski E, Keyser-Tracqui R, Hienne R, Ludes B. (2005) SNPs and MADI-TOF MS: tools for DNA typing in forensic paternity testing and anthropology. *J. Forensic Sci.* 50:535-541.
- Reis JJ; Gomes F. (1996) *Liberdade por um fio. História dos quilombos no Brasil.* São Paulo; Companhia das Letras, Editora Schwarcz.
- Ribeiro D. (1995) *O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil.* Companhia das Letras, São Paulo.
- Ribeiro, GGBL. (2005) *Contribuição genética masculina, baseada em marcadores Y-específicos, na constituição de quatro comunidades afrodescendentes brasileiras.* Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília (UnB).
- Richards M, Macaulay V, Torroni A, Bandelt H (2002) In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 71:1168-1174.
- Rodas C, Gelvez N, Keyeux G. (2003) Mitochondrial DNA studies show asymmetrical Amerindian admixture in Afro-Colombian and Mestizo populations. *Hum. Biol.* 75(1):13-30.
- Rodriguez-Delfin L, Santos SEB, Zago MA. (1997) Diversity of the human Y chromosome of South American Amerindians: a comparison with blacks, whites, and Japanese from Brazil. *Am. Hum. Genet.* 61:439-448.
- Rodriguez-Delfin LA. (1999) *Diversidade do cromossomo Y em populações ameríndias, negróides, caucasóides e asiáticas.* Tese de Doutorado. USP. Ribeirão Preto.

- Roewer L, Arnemann J, Spurr NK, Grzeschik K-H, Epplen JT. (1992) Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum. Genet.* 89:389–394.
- Roewer L, Kayser M, Dieltjes P, Nagy M, Bakker E, Krawczak M, De Kniff P. (1996) Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y chromosome specific microsatellites in two closely related human populations. *Hum. Mol. Genet.* 5:1029-1033.
- Ruiz-Linares A, Ortíz-Barrientos D, Figueiroa M, Mesa N, Múneras JG, Bedoya G, Vélez ID, García LF, Pérez-Lezaun A, Bertranpetit J, Feldman MW, Goldstein DB. (1999) Microsatellites provide evidence for Y chromosome diversity among the founders of the New World. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:6312-6317.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1986) Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele specific oligonucleotide probe. *Nature.* 324:163–166.
- Saitou N. (1995) A genetic affinity analysis of human populations. *Hum. Evol.* 10(1):17-33.
- Salas A, Richards MFTD, Lareu MV, Sobrino B, Sánchez-Diz P, Macaulay V, Carracedo A. (2002) The making of the African mtDNA landscape. *Am. J. Hum. Genet.* 71:1082-1111.
- Salzano FM e Freire-Maia N. (1970) *Problems in human biology: a study of Brazilian populations.* Detroit, MI: Wayne State University Press.
- Salzano FM. (1986) Em busca das raízes. *Ciência Hoje.* 5:48-53.
- Salzano FM, Callegari-Jacques SM. (1988) *South American Indians: a case study in evolution.* Research Monographs on Human Population Biology. n.6 Clarendon Press. Oxford.
- Salzano FM. (1998) Genetic diversity of South-American human populations at the DNA and protein levels. *Jour. Experim. Zool.* 282:157-63.
- Salzano FM. (2002) Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *Anais da Acad. Brasil. Ciênc.* 74(2):223-263.
- Sans M. (2000) Admixture studies in Latin America: from the 20th to 21st century. *Hum. Biol.* 72(1)155-177.

- Sans M, Weimer TA, Franco MHP, Salzano FM, Bentancor N, Alvarez I, Bianchi NO, Chakraborty R. (2002) Unequal contributions of male and female gene pools from parental populations in the African descendants of the city of Melo, Uruguay. *Am. Jour. Phys. Anthropol.* 118(1):33-44.
- Santos FR, Gerelsaikhan T, Munkhtuja B, Oyunsuren T, Epplen JT, Pena SDJ. (1995) Geographic differences in the allele frequencies of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19. *Hum. Genet.* 97:309-313.
- Santos SEB, Guerreiro JF. (1995) The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian Amazon region. *Rev. Bras. Genet.* 18:311-315.
- Santos FR, Carvalho-Silva DR, Pena SDJ. (1999) PCR-based DNA profiling of human Y chromosomes. In: *DNA profiling and DNA fingerprinting* (eds J.T. EPPLEN e T. LUBJUN), p.133-152, Basel: Birkhäuser Verlag AG.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. (2000) *ARLEQUIN, version 2.000: a software for population genetics data analysis*. Geneva. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Schumm JW, Lins A, Puers C, Sprecher C. (1995) Development of Nonisotopic Multiplex Amplification Sets for Analysis of Polymorphic STR Loci. *First Europ. Sympos. Hum. Identif.* 177-181.
- Schumm JW, Lins AM, Micka KA, Sprecher CJ, Rabbach DR, Bacher JW. (1997) Automated Fluorescent Detection of STR Multiplexes – Development of the *GenePrint™* PowerPlex™ and FFFL Multiplexes for Forensic and Paternity Applications. *First Europ. Sympos. Hum. Identif.:* 90-104.
- Scozzari R, Cruciani F, Santolamazza P, Sellitto D, Cole DEC, Rubin LA, Labuda D, Marini E, Succa V, Cona G, Torroni A. (1997) mtDNA and Y chromosome specific polymorphisms in modern OJIBWA: Implications about the origin of their gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 60:241-244.
- Seielstad M, Hebert JM, Lin AA, Underhill PA, Ibrahim M, Vollrath D, Cavalli-Sforza LL (1994) Construction of human Y-chromosomal haplotypes using a new polymorphic A to G transition. *Hum. Mol. Gen.* 3(12):2159-2161.
- Shriver MD, Mei R, Parra EJ, Sonpar V, Halder J, Tishkoff SA, Schurr TG, Zhadanov SI, Osipova LP, Brutsaert TD, Friedlaender J, Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ, Gutierrez G, Loi H, Matsuzaki H, Kittles RA, Argyropoulos G, Fernandez JR, Akey JM. (2005) Large-scale SNP analysis

