

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo da estrutura e filogenia da população do Rio de Janeiro através de SNPs do Cromossomo Y

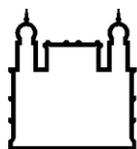
Simone Teixeira Bonecker dos Santos

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Simone Teixeira Bonecker dos Santos

**Estudo da estrutura e filogenia da população do Rio de Janeiro
através de SNPs do cromossomo Y**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular e Molecular

Orientador: Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

RIO DE JANEIRO

2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B712

Bonecker, Simone Teixeira.

Estudo da estrutura e filogenia da população do Rio de Janeiro através de SNPs do cromossomo Y / Simone Teixeira Bonecker. – Rio de Janeiro, 2010.

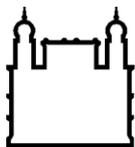
xvii, 73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.

Bibliografia: f. 59-66

1. SNP. 2. Cromossomo Y. 3. Genética de população. 4. SNaPshot. I.
Título.

CDD 572.87



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Simone Teixeira Bonecker dos Santos

Estudo da estrutura e filogenia da população do Rio de Janeiro através de SNPs do cromossomo Y

ORIENTADOR: Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

Aprovada em: 18 / 05 / 2010

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Adalberto Rezende dos Santos
Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Sampaio Freitas
Prof^a. Dr^a. Verônica Marques Zembrzuski
Prof. Dr. Milton Ozório Moraes
Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Dutra

Rio de Janeiro, 18 de maio de 2010.

RESUMO

A população brasileira é considerada miscigenada, derivada de um processo relativamente recorrente e recente. Aqui viviam milhões de indígenas quando começou o processo colonizatório envolvendo integrantes europeus, principalmente portugueses do sexo masculino, tornando comum o acasalamento entre homens europeus e mulheres indígenas, começando assim a heterogeneidade étnica encontrada em nossa população. Posteriormente com a chegada dos escravos, durante o ciclo econômico da cana-de-açúcar, começou a ocorrer relacionamentos entre europeus e africanas. Basicamente, trata-se de uma população tri-híbrida que atualmente apresenta em sua composição outros grupos, entre eles: italianos, espanhóis, sírios, libaneses e japoneses. Para o melhor entendimento das raízes filogenéticas brasileiras, foram utilizados neste estudo marcadores bi-alélicos da região não recombinante do cromossomo Y. O objetivo foi analisar como esses grupos heterogêneos contribuíram para o *pool* genético de origem paterna encontrado na população masculina do Rio de Janeiro, e assim enriquecer os conhecimentos acerca dos movimentos migratórios no processo de estruturação desta população. Foram analisados, através do minissequenciamento *multiplex*, 13 polimorfismos de base única (SNPs) e foi possível a identificação de nove haplogrupos e quatro sub-haplogrupos, em uma amostra de 200 indivíduos não aparentados e residentes do Estado do Rio de Janeiro, escolhidos aleatoriamente entre participantes de estudos de paternidade da Defensoria Pública do Rio de Janeiro. Dos haplogrupos analisados, somente o R1a, não foi observado em nossa população. O haplogrupo mais representativo foi o de origem européia, o R1b1, com 51%, enquanto o menos representativo, com 1% foi o Q1a3a, encontrado entre os nativos americanos. Cerca de 85% dos cromossomos Y analisados são de origem européia; 10,5% de africanos e 1% de ameríndios, e o restante são de origem indefinida. Ao comparamos com dados da literatura nossa população mostrou-se semelhante a população branca de Porto Alegre e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o *pool* gênico da população masculina do Rio de Janeiro com a portuguesa. Os resultados aqui encontrados corroboram os dados históricos da fundação da população do Rio de Janeiro durante o século XVI, período onde foi observada uma significativa redução da população ameríndia, com importante contribuição demográfica vinda da região Subsaariana da África e Europa, principalmente de portugueses. Tendo em vista o alto grau de miscigenação da nossa população e os avanços na medicina personalizada, estudos sobre a estrutura genética humana têm fundamental implicação no entendimento na evolução e no impacto em doenças humanas, uma vez que para esta abordagem, a coloração da pele é um preditor não confiável de ancestralidade étnica do indivíduo.

ABSTRACT

The Brazilian population is highly admixture, a relatively recurrent and recent process. Millions of indigenous people had been living here when the colonization process began, initially involving mainly Portuguese men. The immigration of European women during the first centuries was insignificant, making common the marriage between European men with indigenous women; hence, starting the ethnic heterogeneity found in our population nowadays. Subsequently, with the arrival of slaves during the economic cycle of sugarcane, began the relationships between Europeans and Africans. Basically, it is a tri-hybrid population with contributions from other groups, such as Italians, Germans, Syrians, Lebanese and Japanese. For a better understanding of Brazilian phylogenetic roots, biallelic markers of nonrecombining region of the Y chromosome were used in this study. The goal was to analyze how these heterogeneous groups contributed to the genetic pool found present-day in the population of Rio de Janeiro, and thus contribute to the understanding of migratory movements in the process of structuring this population. We analyzed, through minisequencing multiplex, 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and through those it was able to identify nine haplogrupos and four subhaplogrupos, in a sample of 200 unrelated individuals, residents of the State of Rio de Janeiro, chosen randomly between participants from studies of fatherhood. Of the haplogrupos examined, only the R1a, has not been observed in our population. The more representative haplogroup was from European origin, the R1b1, with 51%, while the less representative, with 1% was the Q1a3a, found among Native Amerindians. 85% of Y chromosomes analyzed were from Europeans; 10.5% from Africans and 1% of Native Amerindians, and the rest have not had their origin defined. In this study sample, the vast majority of Y-chromosomes proved to be of European origin. Indeed, there were no significant differences when the haplogroup frequencies in Brazil and Portugal were compared by means of an exact test of population differentiation. These results corroborate historical data of the foundation of the population of Rio de Janeiro during the 16th century, a period where it was observed a significant reduction of Amerindian population was observed with important contribution from the Sub-Saharan region of Africa and Europe, particularly the Portuguese. In view of the high degree of admixture of oBrazilian population and advances in medicine, customized research on human genetic structure have fundamental implication in understanding the evolution and impact on human diseases, since for this approach, the skin color is an unreliable ancestry predictor of individual ethnic.

Dedico ao meu filho Murilo,
ao meu marido Bruno, aos
meus pais Sérgio e Ana, à
minha irmã e avós.

Success is not final, failure is
not fatal: it is the courage to
continue that counts.

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meus orientadores, Dr. Pedro Cabello e Dr. Rodrigo Soares de Moura Neto, pela oportunidade, pela orientação, pelo incentivo e investimento nesse início da minha carreira científica.

À Dra. Raquel Lima de Figueiredo Teixeira por ter contribuído com a sua experiência profissional, sempre me guiando e me ajudando.

Ao Prof. Dalmo Azevedo, que mesmo sem me conhecer, sempre se mostrou solícito e respondeu prontamente aos meus e-mails, tirando as minhas dúvidas e me guiando. Muitíssimo obrigada por todas as dicas e principalmente pela paciência em me ensinar.

Ao Dr. Sérgio Pereira, à Dra. Giselda Kallil e a Dra. Ana Hatagima pelas discussões seminários de laboratório que contribuíram para minha formação acadêmica e pelas diversas contribuições que me foram prestadas.

À toda família LGH, Vivi, Lalá, Paulinha, Rê Almeida, Rê Morato, Carol, Raisia, Verônica, Cyn, Amanda, Flavinha, Eduardo e Diego pela amizade, pelo carinho e pelo exemplo de profissionalismo. Muito obrigada por me receberem tão bem no laboratório, por me acolherem, me ensinarem, me ajudarem, me apoiarem e pelos agradáveis momentos dentro e fora do laboratório.

À Priscila e Beth do Laboratório de Biologia Forense pelo carinho e pela ajuda.

À Eliane, que sempre nos ajudou a manter a limpeza do laboratório.

Às minhas inseparáveis amigas da faculdade e aos meus eternos amigos do antigo laboratório, o LBCE, pela companhia, amizade e cooperação de sempre.

À minha primeira orientadora, Dra. Rosana Gentile, que me ensinou os primeiros passos da Biologia Molecular.

Ao meu filho, Murilo, que ainda na barriga tem me dado muita força, inspiração e tem sido um ótimo companheiro, sem me dar nenhum trabalho.

Ao meu marido, que é o meu exemplo, minha força, minha inspiração, meu porto seguro. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, não me deixando desistir e me encorajando a seguir em frente. Obrigada por toda a confiança, carinho, apoio e paciência. Juntos, somos mais fortes, te amo e sempre vou te amar.

Aos meus pais, que não só me deram seus melhores conselhos como também seus melhores exemplos, tanto profissionais quanto pessoais. Deus não podia ter me colocado em melhores mãos. Obrigada pelo incentivo, carinho, força e principalmente por nunca terem me faltado. Espero um dia poder lhes retribuir todo o apoio e incentivo. À minha irmã Bia, que sempre esteve ao meu lado me dando sua opinião sincera e o seu carinho. Às minhas avós, Marly e Alcina, pelo exemplo e carinho.

À minha afilhada e minha sobrinha, Ana Lucia e Isabella, por me devolverem a alegria depois de um dia estressante com apenas um sorriso. Obrigada por todas as brincadeiras. Amo muito vocês.

Aos meus tios, tias, primos e parentes obrigada pelo carinho.

Aos meus amigos, Fabio, Dinho, Ju, Lidy e João Paulo pela amizade, carinho e paciência em entenderem a minha ausência.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i> (= Análise Molecular de Variância)
CEP	Comitê de tica e Pesquisa
ddNTP	<i>Dideoxynucleotide-tri-phosphate</i> (= dideoxirribonucleotdeo trifosfato)
DNAm	DNA mitocondrial
dNTP	<i>Deoxynucleotide-tri-phosphate</i> (= desoxirribonucleotídeo trifosfato)
ExoI	<i>E. coli</i> exonuclease I
Exo-SAP	<i>E. coli</i> exonuclease I - <i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Indels	Insero / deleo
ISA	Instituto Socioambiental
NR	<i>Nonrecombining region of the Y chromosome</i> (= Região não recombinante do cromossomo Y)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (= Reao de Polimerase em Cadeia)
PSV	<i>Paralogous Sequence Variants</i> (= Sequncia Parlogo Variante)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (= Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrio)
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphysm</i> (= Polimorfismo de Base nica)
STR	<i>Short Tandem Repeats</i> (= Repetioes Curtas em Sequência)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Methods using Arithmetic average</i> (= Grupo de pares não ponderados utilizando média aritmética)
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (= Número Variável de Repetioes em Sequência)

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Representação da origem asiática dos nativos americanos; os ancestrais teriam chegado às Américas através do que é hoje o Estreito de Bering.-----3
- Figura 1.2:** Representação gráfica das imigrações no Brasil, de acordo com a nacionalidade, no período de 1884 a 1933 (Fonte: IBGE 2000).-----4
- Figura 1.3:** Representação gráfica da população escrava no Brasil, no século XIX, segundo as regiões do país no período de 1864 a 1887 (Fonte: IBGE 2000).-----6
- Figura 1.4:** Representação esquemática de um minissatélite, em uma das fitas do DNA, onde a unidade de repetição corresponde a uma sequência de 39 nucleotídeos representada em vermelho na sequência acima.-----9
- Figura 1.5:** Representação esquemática de um microssatélite, em uma das fitas de DNA, onde a unidade de repetição é a sequência TCTG e essa se encontra repetida sete vezes na sequência acima. ---
-----10
- Figura 1.6:** Representação esquemática dos *indels*, onde a primeira linha representa a sequência original e os espaços em branco da segunda linha representam as deleções, enquanto que os nucleotídeos em vermelho representam as inserções em relação a sequência original.-----10
- Figura 1.7:** Representação esquemática de duas fitas duplas de DNA, onde observa-se em um mesmo ponto uma variação de um único nucleotídeo.-----11
- Figura 1.8:** Representação do cromossomo Y, onde estão representadas as regiões não recombinantes (NRY) e recombinantes com o cromossomo X.-----12
- Figura 1.9:** Distribuição global dos haplogrupos do Y. Cada círculo representa uma amostra populacional com a frequência dos 18 principais haplogrupos do Y (Fonte: Jobling e Tyler-Smith, 2003).-----13
- Figura 1.10:** Árvore completa dos haplogrupos do cromossomo Y com as respectivas mutações que as caracterizam definidas pelo YCC (2002) (Fonte: Jobling e Tyler-Smith 2003).-----15
- Figura 3.1:** Organograma da metodologia utilizada no projeto.-----30
- Figura 4.1:** Representação dos SNPs do Cromossomo Y, com os polimorfismos diagnósticos para a caracterização dos haplogrupos, onde a primeira base de cada SNP representa o alelo ancestral e a segunda o alelo mutante. As letras correspondem aos haplogrupos do cromossomo Y e as cores representam a origem desses: laranja – predominantemente africano; azul - Europa; verde - Europa, África e Ásia; lilás – Mediterrâneo; preto – origem indeterminada; amarelo – ameríndios. -----32

Figura 4.2: Perfil de três amostras do SNP M168, visualizadas em gel de agarose a 2,5%. O primeiro poço representa o marcador de 100pb (Invitrogen), os seguintes as amostras identificadas pelo número (115, 116 e 10) e CN (controle negativo da reação, sem DNA). Em azul estão os aditivos da reação. A seta verde aponta para a banda de interesse. -----0-----33

Figura 4.3: Eletroferograma do SNP M96. Abaixo a sequência consenso, em azul está destacado o primer para o minissequenciamento e em vermelho o SNP de interesse.-----34