- reveals clustered and continuous patterns of human genetic variation. *Human Genomics*. 2(2):81-89.
- Silva R, Moura - Neto RS (1998) Allelic frequency distribution for three VNTR markers – D6S132, D7S467, D17S26 – in Rio de Janeiro population, Brazil. *Forensic Sci. Intern.* 94: 33-38.
- Smith KD, Young KE, Talbot CC Jr, Schmeckpeper BJ. (1987) Repeated DNA of the human Y chromosome. *Development* 101 Suppl:77-92.
- Starikovskaya EB, Sukernik RI, Derbeneva OA, Volodko NV, Ruiz-Pesini E, Torroni A, Brown MD, Lott MT, Hosseini SH, Huoponen K, Waallace DC. (2005) Mitochondrial DNA diversity in Indigenous populations on the Southern extent of Siberia, and the origins of native American haplogroups. *Ann. Hum. Genet.* 69:67-89.
- Stoneking M, Hedgecock D, Higuch RG, Vigilant L and Erlich HA (1991) population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am. J. Hum. Genet.* 48 (2): 370-382.
- Strauss E. (1999) MtDNA shows signs of paternal influence. *Science*. 286:24-36.
- Tahir MA, Balamurugan K, Tahir UA, Amjad M, Awin MB, Chaudhary OR, Hamby JE, Budowle B, Herrera RJ. (2000) Allelic distribution of nine short tandem repeat (STR), HLA – DQA1, and polymarker loci in Omani sample population. *Forensic Sci. Intern.* 109: 81-85.
- Telenius H, Clark J, Marcus E, Royle N, Jeffreys AJ, Ponder BAJ, Mathew CGP. (1990) Minisatellite DNA Profiles: Rapid Sample Identification in Linkage Analysis. *Hum Hered.* 40:77-80.
- Tishkoff SA, Pakstis AJ, Stoneking M, Kidd JR, Destro-Bisol G, Sajantila A, Lu RB, Deinard AS, Sirugo G, Jenkins T, Kidd KK, Clark AG (2000) Short Tandem-Repeat Polymorphism/Alu Haplotype Variation at the PLAT locus: implications for Modern Human Origins. *Am. J. Hum. Genet.* 67:901-925.
- Torroni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJE, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM, Wallace DC. (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and

the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genet.* 130(1):153-162.

Torroni A, Sukernik RI, Schurr TG, Starikovskaya YB, Cabell MF, Crawford MH, Comuzzie AG, Wallace DC. (1993a) mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 53:591-608.

Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. (1993b) Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 53(3):563-590.

Torroni A, Lott MT, Cabel MF, Chen Y, Lavergne L, Wallace DC. (1994a) mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* 55:760-776.

Torroni A, Chen Y, Semino O, Santachiara-Beneceretti AS, Scott Cr, Lott MT, Winter M, Wallace DC. (1994b). mtDNA and Y-chromosome polymorphism in four native American populations from Southern Mexico. *Am. J. Hum. Genet.* 54:303-318.

Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus M, Wallace DC. (1996) Classification of european mtDNA from an analysis of three european populations. *Genet.* 144:1835-1850.

Trovoada MJ, Alves C, Gusmão L, Abade A, Amorim A, Prata MJ. (2001) Evidence for population sub-structuring in São Tomé e Príncipe as inferred from Y-chromosome STR analysis. *Ann. Hum. Genet.* 65:271-283.

Underhill PA, Jin L, Zemans R, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL. (1996) A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:196-200.

Underhill PA, Jin L, LIN AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. (1997) Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Gen. Res.* 7(10):996-1005.

Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonn e-Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P, Ibrahim M, Jenkins T, Kidd

- JR, Mehdi SQ, Seielstad MT, Wells RS, Piazza A, Davis RW, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL, Oefner P. (2000) Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat Genet.* 26:358-361.
- Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Shen P, Lahr MM, Foley RA, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL (2001). The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann. Hum. Genet.* 65:43-62.
- Underhill PA. (2003) Inferring Human History: Clues from Y-Chromosome Haplotypes. Department of Genetics, Stanford University School of the Medicine. *Symposia on Quantitative Biology.* v.LXVIII:487-493.
- Vallinoto ACR, Cayres-Vallinotto IMV, Ribeiro-dos-Santos AKC, Zago MA, Santos SEB, Guerreiro JF. (1999) Heterogeneity of Y chromosome markers among Brazilian Amerindians. *Am. J. Hum. Biol.* 11:481-487.
- Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. (1989) Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(23):9350-9354.
- Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. (1991) African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science.* 27; 253 (5027):1503-1507.
- Wallace DC, Torroni A. (1992) American indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: a review. *Hum. Biol.* 64:403-416.
- Wallace DC (1997) Mitochondrial DNA in Aging and Disease. *Scient. Amer.* 22-29.
- Wanderley-Santos. (2001) STRs autossômicos e ligados ao cromossomo Y em indígenas brasileiros. Tese de Doutorado. Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Wu F & Pu C. (2001) Multiplex DNA typing of short tandem repeat loci on Y-chromosome of Chinese population in Taiwan. *Forensic Sci. Intern.* 120:213-222.
- Yamamoto T, Uchihi R, Nozawa H, Huang XL, Leong YK, Tanaka M, Mizutani M, Tamaki K., Katsumata Y. (1999) Allele Distribution at Nine STR Loci - D3S1358, VWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 and

D7S820 – in the Japanese Population by Multiplex PCR and Capillary Electroph. *J. Forensic Sci.* 44(1):167-170.

Y CHROMOSOME CONSORTIUM. (2002) The nomenclature system of the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Gen. Res.* 12:339-348.

Zago MA, Silva Jr WA, Tavella MH, Santos SEB, Guerreiro JF, Figueiredo MS. (1996) Interpopulational and Intrapopulational Genetic Diversity of Amerindians as Revealed by Six Variable Number of Tandem Repeats. *Hum. Hered.* 46:274-289.

Zerjal T, Beckman L, Beckman G, Mikelsaar AV, Krumina A, Kucinskas V, Hurles ME, Tyler-Smith C. (2001) Geographical, linguistic, and cultural influences on genetic diversity: y-chromosomal distribution in Northern European populations. *Mol. Bio. Evol.* 18(6):1077-1087.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Termo de consentimento utilizado na coleta do material biológico dos indivíduos do Estado de Goiás.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, natural de _____, nascido em ____/____/____, portador do R.G. nº. _____ SSP _____, residente em _____ filho de _____ (natural de _____) e de _____ (natural de _____) de etnia: _____

Telefone: _____

Declaro para os devidos fins:

- I. que fui convidado (a) a participar de uma pesquisa científica que tem por objetivo estabelecer um banco de dados de DNA da população do Estado de Goiás, onde serei submetido a uma coleta sanguínea venosa com um volume de 5,0 ml (cinco mililitros);
- II. que me foi explicado que o material coletado será utilizado exclusivamente para análise de frequência de marcadores genéticos da população;
- III. que me foi explicado a finalidade do estudo e os benefícios que dele a ciência possa vir a ter;
- IV. que me foi explicado e garantido que posso recusar a participar do presente estudo;
- V. que me foi garantido sigilo dos dados pessoais acima discriminados;
- VI. que os resultados obtidos nessa pesquisa poderão ser publicados em periódicos e eventos científicos ou quaisquer outros veículos de comunicação;
- VII. que não fui submetido à transfusão sanguínea e/ou transplante de medula óssea;
- VIII. que, por livre e espontânea vontade, concordo em participar deste estudo e após ler e sem ter quaisquer dúvidas, assino.

_____, ____/____/20____

Doador

Testemunha com R.G.

Pesquisador responsável

Pesquisador responsável

Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado na coleta do material biológico dos indivíduos do Distrito Federal.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, PÓS-
INFORMAÇÃO

O abaixo assinado,

_____ declara ter sido plenamente esclarecido, lido e ouvido o presente termo de responsabilidade que lhe informa estar ciente do seguinte:

- a) Que pelo presente documento concorda em participar da pesquisa “Brasília: reflexo da constituição genética brasileira?” visando a caracterização genética da população brasiliense e a comparação desta com populações urbanas brasileiras.
- b) Que esta participação implicará na retirada de aproximadamente 5ml de sangue de uma das veias do antebraço sendo que este material será utilizado com finalidade de tipagem sangüínea, análise hemoglobina, extração de DNA, análise de marcadores moleculares e marcadores protéicos e isoenzimáticos.
- c) Que esse procedimento é método usual na pesquisa genética, não implicando risco para a saúde, podendo, porém, provocar um pouco de dor.
- d) Que a recusa em participar do projeto poderá ser feita a qualquer tempo mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento e ficará livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento bastando a comunicação aos responsáveis do projeto.