Figura 4.4: Visualização do produto de PCR *Multiplex* em gel de poliacrilamida a 11%, corado com brometo de etídio. O primeiro poço corresponde ao marcador de peso molecular, o pBR322-*HaeIII*, e esse varia de 8 pb a 577pb, e as letras de C1 a C9 correspondem as amostras e os círculos ao lado de cada banda correspondem ao fragmento de interesse, o tamanho dos fragmentos varia de 81 pb a 186pb. -----35

Figura 4.5: Eletroforese de quatro dos 13 SNPs estudados, através da técnica de SNaPshot®, onde: A- representa a padronização do SNP M170; B- polimorfismo P25, com as duas variantes alélicas, a ancestral e a derivada; C- polimorfismo 92R7, com as suas duas variantes alélicas, ancestral e derivada; D- indel 12f2, onde a variante ancestral é a presença do alelo, enquanto que a derivada é representada pela deleção. As cores em cada eletroferograma representam as bases nitrogenadas, sendo a adenina (A) – verde, timina (T) – vermelha, citosina (C) – preta, guanina (G) – azul e os picos laranja representam o padrão de peso molecular (LIZ™-120)-----37

Figura 4.6: Eletroferograma contendo os treze polimorfismos de interesse, separados por tamanho de fragmento e fluorescência, que variam de acordo com a base esperada, e os picos laranja representam o padrão de peso molecular (LIZ™120).-----38

Figura 4.7: Porcentagem dos haplogrupos encontrados na população masculina do Rio de Janeiro.---41

Figura 4.8: Escala multidimensional baseada na diversidade genética (F_{ST}) entre populações brasileiras através de dados de indivíduos homens do Rio de Janeiro (RJ); indivíduos de cor de pele preta do Rio de Janeiro (RJ_B) (Hünemeier *et al.* 2007), indivíduos brancos de Porto Alegre (PA_W) e de cor de pele preta de Porto Alegre (PA_B1); (Guerreiro-Junior *et al.* 2009) e outro estudo utilizando também indivíduos negros de Porto Alegre (PA_B2) (Hünemeier *et al.* 2007); e dados da Região Sul (Reg_Sul), Sudeste (Reg_Sud), Norte (Reg_Nort) e Nordeste (Reg_Nord) (Carvalho Silva *et al.* 2001)-----42

Figura 4.9: Árvore da diversidade do cromossomo Y nas populações brasileiras. Os círculos indicam um agrupamento das populações estudadas e a população de estudo, o Rio de Janeiro, está destacada em vermelho-----43

Figura 4.10: Escala multidimensional baseada na distância genética (F_{ST}) entre populações brasileiras, através de dados populacionais de homens do Rio de Janeiro (RJ); indivíduos de cor de pele preta do Rio de Janeiro (RJ_B) (Hünemeier *et al.* 2007), indivíduos brancos de Porto Alegre (PA_W) e de negros de Porto Alegre (PA_B1); (Guerreiro-Junior *et al.* 2009) e outro estudo utilizando também indivíduos negros de Porto Alegre (PA_B2); e dados da Região Sul (Reg_Sul), Sudeste (Reg_Sud), Norte (Reg_Nor) e Nordeste (Reg_Nord) (Carvalho Silva *et al.* 2001) e dados da população Portuguesa (Beleza *et al.* 2006)-----44

Figura 4.11: Escala multidimensional baseada na distância genética (FST) entre a população brasileira e as populações de Portugal (Beleza et al. 2006); Espanha (Flores et al. 2004); Itália (Capelli et al. 2007); Alemanha (Kayser et al. 2005); Colômbia, Argentina e Japão (Brión et al. 2005); Angolares (Trovoada et al. 2006); Benin, Camarões e Moçambique (Hünemeier et al. 2007)..-----45

Figura 4.12: Árvore da diversidade do cromossomo Y nas populações que contribuíram para a atual estrutura genética encontrada em nossa população. Os círculos indicam um agrupamento das populações estudadas e a população de estudo, o Rio de Janeiro, está destacada em vermelho.-----46

Figura 4.13: Contribuição parental dos haplogrupos do Cromossomo Y na população do Rio de Janeiro.-----47

Figura 4.14: Frequência das populações parentais que contribuíram para o perfil tri-híbrido da população masculina do Rio de Janeiro, onde alternou-se entre três países africanos, cada um de uma região da África.-----49

Figura 4.15: Frequência das populações parentais que contribuíram para o perfil tri-híbrido da população masculina do Rio de Janeiro, onde alternou-se entre três países europeus que mais teriam migrados para o Brasil.-----50

ÍNDICE DE TABELA

- Tabela 1.1:** Percentual de grupos étnicos da população brasileira por auto-declaração de cor de pele, de acordo com a nomenclatura utilizada na pesquisa nacional por amostra domiciliar, nas grandes Regiões, no Estado do Rio de Janeiro e sua região metropolitana.-----7
- Tabela 3.1:** Representação dos 13 SNPs do cromossomo Y utilizados no estudo, assim como o número de depósito no GeneBank, sequência dos *primers forward* e *reverse* para a amplificação por PCR dos treze fragmentos de DNA contendo os SNPs de interesse e o tamanho do produto gerado.-----24
- Tabela 3.2:** Nome dos 13 polimorfismos do cromossomo Y utilizados, assim como a sequência dos *primers forward* ou *reverse*, para a genotipagem pela reação de minissequenciamento (SNaPshot®) dos treze fragmentos de DNA contendo os SNPs de interesse, a concentração de cada *primer*, o tamanho do produto gerado e o polimorfismo esperado.-----27
- Tabela 3.3:** Combinação dos alelos mutantes e ancestrais de cada um dos treze SNPs utilizados na análise para caracterização dos haplogrupos.-----29
- Tabela 4.1:** Representação dos SNPs utilizados na reação de SNaPshot®, sentido do *primer* utilizado na reação, tamanho dos fragmentos esperados segundo os artigos de referência (Sanchez *et al.* (2003), Brión *et al.* (2004) e Blanco-Verea *et al.* (2006)), tamanho dos fragmentos observados em nosso estudo, polimorfismos esperados e observados, onde a primeira base representa o alelo ancestral e a segunda o alelo derivado (ou mutante).-----36
- Tabela 4.2:** Frequência dos alelos de cada polimorfismo estudado na população do Rio de Janeiro e na população mundial (dados do dbSNP Pubmed).-----39
- Tabela 4.3:** Frequência dos alelos ancestral e derivado do SNP M213 na população mundial, na Europa, na Ásia, nos Afro-americanos e região Subsaariana na África e no Rio de Janeiro.-----40
- Tabela 4.4:** Comparação da contribuição parental (%) em diversas regiões do país.-----47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1) HISTÓRIA DO BRASIL.....	2
1.1.1) Ocupação das Américas.....	2
1.1.2) Contribuição Européia.....	4
1.1.3) Contribuição Africana.....	5
1.2) RIO DE JANEIRO.....	5
1.3) POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	8
1.3.1) Marcadores Genéticos Clássicos.....	8
1.3.2) Marcadores Moleculares.....	9
1.4) MARCADORES DE LINHAGEM.....	11
1.4.1) Cromossomo Y.....	12
1.5) HAPLOGRUPOS.....	12
1.5.1) Os Principais Haplogrupos.....	16
1.6) IMPORTÂNCIA DA ANCESTRALIDADE NA GENÉTICA MÉDICA.....	19
2. OBJETIVO GERAL.....	21
2.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1) AMOSTRA.....	22
3.2) EXTRAÇÃO DO DNA.....	22
3.3) REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) – <i>SINGLEPLEX</i>	22
3.4) PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PRÉ-SEQUENCIAMENTO.....	25
3.5) SEQUENCIAMENTO.....	25
3.6) REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) – <i>MULTIPLEX</i>	25
3.7) PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	26
3.8) REAÇÃO DE EXTENSÃO DE FITA SIMPLES (SNaPshot®).....	26
3.9) PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DE EXTENSÃO DE FITA SIMPLES.....	28
3.10) ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS FRAGMENTOS – MINISSEQUENCIAMENTO.....	28
3.11) CLASSIFICAÇÃO DOS HAPLOGRUPOS.....	28
3.12) ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	30

4. RESULTADOS.....	31
4.1) DISTRIBUIÇÃO INTRAPOPULACIONAL DOS HAPLOGRUPOS.....	31
4.2) PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS.....	33
4.2.1) PCR- <i>Singleplex</i>	33
4.2.2) Sequenciamento.....	34
4.2.3) PCR- <i>Multiplex</i>	35
4.2.4) SNaPshot®.....	36
4.3) FREQUÊNCIA DOS SNPs NA POPULAÇÃO DO RIO DE JANEIRO X POPULAÇÃO GLOBAL.....	39
4.4) FREQUÊNCIA DOS HAPLOGRUPOS.....	41
4.4.1) No Rio de Janeiro.....	41
4.4.2) Rio de Janeiro x População Brasileira.....	42
4.4.3) Rio de Janeiro x Portugal.....	44
4.4.4) População Brasileira x Portugal.....	44
4.4.5) População Brasileira x População Mundial.....	45
4.5) CONTRIBUIÇÃO PARENTAL.....	47
4.5.1) No Rio de Janeiro.....	47
4.5.2) Na população brasileira.....	48
4.6) MISTURA ÉTNICA.....	49
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	59
8. ANEXO.....	67

1. INTRODUÇÃO

O impacto cultural da colonização já é conhecido e estudado em diversos campos há muitas décadas, na história, na antropologia, na arqueologia, entre outros, porém são recentes os estudos sob o aspecto genético do impacto da colonização em uma determinada população (Guerreiro-Junior *et al.* 2009). A descoberta e caracterização da variação genética humana têm sido um dos principais focos de pesquisas entre os pesquisadores do mundo inteiro (Cavalli-Sforza 2007).

No Brasil, diversos pesquisadores usaram métodos históricos, sociológicos e antropológicos para analisar a origem dos brasileiros, entre eles: Paulo Prado em “Retrato do Brasil” (1927), Sérgio Buarque de Holanda em “Raízes do Brasil” (1933), Gilberto Freyre em “Casa Grande e Senzala” (1933) e Darcy Ribeiro em “O Povo Brasileiro” (1995). E atualmente ferramentas moleculares têm sido usadas para este fim.

Uma vez que se sabe que a proporção de alelos varia de uma população para outra, e que essa diferença é pequena entre populações vizinhas, e as maiores diferenças são observadas entre populações distantes, é possível realizar estudos que mostram a distribuição alélica pelo planeta, caracterizando assim as populações com base nessas frequências (Martins 2007).

A estrutura genética é um termo frequentemente usado em genética de populações para designar diferenças entre duas ou mais sub-populações distintas em termos de frequências alélicas e genotípicas. O estudo de estruturação populacional é baseado na distribuição das frequências genotípicas e alélicas sob influência de quatro forças evolutivas: seleção natural, deriva gênica, mutação e recombinação (Hartl e Clark 1997). A mutação é responsável pela origem dos polimorfismos e a seleção natural pela mudança de suas frequências em resposta ao meio (Cavalli-Sforza 2007).

O estudo sobre a estrutura da população, isto é, o conjunto de suas características genéticas e demográficas, é importante para um melhor entendimento das características da formação atual de uma determinada população (Martins 2007). Sua filogenia, que seria as relações evolutivas entre os organismos, é importante para que se estabeleçam correlações entre as características encontradas atualmente na população e o passado migratório que originou esta população (Vianna 2004).

1.1) HISTÓRIA DO BRASIL

A heterogeneidade da população brasileira já foi documentada em diversos estudos utilizando tantos marcadores uniparentais quanto autossômicos, onde foi demonstrada um padrão típico tri-étnico, porém não uniforme (Ameríndio + Europeu + Africano) da população brasileira. Estudos genéticos revelaram que essa mistura é maior do que a demonstrada pelas características fenotípicas (Alves-Silva *et al.* 2000; Carvalho-Silva *et al.* 2001).

A extraordinária diversidade genética encontrada atualmente na população brasileira é resultado de mais de cinco séculos de cruzamento inter-étnico: colonização europeia, representada principalmente por portugueses, escravos africanos e ameríndios (Alves-Silva *et al.* 2000).

Quando os portugueses chegaram ao Brasil, em 22 de abril de 1500, havia aproximadamente 2,5 milhões de indígenas vivendo nesta área (IBGE 2000). A primeira colonização neste país envolveu principalmente portugueses do sexo masculino. A migração de mulheres europeias não foi significativa (Ribeiro 1995), o que acabou ocasionando o casamento entre homens europeus com mulheres indígenas. Posteriormente, com a chegada dos escravos durante o ciclo econômico da cana-de-açúcar, começaram a ocorrer relacionamentos entre europeus e africanas (IBGE 2000).

1.1.1) Ocupação das Américas

Há uma concordância, perante a comunidade científica, de que a ocupação das Américas ocorreu por caçadores nômades da Sibéria vindos do Nordeste da Ásia até o Alasca pelo que é hoje o estreito de Bering (Fagan 1987, Figura 1.1). A discordância dos arqueólogos está no exato período em que essa ocupação ocorreu. Uns acreditam que foi entre 30 – 35 mil anos atrás, enquanto outros apostam em uma colonização mais recente de 15 mil anos atrás (revisão em Cavalli-Sforza *et al.* 1994). Estudos utilizando o cromossomo Y estimam que a entrada dos homens nas Américas teria ocorrido há 20.000 anos (Carvalho-Silva *et al.* 1999), outros há 17.7 ± 4.8 mil anos atrás (Hammer e Zegura 2002), dados esses consistentes com evidências arqueológicas encontradas em Monte Verde, no Chile (Meltezer 1997) que datam em aproximadamente 14.250 mil anos, mostrando que a entrada anterior a 25 mil anos era improvável.

Os registros históricos mais recentes da ocupação humana no Brasil encontram-se no sítio arqueológico Alice Boer, localizado no centro-sul do país, e datam de 14.200 ± 1.150 anos atrás (Guidom 1987).



Figura 1.1: Representação da origem asiática dos nativos americanos; os ancestrais teriam chegado às Américas através do que é hoje o Estreito de Bering.

O Novo Mundo, embora inicialmente povoado pelos nativos americanos, é reconhecido historicamente como “descoberto” em 1492 por Cristóvão Colombo, abrindo uma nova era de expansão territorial e populacional (Santos 2006).

Após o contato com o colonizador europeu, ocorreu um intenso extermínio de povos indígenas devido a conflitos armados, epidemias, desorganização social e cultural. As desorganizações sociais e culturais fazem com que ainda hoje ocorra um processo de desaparecimento de comunidades indígenas brasileiras. Estima-se que somente na primeira metade do século XX mais de 80 povos foram extintos (ISA 2000). Segundo os dados do Instituto Socioambiental (ISA), a população indígena no Brasil atual está estimada em 600 mil indivíduos, sendo que deste total cerca de 450 mil vivem em Terras Indígenas (e, em menor número, em áreas urbanas próximas a elas), enquanto outros 150 mil encontram-se residindo em diversas capitais do país. De acordo com o último censo populacional realizado em 2000 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a parcela da população brasileira que se auto-declarou genericamente como "indígena" alcançou a marca de 734 mil pessoas.

1.1.2) Contribuição Européia

Portugal foi muito importante na história brasileira, marcando o destino dos brasileiros cultural e fisicamente. Foi a partir de 1532 que o Brasil passa a ser efetivamente colonizado por Portugal, uma vez que, anteriormente, a maior parte dos colonos apenas exploravam o pau-brasil através de suas feitorias e retornavam para a metrópole. Apenas alguns degredados, desertores e náufragos haviam se estabelecido em definitivo, vivendo juntos às tribos indígenas (Alencar *et al.* 1996).

Durante o período de 1500 a 1808 houve a chegada de aproximadamente 500.000 portugueses, sendo sua maioria de homens (Salzano e Freire-Maia 1967). Portugal foi sem dúvida a maior fonte de imigrantes europeus no Brasil até 1808, devido à relação colônia – colonizador, monopólio do pacto colonial que proibia o ingresso de navios estrangeiros ao país.

No século XIX o Brasil tornou-se independente, dando fim à colonização portuguesa no país. A partir de 1850, a expansão dos cafezais pelo Sudeste e a necessidade de colonização efetiva da região Sul, levaram o governo brasileiro a criar medidas de incentivo à vinda de imigrantes europeus, principalmente portugueses, italianos e alemães (Salzano e Freire-Maia 1967). O fluxo de imigrantes portugueses então cresceu rapidamente, correspondendo a 29% dos 5,5 milhões de imigrantes que entraram nesta época, sendo superado apenas pelos italianos (34%), houve a imigração de indivíduos de outros países europeus, como Espanha (14%) e Alemanha (4%), além de japoneses (5%), sírios e turcos (2%) e outros (12%) (Figura 1.2, IBGE 2000).

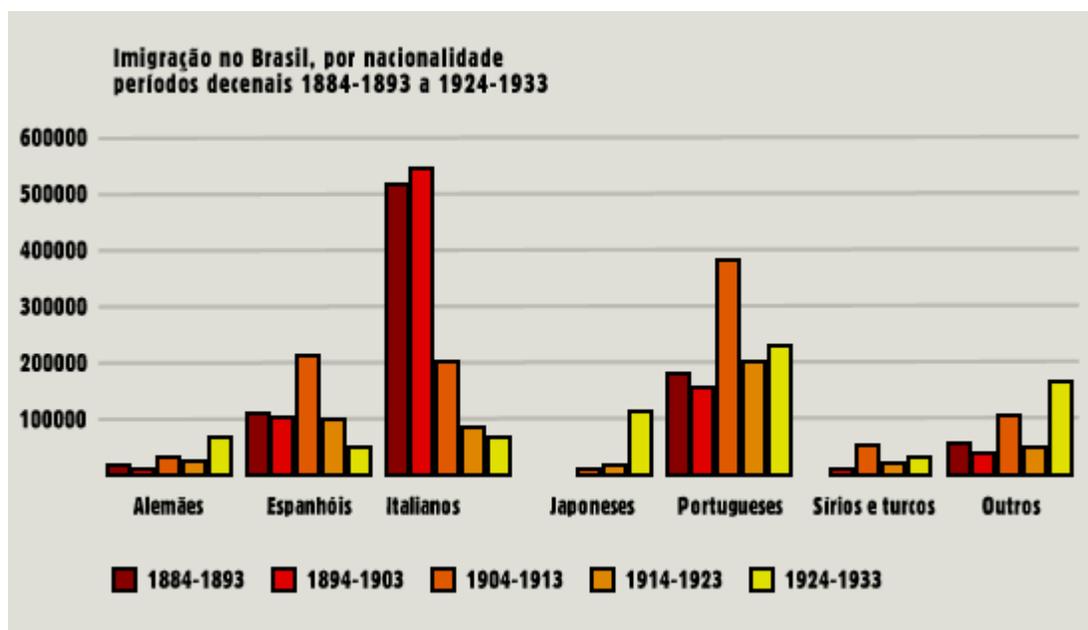


Figura 1.2: Representação gráfica das imigrações no Brasil, de acordo com a nacionalidade, no período de 1884 a 1933 (Fonte: IBGE 2000).

Outro pico da entrada de portugueses foi entre 1904 a 1914 com a entrada de 416.607 pessoas, e informações a respeito do destino desses imigrantes indicaram o Rio de Janeiro e São Paulo como as regiões preferidas (Levy 1974).

1.1.3) Contribuição Africana

No continente americano, o Brasil foi o país que mais importou mão de obra africana. É estimado que, entre 1550 e 1870, aproximadamente quatro milhões de homens, mulheres e crianças, o equivalente a mais de um terço de todo comércio negreiro africano, foram trazidos para o Brasil como escravos. Esse comércio desenvolveu-se no século XVIII até ser proibido em 1850 (Reis 2000).

Os africanos eram trazidos para o Brasil para trabalharem nas fazendas de cana de açúcar e mais tarde nas minas de ouro e diamantes e nas plantações de café (IBGE 2000).

Segundo Alencar e col. (1996), os escravos trazidos para o Brasil foram capturados nas mais diversas situações, como guerras tribais e escravização por dívidas não pagas. Os escravos africanos provinham de lugares como Angola, Guiné Equatorial, Benin, Nigéria e Moçambique e eram negociados com os traficantes em troca de produtos como fumo, armas e aguardentes e transportados nos chamados navios negreiros. Esses navios tinham como destinos os portos das cidades do Rio de Janeiro, Salvador, Recife e São Luís, e delas eram transportados para regiões mais distantes.

Registros históricos dos portos brasileiros (Mattoso 1982) e análise da região codificante do DNA mitocondrial (DNAMt) (Gonçalves *et al.* 2008) confirmaram que foram três as regiões da África – a oeste, a centro-oeste e a sudeste – que mais exportaram mão-de-obra africana para o país até 1850. As regiões do centro-oeste e sudeste incluíam basicamente áreas representadas por duas ex-colônias portuguesas (Angola e Moçambique) e representaram 68% da demanda dos escravos trazidos para o Brasil, enquanto que o oeste da África, correspondendo a áreas do norte do Golfo da Guiné, contribuíram com 32% (Klein 2002).

O Brasil foi um dos poucos, senão o único, país da América a receber africanos de todas as origens. Todas as regiões do país receberam escravos africanos, porém de maneira desigual, sendo a região Sudeste a que recebeu uma maior quantidade dessa mão de obra (Figura 1.3).

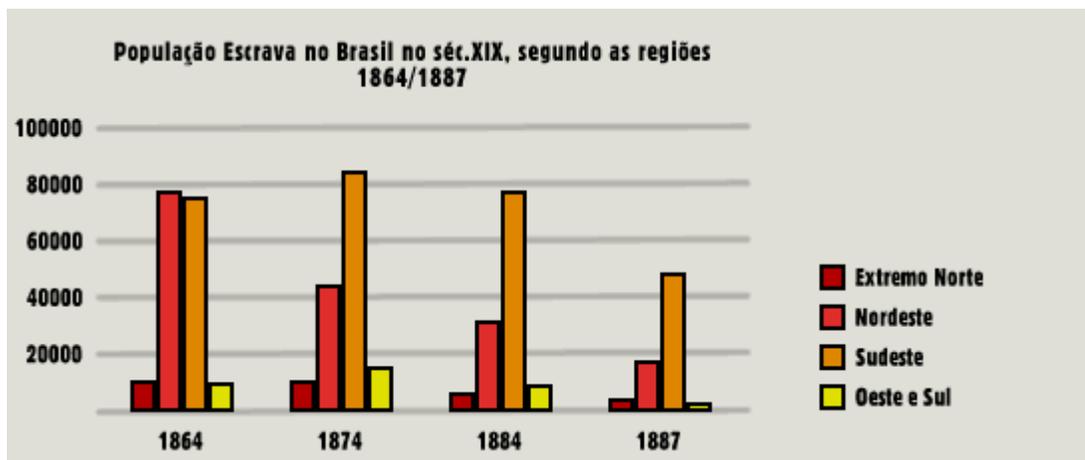


Figura 1.3: Representação gráfica da população escrava no Brasil, no século XIX, segundo as regiões do país no período de 1864 a 1887 (Fonte: IBGE 2000).

1.2) RIO DE JANEIRO

O Rio de Janeiro (22° 55' S, 43° 12' W) é uma cidade localizada na região Sudeste e foi a capital do Brasil durante 197 anos (1763 a 1960). Com cerca de 30 mil habitantes na segunda metade do século XVII, tornou-se a cidade mais populosa do Brasil, passando a ter importância fundamental para o domínio colonial. Além disso, o porto do Rio de Janeiro foi a principal porta de entrada para escravos que seriam utilizados para as minas de ouro e diamantes ou seriam levados para outras províncias, assim como de estrangeiros que viriam se instalar na Corte.

Do século XVII até meados do século XIX, a maioria da população fluminense foi composta por negros e portugueses. O número de imigrantes portugueses desembarcados na cidade do Rio de Janeiro passou a crescer repentinamente no final desse século, o que fez com que praticamente se igualasse ao número de pessoas de origem africana.

Um estudo baseado no DNAmT mostrou que 69% da contribuição materna da população do Rio de Janeiro provém do centro-oeste e sudeste da África, enquanto que 31% do oeste africano (Hünemeier *et al.* 2007). Esses valores são compatíveis com os sugeridos por registros históricos sobre a população brasileira (Maestri-Filho 1993).

Os primeiros imigrantes não-portugueses a chegar à região foram os suíços, em 1818, fundando na região das serras a cidade de Nova Friburgo. Pouco mais tarde, começaram a chegar os alemães, que também rumaram para as serras, principalmente para a região de Petrópolis, e chineses de Macau, que

plantaram chá nas proximidades do Rio de Janeiro. Italianos e espanhóis chegaram mais tarde, contribuindo também para a diversidade étnica do Rio de Janeiro (Alencar *et al.* 1996).

Segundo fontes do IBGE (2005), atualmente o Rio de Janeiro representa o segundo maior PIB do país, vindo depois de São Paulo, estimado em cerca de R\$ 119 bilhões, o que sem dúvida atraiu migrantes de outros estados brasileiros, em busca de melhores condições de vida.

O Brasil é um país heterogêneo em sua constituição, e esta heterogeneidade também é observada em cada região separadamente, uma vez que cada região possuiu um processo colonizatório individual, fazendo assim com que cada região apresente contribuições étnicas particulares (Tabela 1.1). A população da região Sul, por exemplo, apresenta menores contribuições africanas e maiores contribuições européias quando comparadas com outras regiões do país (Zembrzuski *et al.* 2006).

Tabela 1.1: Percentual de grupos étnicos da população brasileira por auto-declaração de cor de pele, de acordo com a nomenclatura utilizada na pesquisa nacional por amostra domiciliar, nas grandes Regiões, no Estado do Rio de Janeiro e sua região metropolitana.

População Regional	Grupos Étnicos (%)			
	Branca	Preta	Parda	Amarela / Indígena
Brasil	49,40	7,40	42,40	0,80
Norte	24,70	5,50	68,20	1,60
Nordeste	29,50	8,50	61,50	0,50
Sudeste	58,40	8,40	32,30	0,90
Rio de Janeiro	54,50	12,60	32,50	0,40
Reg Metropolitana do RJ	53,40	12,60	33,50	0,50
Sul	78,70	4,30	16,30	0,70
Centro – Oeste	41,40	6,60	50,90	1,10

Fonte: IBGE 2007.

1.3) POLIMORFISMOS GENÉTICOS

A base da genética de populações é feita através da observação na variação dos polimorfismos genéticos de indivíduos, sobre a qual são aplicados métodos estatísticos que medem o grau de diferenciação entre e dentro de populações. Na tentativa de esclarecer e aprofundar tais investigações torna-se necessária a compreensão dos polimorfismos genéticos. Em uma população, um gene é polimórfico quando a frequência do alelo mais comum é igual ou menor que 0,99. Alelos com frequências inferiores a 0,005 são denominados raros, ou também chamados idiomorfos. Em humanos muitos desses alelos raros são responsáveis por doenças genéticas ou têm efeitos deletérios (Hartl e Clark 1997).