Brasília, ____ de _____ de 2001

Assinatura : _____

Documento de identidade: _____

Responsável pela pesquisa: _____

Anexo 4: Processamento de amostras para estocagem

O intuito deste procedimento foi à separação do material biológico em três frações sanguíneas, são elas: plasma, creme leucocitário e hemácias. Esta etapa caracterizou-se por sucessivos processos de centrifugação e lavagem do sangue total com salina.

4.1 Reagentes:

- ✓ Salina 0,9%;
- ✓ Glicerol a 40% em citrato tripotássio 0,1M, KH_2PO_4 0,0345M, K_2HPO_4 0,0344M

4.2 Procedimento:

- a) Identificar três tubos de polipropileno de 1,5 ml com o número de registro do protocolo;
- b) Centrifugar a amostra (3000 rpm) por cinco minutos;
- c) Retirar o plasma e estocar;
- d) Retirar o creme leucocitário e estocar para posterior extração do DNA;
- e) Acrescentar solução salina 0,9%, homogeneizar e centrifugar;
- f) Repetir os procedimentos duas vezes mais;
- g) Após a última centrifugação, retirar o sobrenadante e adicionar tampão glicerol 40%;
- h) Estocar para análise de proteínas eritrocitárias e como fonte de DNA;
- i) Estocar em freezer a 20° C negativos.

Anexo 5: Protocolos de extração de DNA

5.1 Extração de DNA segundo método proposto por Higuchi (1989)

A técnica descrita por Higuchi (1989) foi utilizada para extração de DNA a partir da fração de hemácias.

5.1.1 Reagentes e soluções:

- ✓ Tampão para lise de eritrócitos: Tris/HCl 0,01M pH 7,6; sacarose 0,32 M; MgCl₂ 5mM; Triton X-100 1%.
- ✓ Tampão para lise de leucócitos: Tris/HCl 0,01M pH 8,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; NP-40 0,45%; Tween 20 (ou 80) 0,45%.
- ✓ Proteinase K 10 mg/ml.

5.1.2 Procedimento:

- a) Transferir 300 µl da fração de hemácias e leucócitos para um microtubo de polipropileno de 1,5 ml estéril;
- b) Adicionar 1,0 ml do tampão de lise de eritrócitos e homogeneizar;
- c) Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto e descartar o sobrenadante;
- d) Repetir esse procedimento até que o precipitado fique claro, indicando ausência de contaminação com hemoglobina. Normalmente três vezes são suficientes;
- e) Ressuspender o precipitado em 300 µl de tampão de lise de leucócito acrescido de 5 µl de solução de proteinase K;
- f) Manter em estufa regulada a 65°C por 1 hora;
- g) Manter em estufa regulada a 37°C durante uma noite;
- h) Aquecer a solução a 94°C por 10 minutos para inativar a proteinase K;
- i) Estocar a 20°C negativos.

5.2 Extração de DNA segundo o Kit “GFX™ Genomic Blood Purification Kit” – adquirido da Amersham Pharmacia Biotech Inc.

1ª etapa:

- a) Adicionar, em um tubo de microcentrífuga, 300 µl da amostra de sangue e três volumes da solução de lise pré-aquecida a 70°C;
- b) Homogeneizar o tubo por inversão;
- c) Incubar a temperatura ambiente por cinco minutos;
- d) Centrifugar em alta rotação (12000 rpm) por vinte segundos;
- e) Remover o sobrenadante, por aspiração, tomando-se o cuidado para não atingir o aglomerado de células brancas;

2ª etapa:

- a) Ressuspender as células brancas;
- b) Adicionar 500 µl da solução de extração;
- c) Homogeneizar vigorosamente;
- d) Incubar por 5 (cinco) minutos em temperatura ambiente.

3ª etapa:

- a) Transferir para a coluna GFX;
- b) Centrifugar (5000 rpm) por 1 minuto;
- c) Descartar o volume do tubo coletor;
- d) Aplicar à coluna GFX novo volume de 500 µl de tampão de extração;
- e) Centrifugar (5000 rpm) por 5 minutos;

4ª etapa:

- a) Adicionar 500 µl de solução de lavagem à coluna GFX;
- b) Centrifugar em alta rotação (12000 rpm), durante 3 minutos;
- c) Descartar e transferir a coluna para um novo tubo coletor;

5ª etapa:

- a) Adicionar 100-200 µl de água mili-Q (pré-aquecida) à coluna GFX;
- b) Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto;

- c) Centrifugar (8000 rpm) por 1 minuto, para a recuperação do DNA purificado.