O genoma humano é formado pelo conjunto de todas as sequências de DNA que nos caracterizam do ponto de vista biológico. Ao término do sequenciamento do genoma humano identificou-se a presença de aproximadamente três bilhões de pares de base, contendo de 20.000 a 25.000 genes distintos (Collins *et al.* 2003). Quase a metade do genoma humano é composta por sequências de DNA repetidas inúmeras vezes (Watson *et al.* 2006) e essas sequências variam de um indivíduo para o outro, fazendo o genoma humano possuir regiões altamente polimórficas. Atualmente, há diversas técnicas de biologia molecular disponíveis para detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção destes polimorfismos que, analisados com o auxílio de técnicas estatísticas, permita determinar seu papel sobre certas características (como por exemplo, a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças) servindo, portanto como marcadores moleculares.

1.3.1) Marcadores Genéticos Clássicos

Estudos pioneiros com o objetivo de traçar movimentos migratórios humanos, no Brasil, foram baseados em ferramentas da genética clássica gerando dados sobre os grupos sanguíneos, como os sistemas ABO e Rh (Salzano e Callegari-Jacques *et al.* 1988; Lopez-Camelo *et al.* 1996), imunoglobulinas e sistemas de histocompatibilidade (HLA – do inglês *Human Leucocyte Antigen*) (Spuhler 1979; Vogel e Motulsky 1997), entre outros. Esses polimorfismos foram intensamente investigados em populações nativas americanas (Santos 2006).

A partir da década de 1980, com o desenvolvimento de técnicas moleculares mais sofisticadas, capazes de estudar diretamente a molécula do DNA e seus polimorfismos, a diversidade genética começou a ser amplamente conhecida (Ferreira 2006).

1.3.2) Marcadores Moleculares

Um dos trabalhos que marcaram a transição na utilização de marcadores genéticos clássicos para marcadores moleculares presentes na molécula de DNA foi publicado na década de 80 (Botstein *et al.* 1980). Os primeiros trabalhos utilizavam DNA nuclear para a reconstrução da história de populações humanas (Wainscoat *et al.* 1986), e posteriormente começou-se a utilizar o DNAm, determinante de linhagem materna, para resolver questões de evolução humana (Cann *et al.* 1987). Atualmente, estudos focados nas migrações de populações humanas tem utilizado dado tanto de DNAm quanto de cromossomo Y (Gonçalves *et al.* 2008; Fornarino *et al.* 2009).

Existem diferentes tipos de marcadores que são utilizados para estudos evolutivos, identificação forense, mapeamento de doenças e estudos de populações, entre eles:

➤ **Minissatélites** são constituídos de um número de sequências idênticas repetidas lado a lado. Estas sequências repetitivas variam de 9 a 100 pares de bases (Figura 1.4) e, em cada *locus* hipervariável, são repetidas até 100 vezes. Os minissatélites estão dispersos por todo o genoma, e perfazem uma proporção detectável do mesmo, constituindo vários *loci* em diferentes cromossomos. Esses marcadores têm sido utilizados no melhoramento de plantas, na análise de diversidade genética e na determinação de paternidade (Dallas *et al.* 1988; Pena *et al.* 1995). Os VNTR (do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*) e “*loci* hipervariáveis” são sinônimos de minissatélites e utilizados na literatura para se referir a esta classe de marcadores moleculares que envolvem sequências repetitivas.



gttttagatc cctgataaac gcaaaatg(**gta tatatatacg tgtatatata tatatacacg tatata**)_n tggc
gctgaatgtt

Figura 1.4: Representação esquemática de um minissatélite, em uma das fitas do DNA, onde a unidade de repetição corresponde a uma sequência de 39 nucleotídeos representada em vermelho na sequência acima.

➤ **Microssatélites** (ou STR *short tandem repeats* – repetições simples em sequência), são *loci* variáveis (polimorfismos) que consistem de um número variável de unidades repetitivas de 1-6 pares de base de comprimento (Figura 1.5), e surgem de dificuldades na exatidão da duplicação do DNA. Constituem em aproximadamente 3% do genoma humano (Watson *et al.* 2006).

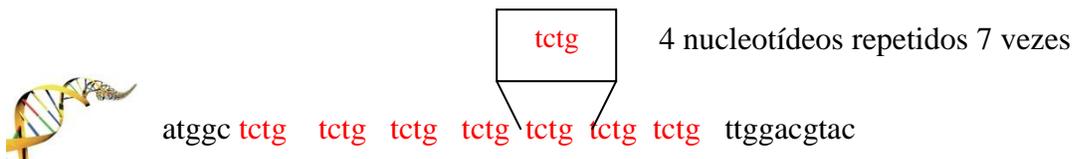


Figura 1.5: Representação esquemática de um microssatélite, em uma das fitas de DNA, onde a unidade de repetição é a sequência TCTG e essa se encontra repetida sete vezes na sequência acima.

➤ **Indels** (inserções-deleções), em 2002 o Projeto Genoma Humano reportou a caracterização de 2.000 polimorfismos de inserção-deleção no genoma humano, que constituem uma poderosa ferramenta diagnóstica para estudos populacionais e de doenças genéticas. Trabalhos utilizando esses marcadores já foram utilizados para a caracterização da população brasileira (Bastos-Rodrigues *et al.* 2006) (Figura 1.6).

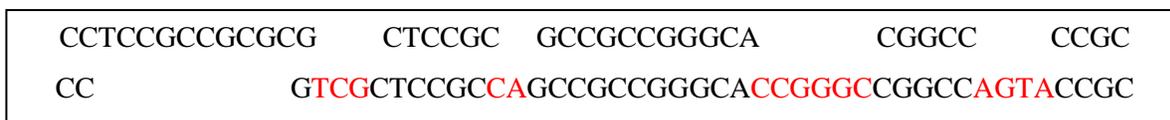


Figura 1.6: Representação esquemática dos *indels*, onde a primeira linha representa a sequência original e os espaços em branco da segunda linha representam as deleções, enquanto que os nucleotídeos em vermelho representam as inserções em relação a sequência original.

➤ **SNP** (do inglês *single nucleotide polymorphisms* - polimorfismos de nucleotídeos únicos) são polimorfismos em um único par de base no DNA, onde sequências alternativas (alelos) existem em indivíduos normais em algumas populações; a frequência alélica mínima deve ser de 1% (Brookes 1999) (Figura 1.7). Estão distribuídos em todo o genoma e ocorrem com uma frequência notável de aproximadamente um em cada 1.200 a 2.000 pares de bases e, portanto representam as variáveis mais comuns no genoma humano (Lander *et al.* 2001). Possuem baixas taxa mutacionais, cerca de 2×10^{-8} por base e por geração e por isso são conhecidos como marcadores de evolução lenta (Thomson *et al.* 2000). Inserções e deleções não são formalmente consideradas como SNPs. Em princípio, esses podem ser polimorfismos bi-, tri- ou tetra alélicos. Entretanto, em humanos, SNPs tri e tetra alélicos são extremamente raros, por isso, às vezes, são referidos somente como marcadores bi-alélicos (ou di-alélicos, também etimologicamente correto) (Brookes 1999).

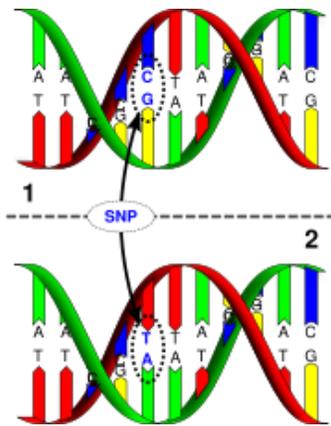


Figura 1.7: Representação esquemática de duas fitas duplas de DNA, onde observa-se em um mesmo ponto uma variação de um único nucleotídeo (www.dadamo.com/wiki/hapmap.jpg).

Os SNPs têm sido usados para análises de polimorfismos no cromossomo Y, como ferramentas para as diversas áreas, entre elas: forense (Jobling *et al.* 1997; Sanchez *et al.* 2003; Onofri *et al.* 2006); reconstrução genealógica (Hammer *et al.* 1998; Hurles *et al.* 1999; Hammer *et al.* 2000; Jobling 2001); genética médica (Jobling e Tyler-Smith 2000) e estudos de evolução humana (Hammer e Zegura 1996; Rosser *et al.* 2000; Underhill *et al.* 2000).

1.4) MARCADORES DE LINHAGEM

O uso de marcadores polimórficos de linhagem, não sujeitos à recombinação e em estado haplóide, como o cromossomo Y e o DNAm_t humano, permite uma análise mais correta e detalhada dos movimentos migratórios que originaram as populações atuais (Santos e Tyler-Smith 1996, Underhill *et al.* 2001). Diferente dos cromossomos autossômicos, esses marcadores possuem um padrão de herança característico: são herdados de apenas um dos genitores (do pai, no caso do cromossomo Y e da mãe, no caso do DNAm_t), por isso, são também chamados de uniparentais e não trocam genes com outros segmentos genômicos (não se recombinam), sendo transmitidos às gerações seguintes em blocos de genes (denominados haplótipos). Adicionalmente, o cromossomo Y e o DNAm_t fornecem informações complementares, permitindo traçar patri e matrilineagens que alcançam dezenas de gerações no passado, podendo assim reconstruir a história genética de um povo (Pena *et al.* 2000).

1.4.1) Cromossomo Y

As propriedades do cromossomo Y violam o “livro de regras” da genética humana: não é essencial para a vida de um indivíduo (homens possuem e mulheres não) e mais da metade de sua sequência consiste de repetições em *tandem* (Jobling e Tyler-Smith 2003). Estão descritos 5.624 polimorfismos STR do tipo AC/TG, com uma média de heterozigosidade de 70%, e o restante carrega poucos genes. A maior parte (mais de 90%) do cromossomo Y humano não sofre recombinação – haplótipos são transmitidos inalterados de pai para filho por gerações e gerações (Figura 1.8).

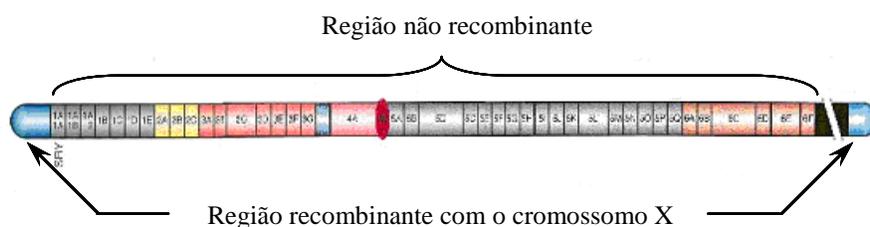


Figura 1.8: Representação do cromossomo Y, sendo representadas as regiões não recombinantes (NRY) e recombinantes com o cromossomo X.

1.5) HAPLOGRUPOS

Por convenção, se o cromossomo Y for caracterizado por polimorfismos binários esses serão chamados de haplogrupos; os caracterizados por STRs, de haplótipos, enquanto que os caracterizados pela combinação de ambos são chamados de linhagens (de Knijff 2000).

O *Y Chromosome Consortium* (YCC 2002) definiu regras para agrupar as mutações diagnósticas dentro da árvore dos polimorfismos binários do cromossomo Y e definiu que os haplogrupos do cromossomo Y fossem agrupados por letras maiúsculas que vão de A-R (YCC 2002). A frequência relativa dos haplogrupos varia de uma população para outra (Figura 1.9). Alguns haplogrupos do cromossomo Y são específicos de determinadas regiões geográficas, sendo a combinação dos marcadores moleculares, como os SNPs por exemplo, que definem esses haplogrupos (Jobling 2001).

As marcas genéticas deixadas pelos homens ao migrarem para as diferentes regiões continentais, há aproximadamente 100.000 anos atrás, são possíveis de serem vistas ainda hoje através do gradiente da distribuição das frequências alélicas. Conforme a população humana migrava para ocupar novas regiões geográficas, mutações foram ocorrendo e novos haplogrupos foram sendo

estabelecidos. Geralmente quanto mais antigo for um haplogrupo maior a sua distribuição geográfica. Uma parte dos haplogrupos ainda tem uma distribuição geográfica relativamente restrita a algumas partes do globo, o que permite a suposição da sua origem geográfica ou étnica (Pena *et al.* 2000).