5.3 Extração de DNA segundo o Kit “Puregene – Gentra-Systems” – adquirido da Biosystems

1ª etapa:

- a) Adicionar 300 µl da amostra de sangue e 900 µl de solução de lise RBC a um tubo de centrífuga;
- b) Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- c) Inverter gentilmente o tubo várias vezes durante a incubação. No caso de sangue coletado dentro de uma hora, o tempo de incubação é aumentado para 3 minutos para assegurar completa lise das células vermelhas;
- d) Centrifugar (13000 rpm) por 20 segundos;
- e) Remover o sobrenadante, deixando-se cerca de 20 µl de líquido residual;
- f) Submeter o tubo a uma vigorosa agitação, durante 10 segundos, visando facilitar a ressuspensão das células;
- g) Adicionar 300 µl de solução de lise celular;

2ª etapa:

- a) Adicionar um volume de 100 µl de solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
- b) Agitar vigorosamente por 20 segundos;
- c) Centrifugar (13000 rpm) por 1 minuto;

3ª etapa:

- a) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo “ependorf” de 1,5 ml;
- b) Adicionar 300 µl de isopropanol a 100%;
- c) Homogeneizar o material;

- d) Centrifugar (13000 rpm) por 1 minuto;
- e) Lavar várias vezes em 300 µl de etanol a 70%;
- f) Descartar o sobrenadante;
- g) Verter o tubo sobre papel absorvente para secar;

4^a etapa:

- a) Adicionar 100 µl de solução de hidratação de DNA;
- b) Homogeneizar;
- c) Incubar a 65°C por 5 minutos para acelerar a hidratação;
- d) Agitar o tubo por inversão para adequada homogeneização da amostra;
- e) Armazenar as amostras de DNA purificadas a 4°C (estocagem rápida) e a -20°C (estocagem longa).

Anexo 6: Quantificação de DNA em gel de agarose a 0,8% e em gel de poliacrilamida a 6%.

Para estimar a concentração de DNA em cada amostra, assim como para analisar as mesmas quanto ao seu estado de integridade antes da diluição, foi utilizada a técnica de quantificação de DNA em gel de agarose a 0,8%.

O gel de agarose a 0,8% foi preparado em solução de TBE 1X, com volume final de 100 ml em um molde de 150 x 100 mm e 3,0 µl de Brometo de Etídeo (10 mg/ml da solução estoque). Após a polimerização por 30 minutos, o gel foi retirado da placa e colocado em uma cuba de eletroforese horizontal contendo TBE 1X, apresentando dimensões internas de 300 x 157 x 50 mm.

- a) O sistema para quantificação foi preparado com um volume final de 15 µl, sendo 1,0 µl de DNA em solução estoque, 3,0 µl de tampão de amostra 5x e 11,0 µl de água mili-Q;
- b) As amostras foram aplicadas em sua totalidade e submetidas a uma corrente de 1volt/cm por 30 minutos;
- c) Após a corrida eletroforética, o gel era colocado em solução TBE 1x contendo Brometo de Etídeo (EtBr) na proporção de 2,0 µl de EtBr para 100 ml de solução durante 15 minutos.
- d) O DNA foi avaliado e quantificado visualmente, comparando com padrões pré-estabelecidos no laboratório utilizando um transiluminador de luz ultravioleta (Macro VUE, Hoefer, modelo UVIS-20);
- e) Após a quantificação das amostras, foram preparadas alíquotas de trabalho diluídas para uma concentração de 20 ng/µl.

Quantificação de DNA em gel de poliacrilamida a 6%

- a) As alíquotas diluídas a 20 ng/µl foram novamente quantificadas em gel de poliacrilamida a 6%, preparado com solução TBE 1X com volume total de 35 ml para o molde de 160x160 mm, com espaçador de 1mm de

espessura. Após a polimerização de 60 minutos, o gel era colocado em uma cuba de eletroforese vertical com dimensões internas de 170 x 165 mm, sendo aplicada uma corrente de 1 Volt/cm por 30 minutos.

- b) O sistema para quantificação era preparado colocando-se 6,0 µl de água mili-Q, 2,0 µl de tampão de amostra 5x e 2,0 µl do DNA diluído a 20ng/µl.
- c) Após a corrida, o gel era corado com solução de nitrato de prata e a leitura realizada visualmente conforme descrito anteriormente.