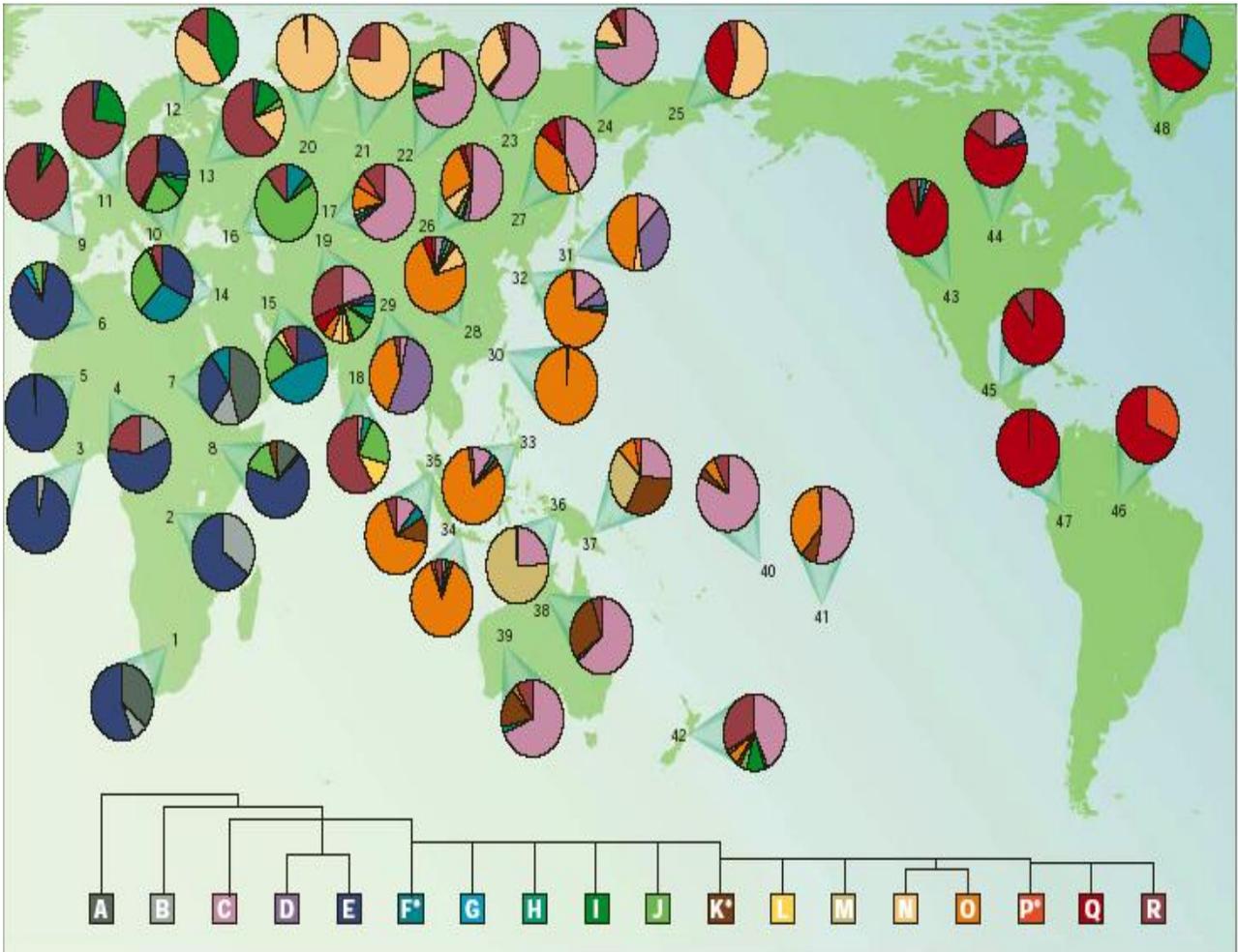


Figura 1.9: Distribuição global dos haplogrupos do Y. Cada círculo representa uma amostra populacional com a frequência dos 18 principais haplogrupos do Y (Fonte: Jobling e Tyler-Smith, 2003).

Polimorfismos que não estão definidos como base dos caracteres, estão representados no interior dos nós e por serem potencialmente parafiléticos, são chamados de paragrupos (e identificados pelo símbolo *). Dois sistemas de nomenclaturas complementares foram propostos por Karafet e col. (2008) e esses são adotados neste estudo. O primeiro define hierarquicamente subclados dentro de cada haplogrupo maior, utilizando o sistema alfanumérico (ex.: E1, E1a, E1a1). O segundo sistema é baseado na mutação alternativa mais curta, nomeando o haplogrupo pela mutação que a define (ex.: E*-M96).

Mutações definidas pelo prefixo “M” (do inglês *mutation*) e pelo prefixo “p” (do inglês *polymorphism*) foram publicadas por Underhill e col. (2001), de acordo com as frequências dos haplogrupos e com a ordem de ocorrência dos eventos mutacionais. A disponibilidade de sequências do cromossomo Y permite que existam mais de 200 SNPs bem caracterizados e entre 100 e 200 STR potencialmente úteis. Uma filogenia bastante robusta foi desenvolvida com base nestas mutações, assim como um sistema de nomenclatura de haplogrupos unificado que permita a integração entre os diferentes dados dos grupos de pesquisa (Figura 1.10).

1.5.1) Os principais haplogrupos

A análise dos haplogrupos definidos pelo polimorfismo binário do cromossomo Y, tem se aproximado de um padrão para estudos da origem da população humana moderna e para medir a variabilidade entre elas (Brion *et al.* 2004).

Dentre os haplogrupos determinados pelo YCC (2002), alguns devem ser destacados em razão da importância na composição da população brasileira, mais especificamente na população do Rio de Janeiro.

➤ **Haplogrupo B C D**

Este haplogrupo é definido por um polimorfismo no gene *SRY*_{10,831} e possui uma vasta distribuição incluindo Europa, África e Ásia.

➤ **Haplogrupo E**

A mutação M96 define este haplogrupo. Este haplogrupo é encontrado em alta frequência na África e moderadas frequências no Oriente Médio e sul da Europa, com ocorrência ocasional no centro e sul da Ásia (Hammer *et al.* 1998; Underhill *et al.* 2001; Semino *et al.* 2004). A maioria dos cromossomos africanos pertence aos haplogrupos E (Jobling e Tyler-Smith 2003), principalmente na África Subsaariana (Hammer *et al.* 1998).

A linhagem do paragrupo mais basal deste clado, o E*, foi encontrada na população Bantu, do sul da África (Karafet *et al.* 2008).

Haplogrupo E1b1a – É definido pela mutação M2 e também é uma linhagem africana. A hipótese atual é que este grupo teria se dispersado do norte para o sul da África na expansão agrícola da população Bantu, há aproximadamente 3.000 anos. É geograficamente restrito, e o mais comum aos povos descendentes dos africanos subsaarianos (Cruciani *et al.* 2004). É altamente frequente entre os afro-americanos.

Haplogrupo E1b1b1 – É definido pela mutação M35 e surgiu no Oriente Médio, esta mutação é compartilhada pelos africanos do sul e do leste (Cruciani *et al.* 2004). Homens deste haplogrupo são encontrados com alta frequência em Portugal (Beleza *et al.* 2006) e Espanha (Flores *et al.* 2004), provavelmente por causa da ocupação islâmica na Península Ibérica.

➤ **Haplogrupo F**

O paragrupo F* foi primeiramente observado no subcontinente Indiano com uma frequência de moderada a baixa (Karafet *et al.* 2005). Este paragrupo possui uma vasta distribuição mundial e é heterogêneo (Gonçalves *et al.* 2008).

➤ **Haplogrupo I**

É definido pela transversão de A para C no SNP M170, representa um dos dois maiores grupos europeus, sendo difundido por toda a Europa e virtualmente ausente em outros lugares (Rootsi *et al.* 2004), incluindo as regiões da Ásia próximas ao mar Mediterrâneo, sugerindo que este haplogrupo tenha surgido na Europa um pouco antes da última era Glacial. Está presente, em média, em 18% do total das linhagens paternas européias, podendo chegar a uma frequência de aproximadamente 40 – 50% em duas regiões distintas da Europa: na população Nórdica da Escandinávia e no sul da Europa perto dos Alpes Dináricos (abrange partes da Eslovênia, da Croácia, da Bósnia e Herzegovina, da Sérvia, do Montenegro e da Albânia) (Semino *et al.* 2000).

➤ **Haplogrupo J**

É caracterizado pelo *indel* 12f2 (8kb). Indivíduos pertencentes a este haplogrupo são comuns no Oriente Médio, norte da África, sul e leste Europa, Ásia Central, Paquistão e Índia (Hammer *et al.* 2000; Underhill *et al.* 2001), apresentando altas frequências na costa do Mediterrâneo; 22% na Grécia; 20 a 30% na Itália; 7,3% na Ucrânia e inexistente na Alemanha (Semino *et al.* 2004).

➤ **Haplogrupo K**

Definido pela mutação M9, com origem há aproximadamente 40.000 anos, provavelmente no sudoeste da Ásia.

➤ **Haplogrupo P**

Definida pelo polimorfismo 92R7, consiste em duas distribuições amplas dos haplogrupos Q e R.

➤ **Haplogrupo Q1a3a**

É definida pela mutação M3 (de C para T). O alelo T é ausente entre os africanos, europeus e asiáticos do sul do pacífico (Karafet *et al.* 1997). Existem duas teorias para explicar a entrada deste alelo nos nativos ameríndios e em algumas populações da Sibéria. A primeira é de que este alelo teria surgido na Sibéria e depois se espalhado pelo Novo Mundo (Lell *et al.* 1997). A segunda hipótese é que este alelo teria se originado no Novo Mundo (ao leste de Beringia) e a sua presença na Sibéria é por causa de uma migração de volta para o Alaska pelo estreito de Bering (Underhill *et al.* 1996; Karafet *et al.* 1997).

Como o haplogrupo Q representa a maioria de todos os cromossomos Y nativos das Américas (>90%), esta é a linhagem mais informativa para reconstruir esta história. A maioria dos nativos americanos pertence a este haplogrupo e uma grande proporção deles pertence a sublinhagem, Q1a3a (antigo haplogrupo Q3 e 18). O haplogrupo Q está espalhado pelo centro e nordeste da Ásia (Jobling e Tyler-Smith 2003).

➤ **Haplogrupo R**

Há controvérsia de quando surgiu a mutação que lhe deu origem: uns datam há 16.300 ± 4.400 (Hammer e Zegura 2002) e outros há 26.800 (19.900 – 34.300) (Karafet *et al.* 2008). A maioria dos europeus pertence a esse haplogrupo. Movimentos substanciais na África do Norte evidenciam pelo menos uma migração pré-histórica da África Subsaariana, carregando o haplogrupo R para a região nordeste de Camarões.

Haplogrupo R1a – É definido pela presença do alelo ancestral A no gene *SRY*_{10.831} e é atualmente encontrado no centro e oeste da Ásia, Índia e leste da Europa.

Haplogrupo R1b1 – É caracterizado pelo polimorfismo P25 e é o mais representativo da população europeia e a maioria dos portugueses e brasileiros pertencem a este haplogrupo. Um estudo com a população portuguesa (Beleza *et al.* 2006) mostrou que 51% dos indivíduos pertencem a este haplogrupo.

1.6) IMPORTÂNCIA DA ANCESTRALIDADE NA GENÉTICA MÉDICA

As reações adversas a medicamentos (ADRs, do inglês *adverse drugs reaction*) constituem um problema importante na prática do profissional da área da saúde. Sabe-se que essas são causas significativas de hospitalização, aumento no tempo de permanência hospitalar e até mesmo de óbito (Einarson, 1993).

As ADRs e a possibilidade de ocorrer interações medicamentosas são respostas que, muitas vezes, estão relacionadas à variabilidade individual. A variação entre populações foi observada através da toxicidade a alguns fármacos, como por exemplo, o tuberculostático isoniazida. A eliminação deste fármaco depende principalmente de acetilação, envolvendo acetil *CoA* e a enzima *N*-acetiltransferase. O polimorfismo do gene *NAT2* está relacionado à presença de capacidades acetiladoras distintas entre diferentes populações. Estudos envolvendo descendentes europeus e africanos subsaarianos mostraram que essas populações possuem uma alta frequência de alelos acetiladores lentos (Agúndez *et al.* 2008; Cavaco *et al.* 2004), enquanto que em populações japonesas, chinesas e ameríndias, foi observada uma alta frequência de alelos acetiladores rápidos (Sekine *et al.* 2001; Xei *et al.* 1997; Jorge-Nebert *et al.* 2002). Alguns estudos, considerando a população brasileira (Teixeira *et al.* 2007), concluíram que 49% desses acetiladores eram lentos; 37,6% intermediários e 13,4% rápidos. Assim, o risco de toxicidade causada pela deficiência de metabolização da isoniazida varia em diferentes populações.

O conjunto de trabalhos mencionados mostra que o risco de toxicidade causada pela deficiência de metabolização da isoniazida varia em diferentes populações. Portanto, uma vez que: a) a importância de estudos de ancestralidade está relacionada a um melhor entendimento e caracterização da nossa população e dos seus processos migratórios, b) as características físicas são pouco informativas e c) é sabido que a susceptibilidade a determinadas doenças e a resistência a fármacos (em alguns casos)

possuem incidências diferentes de acordo com a etnia, torna-se de especial relevância a procura da melhor caracterização de uma população miscigenada como a brasileira.

Os avanços obtidos pela biologia molecular e a bioinformática têm exercido um papel revigorante sobre a genética de populações. Esta última constitui-se numa ferramenta fundamental na análise da variação genética nas populações, com aplicações na genética médica, na epidemiologia de doenças de natureza multifatorial, no melhoramento genético animal e vegetal, etc. Entretanto, a importância do objetivo básico da genética de populações está relacionada com seu papel de suporte para os estudos da evolução biológica, os mecanismos e processos pelos quais as mudanças evolucionárias acontecem. As sequências do DNA têm registrado padrões da história evolucionária e a aplicação da genética de populações para interpretar tais sequências tem revelado muitos segredos relativos à evolução passada. Certamente, a análise do processo evolucionário só pode ser feito de maneira multidisciplinar, envolvendo a biologia molecular, a genética, a ecologia, a sistemática, a genética humana, a sociologia, a antropologia, matemática e estatística.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar como os diversos grupos, que participaram das migrações para o Brasil, de fato contribuíram no decorrer desses cinco séculos para o *pool* genético de origem paterna encontrado na atual estrutura da população brasileira, particularizada neste projeto no processo de constituição genética de uma fração da população metropolitana residente no Estado do Rio de Janeiro.

2.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronizar a PCR-*Multiplex*, incluindo todos os 13 pares de primers específicos para os alvos de interesse, para posterior identificação dos diferentes polimorfismos por minissequenciamento;
2. Elaborar e padronizar a técnica de minissequenciamento (SNaPshot®) para análise dos 13 alvos de interesse;
3. Determinar as frequências destes marcadores na população masculina do Rio de Janeiro;
4. Comparar as frequências destes marcadores, com as observadas na população mundial;
5. Identificar os haplogrupos aos quais pertencem os indivíduos homens do Rio de Janeiro;
6. Determinar as frequências dos haplogrupos na nossa população masculina e comparar com dados da literatura, de outras populações brasileiras e mundiais;
7. Determinar a contribuição tripartite (portugueses, africanos e ameríndios) da nossa população masculina do Rio de Janeiro e compará-las com dados da literatura de outras regiões brasileiras;

3. METODOLOGIA

3.1) AMOSTRA

Foram utilizadas 200 amostras de indivíduos brasileiros não-aparentados, residentes no Rio de Janeiro, escolhidos aleatoriamente de participantes de estudos de paternidade (Figura 3.1). As amostras foram cedidas de um banco de doadores da defensoria pública do Estado do Rio de Janeiro. Foram incluídos na amostra os indivíduos residentes no Rio de Janeiro e não houve separação dos indivíduos por etnia ou classe ou social.

A amostra populacional selecionada abrange as características da população do Rio de Janeiro, uma vez que nela estão incluídos indivíduos de todas as classes sociais e etnia.

Todos os participantes envolvidos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecidos (TCLE), no qual consta que eles estão cientes do intuito da pesquisa. Esse projeto foi submetido e aceito pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Fiocruz (CEP-476/08). Todas as amostras utilizadas foram identificadas por um código, mantendo assim a identidade dos indivíduos no anonimato.

3.2) EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue coletadas em papel especialmente desenvolvido para este fim (papel FTA, Whatman®). Amostras de DNA foram obtidas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Whatman® Corporation) (Figura 3.1).

3.3) REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) – *SINGLEPLEX*

A reação de PCR para amplificação das regiões que contêm os SNPs selecionados foi realizada utilizando os *primers* descritos por Sanchez e col. (2003), com exceção do *primer* M168 (Brión *et al.* 2005) e do M3 (Blanco-Verea *et al.* 2006) (Tabela 3.1).

Cada um dos *primers* foi testado separadamente, em uma reação de *PCR-Singleplex* para que fosse conhecido o seu perfil de amplificação (figura 3.1). O protocolo de amplificação utilizado

também foi descrito Sanchez e col. (2003), a única modificação foi na temperatura de pareamento de alguns *primers*. O programa de temperaturas utilizado foi:

30 ciclos { 94°C – 5 min.
95°C – 30 seg.
55° a 60°C – 30 seg.
72°C – 30 seg.
72°C – 5 min.

Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, e o marcador utilizado foi de 100pb (Invitrogen ®).

Tabela 3.1: Representação dos 13 SNPs do Cromossomo Y utilizados no estudo, assim como o número de depósito no GeneBank, sequência dos *primers forward* e *reverse*, para a amplificação por PCR dos treze fragmentos de DNA contendo os SNPs de interesse e o tamanho do produto gerado.

<i>Locus</i>	GeneBank	<i>Primer 5' → 3'</i>		Tam do fragment
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<i>SRY</i> ₁₀₈₃₁	Rs2534636	TCA TCC AGT CCT TAG CAA CCA TTA	CCA CAT AGG TGA ACC TTG AAA ATG	150pb
M2	Rs3893	ACG GAA GGA GTT CTA AAA TTC AGG	AAA ATA CAG CTC CCC CTT TAT CCT	128pb
M3		CTG CCA GGG CTT TCA AAT AG	AAG GGC ATC TTT CAT TTT AGG T	93pb
M9	Rs3900	AGG ACC CTG AAA TAC AGA ACT G	AAA TAT TTC AAC ATT TCA CAA AGG AA	186pb
M35	Rs1179188	AGG GCA TGG TCC CTT TCT AT	TCC ATG CAG ACT TTC GGA GT	96pb
M96	AC010889	TGC CCT CTC ACA GAG CACT T	CCA CCC ACT TTG TTG CTT TG	143pb
M168		GTG GAG TAT GTG TTG GAG GTG A	CCT CTA TCA GAC CAT GGT AAT CTC A	145pb
M170	Rs2032597	CAG CTC TTA TTA AGT TAT GTT TTC ATA TTC TGT G	GTC CTC ATT TTA CAG TGA GAC ACA AC	119pb
M173	Rs2032624	TTT TCT TAC AAT TCA AGG GCA TTT AG	CTG AAA ACA AAA CAC TGG CTT ATC A	81pb
M213	Rs2032665	CCA TAT AAA AAC GCA GCA TTC TGT T	TGG AGA GAA CTT GAG AAA AAG TAG AGA A	176pb
12f2	AC005820	CAC TGA CTG ATC AAA ATG CTT ACA GAT	GGA TCC CTT CCT TAC ACC TTA TAC A	90pb
92R7	Rs2535813	TTA AAT CCC TCC TAT TTG TGC TAA CC	AAT GCA TGA ACA CAA AAG ACG TAG A	89pb
P25	Rs150173	TGG ACC ATC ACC TGG GTA AAG T	GGC AGT ATA AGG TTG TCA CAT CAC AT	109pb

3.4) PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR PRÉ-SEQUENCIAMENTO

Para eliminar o excesso de *primer* e dNTP, que é prejudicial na análise do sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados, utilizando o kit *MinElute PCR purification spin column* (Qiagen®, Hagen, Germany) (Figura 3.1).

3.5) SEQUENCIAMENTO

Para que fosse confirmada a região amplificada, foi realizado o sequenciamento de três amostras para cada um dos treze SNPs. Para a análise das sequências utilizou-se o programa BioEdit® e a partir desse, através dos *primers* descritos para a análise do minissequenciamento, o SNP de interesse foi identificado (Figura 3.1).

Os *primers* que foram utilizados no sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação *Singleplex* de PCR.

O sequenciamento foi realizado na Plataforma PDTIS/FIOCRUZ.

3.6) REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) - MULTIPLEX

Uma vez que o padrão de amplificação individual foi conhecido, todos os *primers* foram testados em uma mesma reação de amplificação através da utilização do MULTIPLEX PCR Kit® (Qiagen®, Hagen, Germany) (Figura 3.1), seguindo o protocolo do fabricante.

95°C – 15 min.
35 ciclos { 94°C – 30 seg.
60°C – 30 seg.
72°C – 90 seg.
68°C – 15 min.

Os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida a 11%, e utilizou-se como marcador molecular, o pBR322-*HaeIII*, que gera fragmentos que variam de 8 a 587pb (New England Biolabs®, Inc.).

3.7) PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para eliminar o excesso de *primer* e dNTP, que é prejudicial na análise do minissequenciamento, os produtos de PCR foram purificados, utilizando o kit *MinElute PCR purification spin colum* (Qiagen®, Hagen, Germany), seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizadas também duas enzimas, a *E. coli* exonuclease I (ExoI) e *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (USB® Corporation, Cleveland, USA) que também são utilizadas para a remoção de *primers* e dNTPs não incorporados (Figura 3.1).

Foram utilizados 2µL de ExoSAP-IT para cada 5µL de produto de PCR, posteriormente esta mistura foi submetida a uma temperatura de 37°C, por 60 minutos, para a ativação da enzima e 75°C, por 15 minutos, para a desativação da mesma.

3.8) REAÇÃO DE EXTENSÃO DE FITA SIMPLES (SNAPSHOT®)

A reação de extensão de fita simples para a posterior genotipagem dos SNPs por minissequenciamento foi realizada utilizando os *primers* descritos por Sanchez e col. (2003), com exceção do *primer* M168 (Brión *et al.* 2005) e do M3 (Blanco-Verea *et al.* 2006) (Tabela 3.2).

O minissequenciamento do PCR-*multiplex* foi realizado em uma reação de 10µL de volume final, sendo 1,0µL de produto de PCR purificado (6-10 ng equivalente a 5-8 fmol de cada fragmento), 5,0µL do mix de reação do SNaPshot® e 0,01-0,5 µM de cada *primer* (figura 3.1).

$$35 \text{ ciclos} \left\{ \begin{array}{l} 96^{\circ}\text{C} - 10 \text{ seg.} \\ 50^{\circ}\text{C} - 5 \text{ seg.} \\ 60^{\circ}\text{C} - 30 \text{ seg.} \end{array} \right.$$

Foi utilizado um controle positivo (providenciado com o kit) e um controle negativo (água estéril ou ausência de produto final de PCR ou ainda produto final de PCR vindo de uma mulher), em cada reação.

Tabela 3.2: Nome dos 13 polimorfismos do Cromossomo Y utilizados, assim como a sequência dos *primers forward* ou *reverse*, para a genotipagem pela reação de minisequenciamento (SNaPshot®) dos treze fragmentos de DNA contendo os SNPs de interesse, a concentração de cada *primer*, o tamanho do produto gerado e o polimorfismo esperado.

	Poly dC	Sequencia 5'-cauda (5'-3')	Sequencia alvo específica (5'-3')		μM	pb	Polimorfismo
SRY ₁₀₈₃₁	10	AAC TGA CTA AAC TAG GTG CCA CGT CGT GAA AGT CTG ACA A	TTG TAT CTG ACT TTT TCA CAC AGT	F	0.03	74	A>G(1) - G/A(2)
M2	Nenhum	GAC AA	CTT TAT CCT CCA CAG ATC TCA	R	0.28	26	T > C
M3	Nenhum	Nenhum	GGG TCA CCT CTG GGA CTG A	F	0.15	19	C > T
M9	22	AAC TGA CTA AAC TAG GTG CCA CGT CGT GAA AGT CTG ACA A	CAT GTC TAA ATT AAA GAA AAA TAA AGA G	R	0.40	90	C > G
M35	Nenhum	GGT GCC ACG TCG TGA AAG TCT GAC AA	TCG GAG TCT CTG CCT GTG TC	R	0.25	46	C > G
M96	Nenhum	AAC TGA CTA AAC TAG GTG CCA CGT CGT GAA AGT CTG ACA A	GGA AAA CAG GTC TCT CAT AAT A	F	0.15	62	G > C
M168	DC+3(dTdC)	AAC TGA CTA AAC TAG GTG CCA CGT CGT GAA AGT CTG ACA A	CTA TTG TTT TAA TTC TTC AGC TAG C	R	0.15	72	C>T
M170	Nenhum	Nenhum	CAA CCC ACA CTG AAA AAA A	R	0.02	19	T > G
M173	3	AAC TGA CTA AAC TAG GTG CCA CGT CGT GAA AGT CTG ACA A	TAC AAT TCA AGG GCA TTT AGA AC	F	0.03	66	A > C
M213	Nenhum	ACG TCG TGA AAG TCT GAC AA	TCA GAA CTT AAA ACA TCT CGT TAC	R	0.05	44	T>C
12f2	29	AAC TGA CTA AAC TAG GTG CCA CGT CGT GAA AGT CTG ACA A	AAC ATG TAA GTC TTT AAT CCA TCT C	F	0.02	94	Indel
92R7	Nenhum	GTG AAA GTC TGA CAA	CAT GAA CAC AAA AGA CGT AGA AG	R	0.01	38	C > T
P25	Nenhum	TCG TGA AAG TCT GAC AA	TGC CTG AAA CCT GCC TG	F	0.04	34	C>A

3.9) PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DE EXTENSÃO DE FITA SIMPLES

Após a reação de extensão de fita simples, esse produto foi purificado, com o objetivo de remover todo o grupamento 5' fosforil não incorporado de ddNTP. Foi utilizado 1,0µL (o equivalente a uma unidade) de SAP para cada 5,0 µL de produto de SNaPshot®, posteriormente esse mix foi submetido a uma temperatura de 37°C, por 60 minutos, para a ativação da enzima e 75°C, por 15 minutos para a desativação da mesma (Figura 3.1).

3.10) ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS FRAGMENTOS - MINISSEQUENCIAMENTO

Um µL do produto purificado da reação de extensão de fita simples, com 0,2µL do GeneScan – 120LIZ™ (padrão interno de tamanho de fragmento) e 9,0 µL de formamida, totalizando um volume de 10,0 µL foram analisados no sequenciador ABI PRISM® 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem®) com 36 cm de capilares, POP-7 polymer e 10 segundos a injeção de 3000V. Os dados foram analisados com o programa GeneMapper ID® v.3.2 (Applied Biosystem®) (Figura 3.1).

Foram utilizadas dez amostras para cada um dos SNPs selecionados, onde foi realizada uma corrida individual desses polimorfismos, antes da reação de *Multiplex*, para que fosse conhecido o perfil de cada um deles, uma vez que algumas vezes o tamanho dos fragmentos esperado varia de acordo com o aparelho de sequenciamento utilizado e a síntese dos *primers*.

3.11) CLASSIFICAÇÃO DOS HAPLOGRUPOS

Os haplogrupos foram definidos baseados na árvore descrita pelo YCC (2002) com as mutações diagnósticas para o cromossomo Y. A combinação entre os alelos ancestrais e mutantes caracterizam os haplogrupos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Combinação dos alelos mutantes e ancestrais de cada um dos treze SNPs utilizados na análise para caracterização dos haplogrupos, as cores representam a fluorescência captada pela eletroforese de capilar.

	SRY	M168	M96	M213	M2	M35	M170	12f2	M9	92R7	M3	M173	SRY	P25
B C D	G	T	G	T	A	G	A	A	C	GA	C	A	G	C
E	G	T	C	T	A	G	A	A	C	GA	C	A	G	C
E1b1a	G	T	C	T	G	G	A	A	C	GA	C	A	G	C
E1b1b1	G	T	C	T	A	C	A	A	C	GA	C	A	G	C
F	G	T	G	C	A	G	A	A	C	GA	C	A	G	C
I	G	T	G	C	A	G	C	A	C	GA	C	A	G	C
J	G	T	G	C	A	G	A	del	C	GA	C	A	G	C
K	G	T	G	C	A	G	A	A	G	GA	C	A	G	C
P	G	T	G	C	A	G	A	A	G	A	C	A	G	C
Q	G	T	G	C	A	G	A	A	G	A	T	A	G	C
R1	G	T	G	C	A	G	A	A	G	A	C	C	G	C
R1a	G	T	G	C	A	G	A	A	G	A	C	C	A	C
R1b1	G	T	G	C	A	G	A	A	G	A	C	C	G	CA

3.12) ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Para a análise estatística dos dados foram utilizados programas específicos (Figura 3.1).