Anexo 7: Reação em Cadeia da Polimerase

7.1 Reagentes e soluções:

- ✓ Amostras de DNA genômico
 - ✓ Tampão de reação (Tris/HCl 0,2 M pH 8,5; KCl 0,5 M; MgCl₂ 0,02 M)
 - ✓ Solução de dNTP 20 mM;
 - ✓ Taq DNA Polimerase;
 - ✓ Solução de trabalho dos iniciadores:
 - a) Diluir os iniciadores com água mili-Q esterilizada para uma concentração de 50 µM utilizando-se para base de cálculo a quantidade de nano moles obtidos na síntese dos mesmos (dados fornecidos pelo fabricante);
 - b) Aliquotar os iniciadores diluídos (100 µl por frasco);
 - c) Estocar em freezer -20°C até o momento do uso;
 - d) Para uso na PCR, preparar soluções de trabalho, com os dois iniciadores necessários para a amplificação de cada região genômica selecionada, na concentração de 10 µM de cada iniciador.
- ** Observação: Todas as reações foram realizadas tomando-se o cuidado com o controle de qualidade interno, utilizando controles positivo e negativo para cada sistema.

7.2 Procedimento:

- a) Descongelar as amostras de DNA genômico a serem analisadas;
- b) Numerar microtubos de polipropileno de 0,5 µl (número da PCR e número de ordem);
- c) Preparar uma mistura de reagentes da PCR suficientes para o número de indivíduos em análise, conforme Tabela 1;
- d) Acrescentar o DNA genômico de cada indivíduo na quantidade de cada sistema a ser analisado no respectivo microtubo;
- e) Iniciar o programa correspondente a região genômica a ser amplificada.

Tabela 1: Reagentes (em μl) utilizados para amplificação de fragmentos específicos via PCR para os marcadores genéticos analisados (SNPs, STRs, elemento Alu e DNA mitocondrial).

Reagentes (μl)	SNPs	DYS19	DYS390	DYS391	DYS393	YAP	DNA mitocondrial
H ₂ O	16,50	16,435	16,435	16,75	17,00	14,685	16,50
Tampão 10 X (Biotools)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
DNTP (25 mM)	2,00	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	2,00
Iniciadores (0,5 μM de cada iniciador)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00
MgCl ₂	*	1,00	1,00	1,00	0,75	0,75	*
Taq DNA polimerase (Biotools - 1U/ μl)	1,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	1,00
DMSO	-	0,315	0,315	-	-	0,315	
DNA (20 a 40 ng/ μl)	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	1,00
Total	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00

* Nos marcadores do tipo SNPs e do DNA mitocondrial a enzima Taq polimerase utilizada apresentava MgCl₂ em solução (2,0 mM), por isso, não se adicionava tampão à reação de PCR.

Tabela 2: Condições da PCR para os loci Y-específicos e do DNA mitocondrial.

	Condições de PCR		
	Passo	Temperatura (°C)	Tempo
DYS19	1	94	3'
	2	94	30"
	3	58	1'
	4	72	1'
	5	4 vezes os passos 2, 3 e 4	
	6	94	30"
	7	54	1'
	8	72	1'
	9	29 vezes os passos 6, 7 e 8	
	10	72	10'
	11	04	Indefinido
DYS390	1	94	3'
DYS391	2	94	30"
DYS393	3	63	1'
	4	72	1'
	5	4 vezes os passos 2, 3 e 4	
	6	94	30"
	7	58	1'
	8	72	1'
	9	29 vezes os passos 6, 7 e 8	
	10	72	10'
	11	04	Indefinido
	YAP	1	94
2		94	1'
3		51	1'
4		72	1'
5		29 vezes os passos 2, 3 e 4	
6		72	10'
7		04	Indefinido
SNPs	1	94	5'
	2	94	1'
	3	TA (Tabela III.5)	20"
	4	72	1'
	5	35 vezes os passos 2, 3 e 4	
	6	72	10'
	7	04	Indefinido

DNA mitocondrial	1	94	5'
	2	TA (Tabela III.7)	1'
	3	72	1'10"
	4	94	40"
	5	50	30"
	6	35 vezes os passos 3, 4 e 5	
	7	72	10'
	8	04	Indefinido

Anexo 8: Digestão enzimática

A análise por RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) consiste em amplificar as regiões de interesse e submeter à digestão enzimática, utilizando enzimas específicas. O preparo do sistema, no geral, foi da seguinte forma:

- a) Preparava-se um mix contendo tampão da enzima diluído a 1x e 5,0 U da enzima;
- b) Adicionava 5,0 µl do produto de PCR;
- c) Após a vedação da placa, incubava-se em banho-maria (temperatura e tempo específicos de cada enzima) ;
- d) Após a incubação os produtos de digestão eram visualizados em gel de agarose a 2,5% ou em gel de poliacrilamida a 10%.

Anexo 9: Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento requer duas reações distintas. Uma PCR inicial e, posteriormente, a submissão de seu produto ao seqüenciamento, sendo que, em cada reação, utiliza-se iniciadores específicos, além de deoxinucleotídeos especiais (Kit *Big Dye Terminator*), específicos para o seqüenciador automático da Perkin-Elmer ABI 377.