Para o cálculo de frequência dos SNPs foi utilizado o programa GDA v.1.0 (Lewis 2001).

A análise comparativa entre as populações estudadas foi calculada através da frequência dos haplogrupos, através do índice de estrutura genética da população (AMOVA, do inglês *Analysis of Molecular Variance*) (Excoffier *et al.* 1992) pelo programa Arlequin V.3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005).

A estrutura genética da variabilidade do cromossomo Y na população do Rio de Janeiro foi testada em três níveis: 1) entre grupos (F_{CT}); 2) entre populações dentro de cada grupo (F_{SC}) e 3) dentro da população (F_{ST}) através de permutação não paramétrica (Excoffier *et al.* 1992).

Para a comparação entre algumas populações foi realizado, também pelo programa Arlequin V.3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005), o teste exato de diferenciação populacional (*Exact test of population differentiation*), este teste avalia a distribuição não-aleatória dos haplogrupos dentro de uma amostra populacional sobre a hipótese de panmixia.

A partir da matriz gerada pela distância genética (F_{ST}) foi gerado o gráfico de escala multidimensional (MDS) (Takane *et al.* 1977) através do programa SPSS v. 14.0. Enquanto que as árvores filogenéticas foram obtidas pela análise simples de grupos (UPGMA – do inglês *Unweighted Pair Group Methods using Arithmetic average*) através do programa GDA, também a partir da distância genética.

Para os cálculos de contribuição da população parental foi feito somatório das frequências de cada um dos haplogrupos de acordo com a sua origem correspondente.

Para os cálculos de mistura foi utilizado o ADMIX95, desenvolvido por Bernardo Bertoni (www.genetica.fmed.edu.uy) baseado nos programas ADMIX 2 e 3 (Chakraborty 1986).

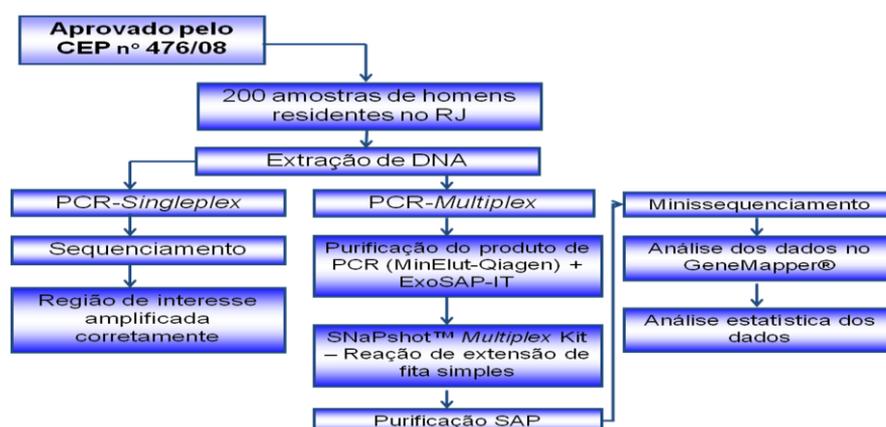


Figura 3.1: Organograma da metodologia utilizada no projeto.

4. RESULTADOS

4.1) DISTRIBUIÇÃO INTRAPOPULACIONAL DOS HAPLOGRUPOS

Com a combinação dos treze SNPs analisados foi possível a identificação de nove haplogrupos e quatro sub-haplogrupos (Figura 4.1). Cada um destes já havia sido previamente observado na população brasileira ou em uma das populações parentais que contribuíram para a sua formação. O único haplogrupo que não foi encontrado em nossa amostra de estudo foi o R1a.

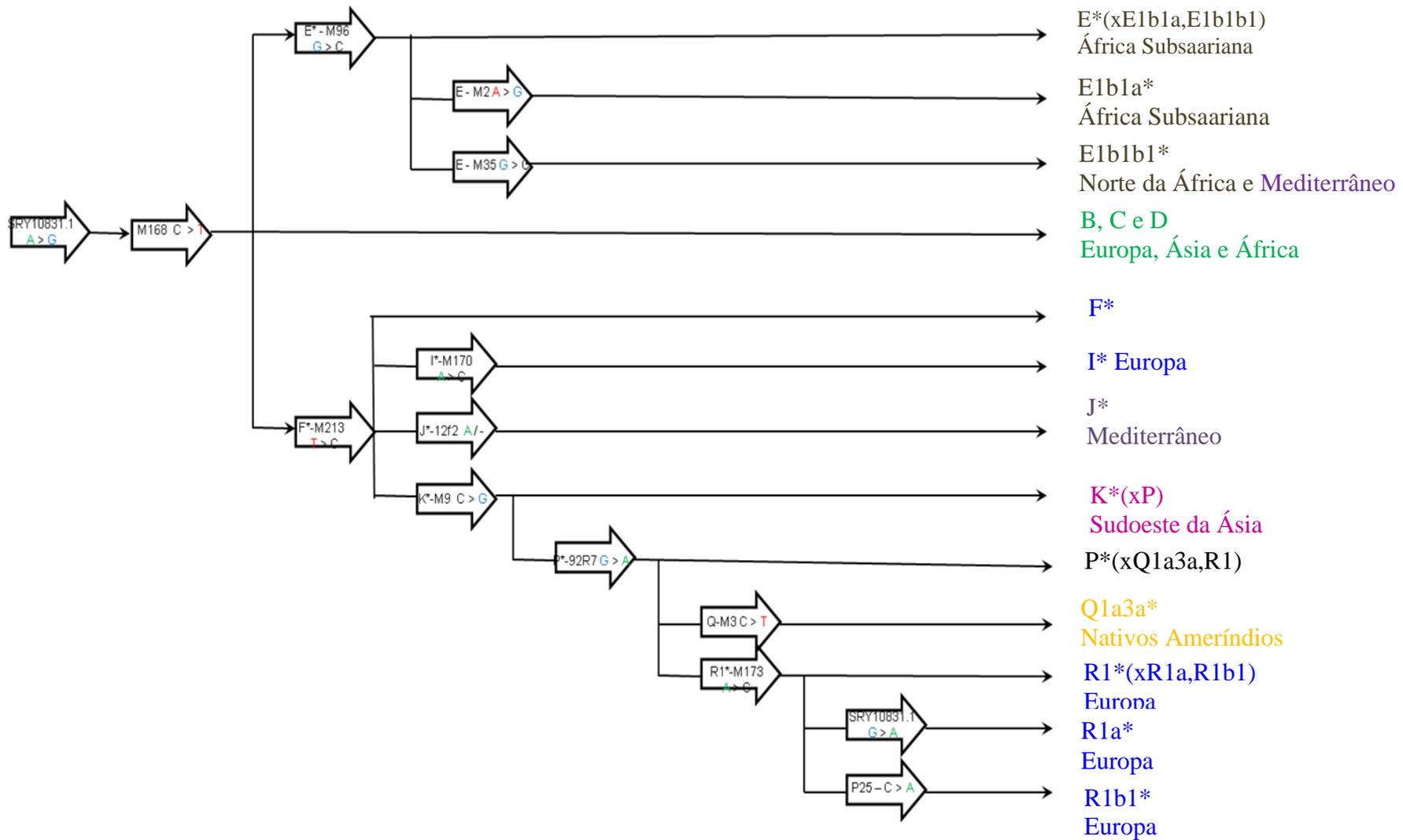


Figura 4.1: Classificação dos haplogrupos do Cromossomo Y. A primeira base de cada SNP representa o alelo ancestral e a segunda o alelo mutante. As letras correspondem a nomenclatura do cromossomo Y, segundo Karafet e col (2008).

4.2) PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS

4.2.1) PCR-*Singleplex*

Todas as reações de PCR-*Singleplex* foram submetidas a um gradiente de temperatura de pareamento e essa temperatura variou para cada um dos pares de *primers*, sendo a mínima observada de 55,6°C e a máxima de 61,9°C.

A utilização de aditivos na PCR, para a eliminação de bandas inespecíficas, também foi necessária em alguns casos. Cinco aditivos foram testados: Triton (x100), BSA (100mg/mL), formamida, DMSO e glicerol. Entre esses, apenas o Triton na concentração de 0,1% e o BSA na concentração de 10µL/mL se mostraram satisfatórios, com os quais foi observada a ausência de bandas inespecíficas (Figura 4.2).

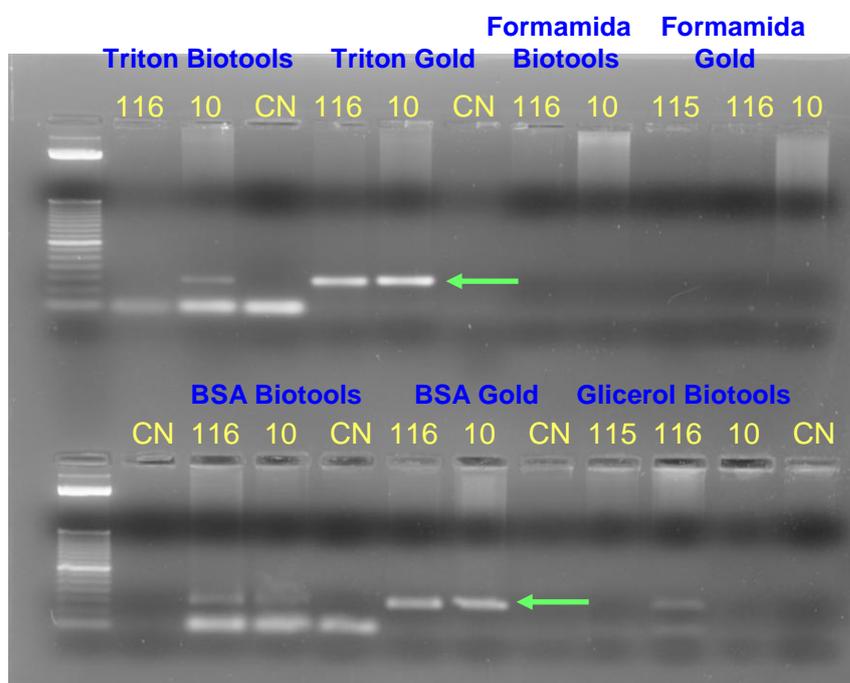
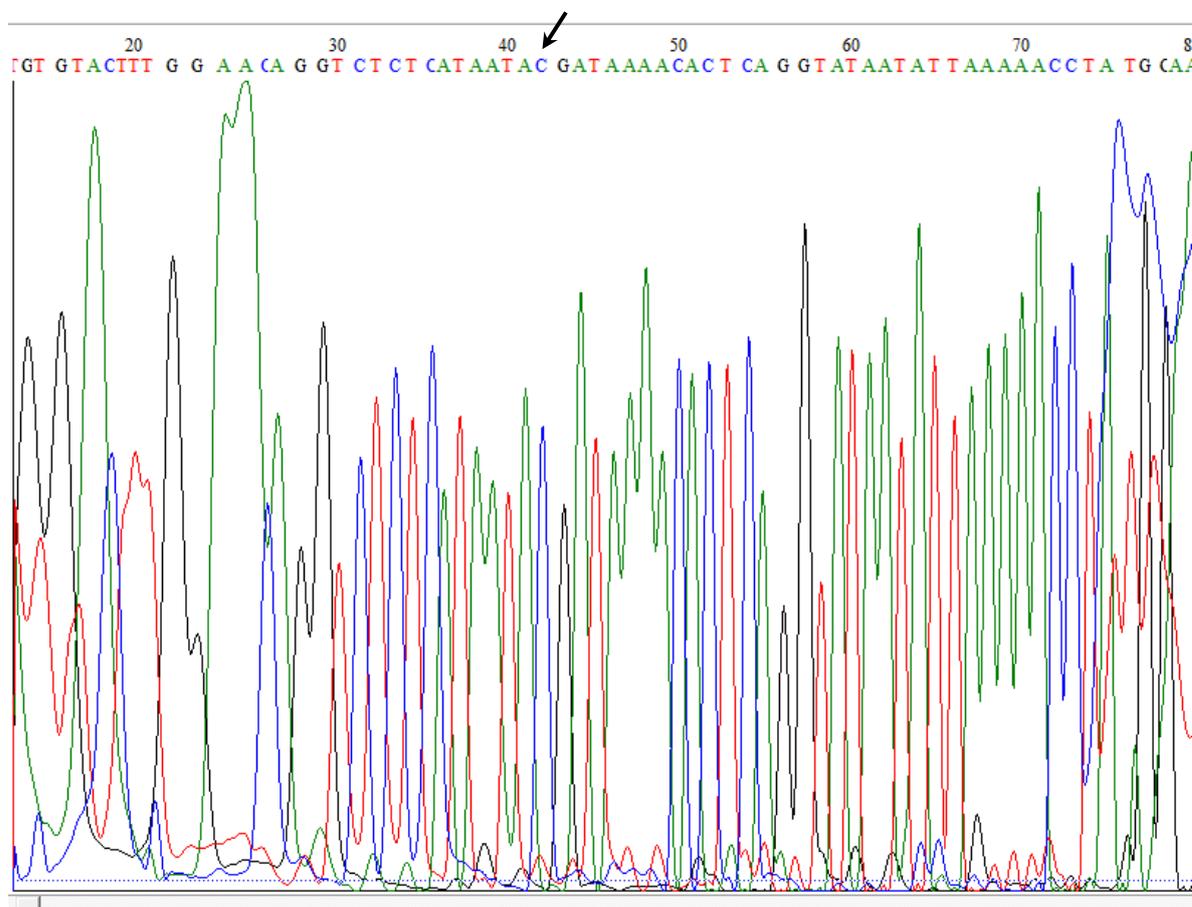


Figura 4.2: Perfil de três amostras do SNP M168, visualizadas em gel de agarose a 2,5%. O primeiro poço representa o marcador de 100pb (Invitrogen®), os seguintes as amostras identificadas pelo número (115, 116 e 10) e CN (controle negativo da reação, sem DNA). Em azul estão os aditivos da reação. A seta verde aponta para a banda de interesse.