- a) Para a PCR inicial, foram utilizados de 1,0 µl a 2,0 µl do DNA extraído e purificado. Foram seqüenciadas as amostras para marcadores binários - M89, M213, P2, M60, M34 e P3 - situados no cromossomo Y.
- b) A reação de seqüenciamento era composta por 2,0 µl de *Big Dye*, 1,3 µl de iniciadores e 2,0 µl do produto de PCR.
- c) Dessa maneira uma fita simples do DNA foi amplificada, em 25 ciclos nas seguintes condições: 96°C por 25"; 50°C por 20"; 72°C por 1'30".
- d) Posteriormente, estas reações foram submetidas a um procedimento de precipitação através da adição de etanol e acetato de potássio 3M.
- e) Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel de seqüenciamento, nos fornecendo os resultados para cada uma das fitas de DNA, os quais foram analisados visando a busca das regiões flanqueadoras ao sítio de inserção ou deleção (Abé-Sandes, 2002).

Anexo 10: Procedimento para eletroforese - Análise do produto de PCR

10.1 Gel de Poliacrilamida – Eletroforese vertical

10.1.1 Soluções

- ✓ Tampão TBE 10X pH 8,0 (Tris/HCl 0,89 M, EDTA 0,08 M, Ácido Bórico 0,89 M);
- ✓ Solução de acrilamida a 29% + bis-acrilamida a 1%;
- ✓ Glicerol;
- ✓ TEMED (N,N,N',N', tetrametiletilenodiamina);
- ✓ Persulfato de potássio ou amônia a 0,1%.

10.1.2 Preparo das amostras para aplicação no sistema de eletroforese

As amostras foram preparadas para eletroforese adicionando-se tampão de corrida, acrescido do corante bromofenol. A seguir será demonstrada a especificidade do preparo para cada marcador analisado.

Para os marcadores microssatélites, adicionou-se formamida (900 µl de formamida para 300 µl de corante) ao tampão de corrida. As amostras foram submetidas a um aquecimento físico a 95°C por 10 (dez) minutos antes da aplicação no gel, favorecendo a desnaturação com o intuito de abrir a dupla fita de DNA. Imediatamente após a desnaturação, as amostras foram submetidas a um choque térmico (imersão em gelo) e posteriormente aplicadas nos poços do gel de poliacrilamida desnaturante.

10.1.3 Procedimento

- a) Após a assepsia das placas de vidro, montar as placas com espaçadores prendendo com grampos de aço;
- b) Preparar uma solução de poliacrilamida nas concentrações de 6% (gel 6%) ou 10% (gel 10%) na proporção conforme Tabela 3;
- c) Adicionar a esta solução, se necessário, 35% de glicerol;
- d) Adicionar os catalisadores TEMED e Persulfato de Amônia na proporção conforme consta na Tabela 3;
- e) Inserir rapidamente o gel não polimerizado pela borda superior e colocar o pente;

f) Tempo médio de polimerização: 30 minutos.

10.1.4 Condições de pré-corrída do gel de poliacrilamida

Nos sistemas em que a análise foi realizada em gel de poliacrilamida, realizou-se uma pré-corrída, onde somente o gel era submetido em voltagem fixa de duzentos Volts por um tempo de vinte minutos. Em todos os procedimentos de eletroforese, iniciou-se a corrída com uma voltagem mais baixa, em torno de 80 Volts, para que as amostras iniciassem a saída do poço uniformemente. Após 20 minutos a voltagem ideal foi ajustada a cada sistema.

Após a pré-corrída e verificação das condições ótimas de corrída, os poços foram novamente limpos com tampão TBE 1X. Posteriormente foram aplicadas todas as amostras no gel juntamente com os padrões dos alelos dos respectivos marcadores intercalando a cada três ou quatro amostras.

Para os sistemas de STRs e o M3, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese com voltagem constante de 200V e amperagem variável. O tempo de corrída era específico para cada sistema variando de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados: 3h50' para o DYS19, DYS390 e DYS391; 2h30' para o DYS393, e para o M3 o tempo de corrída era em torno de 1h30'. Em relação aos produtos do sistema *AluYAP*, estes foram submetidos a uma voltagem de 150 Volts por um período 1h50'. Logo após a eletroforese, os géis seguiam para o procedimento final de coloração, utilizando nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994).

10.1.5 Leitura dos géis

As determinações dos perfis alélicos e genotípicos foram realizadas por comparações visuais entre os alelos padrões e o alelo presente em cada amostra. As leituras dos géis foram realizadas com auxílio de um transiluminador – Macro VUE UVIS-20 - com luz branca (visível). Uma segunda leitura dos resultados foi confirmada posteriormente utilizando-se a escolha de amostras ao acaso.

Tabela 3: Componentes e quantidades do preparo do gel de poliacrilamida

Componentes do gel	Gel não desnaturante		Gel desnaturante
	6%	10%	10%
H ₂ O mili-Q (ml)	15,75	9,6	9,6
Uréia* (g)	-	-	9,6
Acrilamida + bisacrilamida (ml)	5,0	6,6	6,6
Glicerol (ml)	1,75	1,4	-
Tampão TBE 10X pH 8,0 (ml)	2,5	2,0	2,0
TEMED (μl)	18	15	15
Persulfato de Amônia 0,1% (μl)	350	300	300

* No preparo do gel desnaturante, primeiro adiciona-se uréia à água. Aquecer por 1 minuto no forno de microondas para melhor dissolução do soluto. Após essa etapa inicial, o preparo segue as mesmas etapas do gel não desnaturante.

10.1.6 Eletroforese: montagem e condições

- a) Diluir o tampão TBE 10X na proporção 1:10;
- b) Colocar o tampão diluído na parte inferior da cuba;
- c) Retirar os grampos e os pentes da placa;
- d) Lavar as bordas superiores e inferiores do gel com água deionizada;
- e) Montar o gel na cuba de eletroforese;
- f) Preencher a parte superior da cuba com tampão TBE diluído;
- g) Lavar os poços dos géis com auxílio de pipetador ou seringa Hamilton;
- h) Aplicar as amostras (7,0 μl de produto de PCR e 3,0 μl de tampão de corrida);
- i) Conectar a cuba com a fonte;
- j) Estabelecer a voltagem máxima pretendida (de acordo com o sistema analisado) e liberar a amperagem.

10.1.7 Coloração do gel de poliacrilamida com Nitrato de Prata

10.1.7.1 Soluções

- ✓ Solução fixadora: Etanol (144,0 ml), Ácido acético (6,0 ml) e Água deionizada (750,0 ml)
- ✓ Solução de Prata: Nitrato de prata (0,2%g + 10,0 ml de água deionizada)
- ✓ Solução Reveladora: Hidróxido de sódio (22,5g) e água deionizada (q.s.p. 1000 ml)

10.1.7.2 Procedimento

- a) Após desligar a fonte, desfazer a moldura do gel e transferi-lo para um recipiente contendo 200 ml de solução fixadora (ácido acético a 10%);
- b) Deixar permanecer nessa solução por aproximadamente 20 minutos;
- c) Descartar a solução fixadora e lavar o gel em água deionizada três vezes por aproximadamente 3 minutos cada;
- d) Descartar a água e colocar a solução de nitrato de prata por 30 minutos;
- e) Descartar a solução de nitrato de prata e lavar imediatamente o gel em água deionizada por 20 segundos;
- f) Adicionar a solução reveladora, agitar levemente até que a revelação esteja completa;
- g) Descartar o revelador e bloquear a reação com solução fixadora;
- h) Proceder à leitura.

10.1.7.3 Secagem do gel

a) Solução

- ✓ Solução de secagem: glicerol 40% em ácido acético 10%.

b) Procedimento

- a) Hidratar duas folhas de papel celofane transparente;
- b) Esticar uma das folhas em uma placa de vidro;
- c) Colocar igual quantidade de solução de secagem suficiente para encobrir a extensão do papel celofane a ser utilizado;
- d) Colocar sobre o conjunto o gel a ser seco, devidamente etiquetado;
- e) Colocar uma quantidade de solução de secagem suficiente para encobrir o gel;
- f) Estender a segunda folha de papel celofane hidratado sobre o gel;
- g) Deixar secar a temperatura ambiente.

** Observação:

Metodologia de secagem alternativa do gel: colocar o gel por 2 horas em água destilada e proceder à secagem sem o uso de solução de ácido acético com glicerol.

10.2 Gel de agarose – Eletroforese horizontal

10.2.1 Soluções

- ✓ Agarose a 1% e 2,5%
- ✓ TBE 1X

10.2.2 Procedimento

- a) Após a assepsia da placa, montar o conjunto da mesma;
- b) Preparar uma solução de agarose nas concentrações de 1% ou 2,5%. Adicionar 2,0 µl do Brometo de Etídeo na solução de agarose. Usa-se o gel a 1% para verificar os produtos de amplificação e o gel a 2,5% para verificação dos produtos de digestão;
- c) Inserir rapidamente o gel não polimerizado na placa e colocar o pente;
- d) Tampar com papel alumínio e aguardar a polimerização;
- e) Tempo médio de polimerização: 20 minutos.

10.2.3 Eletroforese: montagem e condições

- a) Diluir o tampão TBE na proporção 1:10;
- b) Colocar o tampão diluído na cuba;
- c) Retirar o pente do gel;
- d) Colocar o gel na cuba de eletroforese horizontal;
- e) Aplicar as amostras (5,0 µl de produto de PCR e 5,0 µl de tampão de corrida);
- f) Conectar a cuba com a fonte;
- g) Estabelecer a voltagem máxima pretendida (de acordo com o sistema analisado) e liberar a amperagem.
- h) Após o tempo de corrida, retirar o gel e analisar em luz ultravioleta.