4.2.2) Sequenciamento

A amplificação das regiões contendo os SNPs de interesse foi confirmada através da técnica de sequenciamento (Figura 4.3).



```
TAAGACCTCTTTGTGTACTTTGGAACAGGTCTCTCATAATACGATAAAACACTCAG
GTATAATATTA AAAACCTATGGAAGAAATATGGTCCTTTACAAAGCAACAAAGTGG
GTGGACCATAAGTTTCTTGTATTGAAAGTGCCAACTCTCGAAAAAAGGACGAAAGA
AAGACGTTTAAAGAAGACTAAGAAGGAAACTAGAGAGGGCGGGTTAAGAAGGGGT
TTTTGGTATGTATTTTCGATTTTGGATAACCATACTCCGCTCTTTCTTCCCTAAAAAA
```

Figura 4.3: Eletroferograma do SNP M96, a seta preta aponta o SNP de interesse. Abaixo a sequência consenso, em azul está destacado o *primer* para o minissequenciamento e em vermelho o SNP de interesse.

4.2.3) Padronização da PCR-*Multiplex*

Todos os SNPs de interesse foram amplificados em uma única reação de PCR, o tamanho dos fragmentos variou de 81 a 186pb (Figura 4.4).

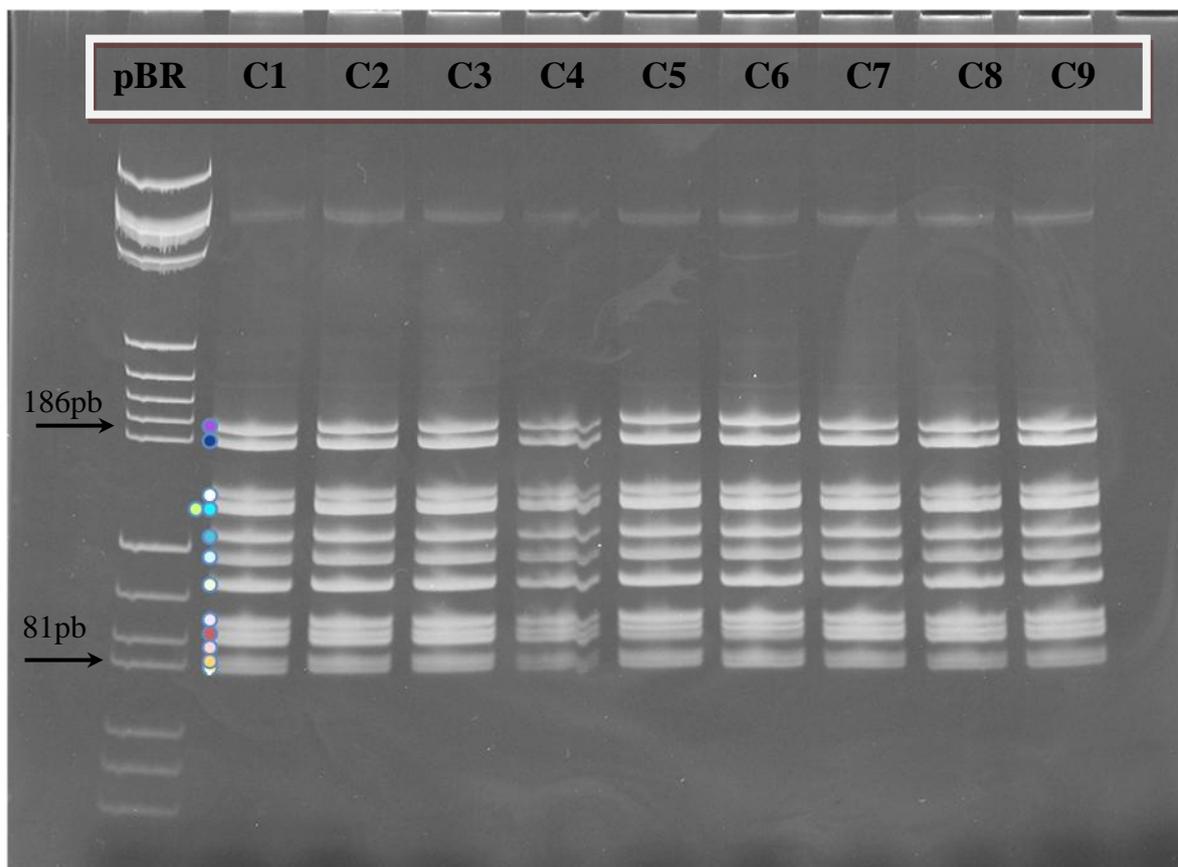


Figura 4.4: Visualização do produto de PCR *Multiplex* em gel de poliacrilamida a 11%, corado com brometo de etídio. O primeiro poço corresponde ao marcador de peso molecular, o pBR322-*HaeIII*, e esse varia de 8 pb a 577pb, e as letras de C1 a C9 correspondem as amostras e os círculos ao lado de cada banda correspondem ao fragmento de interesse; o tamanho dos fragmentos varia de 81 pb a 186pb.

4.2.4) SNaPshot®

O conhecimento do perfil eletroforético faz parte da padronização, por isso a importância de se analisar em um primeiro momento todos os SNPs separadamente.

Cada um dos SNPs selecionados apresentou um padrão específico de deslocamento pelo capilar e esse padrão foi mantido em todas as corridas individuais. Foi observada uma variação no tamanho dos fragmentos quando comparados com os esperados segundo Sanchez e col. (2003), Brión e col. (2004) e Blanco-Verea e col. (2006) e essa variação pode ser atribuída ao equipamento (o sequenciador) e à síntese dos *primers*. O polimorfismo observado só variou do esperado quando o *primer* utilizado foi o *reverse*, pois neste caso, estamos observando a fita complementar, logo o polimorfismo observado é complementar ao esperado (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Representação dos SNPs utilizados na reação de SNaPshot®, sentido do *primer* utilizado na reação, tamanho dos fragmentos esperados segundo os artigos de referência ((Sanchez *et al.* (2003), Brión *et al.* (2004) e Blanco-Verea *et al.* (2006)), tamanho dos fragmentos observados em nosso estudo, polimorfismos esperados e observados, onde a primeira base representa o alelo ancestral e a segunda o alelo derivado (ou mutante).

SNPs	<i>Primer</i>	Tamanho do fragmento		Polimorfismo	
		Esperado	observado	esperado	observado
M3	<i>Forward</i>	19	32	C > T	C > T
M170	<i>Reverse</i>	21	34	A > C	T > G
M2	<i>Reverse</i>	26	36	A > G	T > C
P25	<i>Forward</i>	34	39	C > CA	C > CA
92R7	<i>Reverse</i>	38	42	GA > A	CT > T
M213	<i>Reverse</i>	30	47	T > C	A > G
M35	<i>Reverse</i>	46	52	G > C	C > G
M96	<i>Forward</i>	62	64	G > C	G > C
M173	<i>Forward</i>	66	68	A > C	A > C
SRY	<i>Forward</i>	74	74	A > G	A > G
M168	<i>Reverse</i>	72	76	C > T	G > A
M9	<i>Reverse</i>	90	91	C > G	G > C
12f2	<i>Forward</i>	94	94	<i>Indel</i>	<i>Indel</i>

Todos os SNPs tiveram os seus perfis de extensão de uma única base conhecidos através da eletroforese individual, onde foi observado o tamanho de cada fragmento, a altura e estrutura do pico, assim como a fluorescência basal (Figura 4.5).

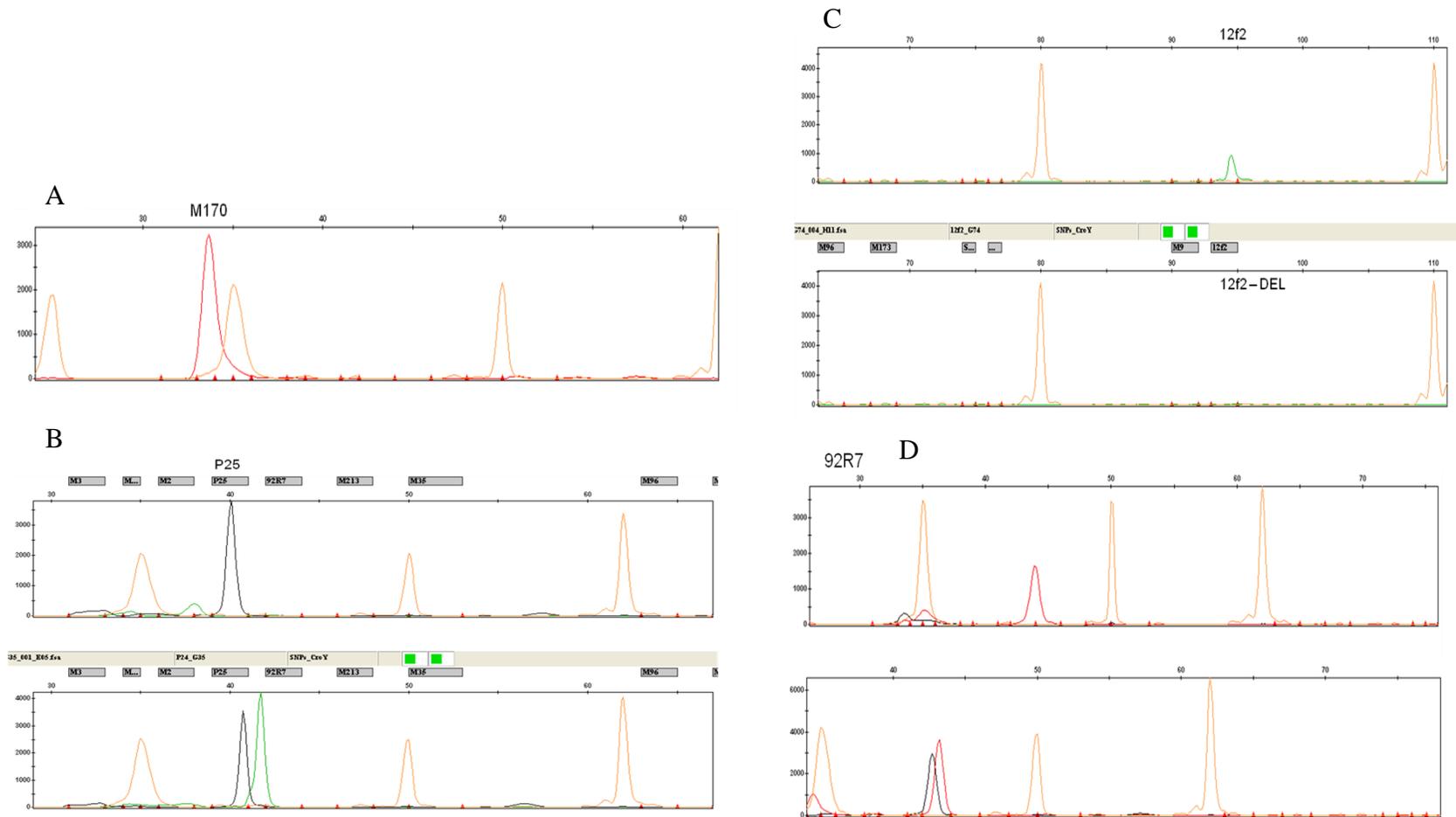


Figura 4.5: Eletroforese de quatro dos 13 SNPs estudados, através da técnica de SNaPshot®, onde: A- representa a padronização do SNP M170; B- polimorfismo P25, com as duas variantes alélicas, a ancestral e a derivada; C- *indel* 12f2, onde a variante ancestral é a presença do alelo, enquanto que a derivada é representada pela deleção; D- polimorfismo 92R7, com as suas duas variantes alélicas, ancestral e derivada. As cores em cada eletroferograma representam as bases nitrogenadas, sendo a adenina (A) – verde, timina (T) – vermelha, citosina (C) – preta, guanina (G) – azul e os picos laranja representam o padrão de peso molecular (LIZ™-120).

Diferenças de nucleotídeos únicos entre nucleotídeos da mesma posição em regiões de duplicação são erroneamente descritos como SNPs (Sanchez *et al.* 2004), o que é o caso dos polimorfismos P25 e 92R7. Recentemente foi estimado que 10% dos SNPs descritos em banco de dados são na verdade sequência parálogo variante (PSV, do inglês *paralogous sequence variants*) originados de sequência de duplicação (Estivill *et al.* 2002).

O SNP P25 foi descrito como sendo uma transversão de A – C na banda q11.223 do cromossomo Y (Hammer *et al.* 2000), enquanto que o 92R7 foi descrito como transversão de A – G na banda p11 do cromossomo Y (Mathias *et al.* 1994), porém estudos mais recentes sobre os polimorfismos P25 e 92R7, mostram que esses são na verdade PSVs, com pelo menos uma variante dentro de cada grupo de *loci* polimórfica (Sanchez *et al.* 1994).

No caso do P25, o alelo ancestral C foi encontrado em todas as amostras, pertencentes aos mais diversos haplogrupos, enquanto que somente os indivíduos pertencentes ao haplogrupo R1b1 apresentaram o alelo derivado A juntamente com a variante C.

O haplogrupo P foi definido pelo alelo derivado A no *locus* 92R7, no entanto o alelo ancestral G estava sempre associado com a variante A por causa da duplicação.

Após a identificação individual e o conhecimento do perfil de cada um dos polimorfismos de interesse, foi realizada a reação *multiplex*, onde obteve-se a genotipagem dos treze SNPs de interesse (Figura 4.6).

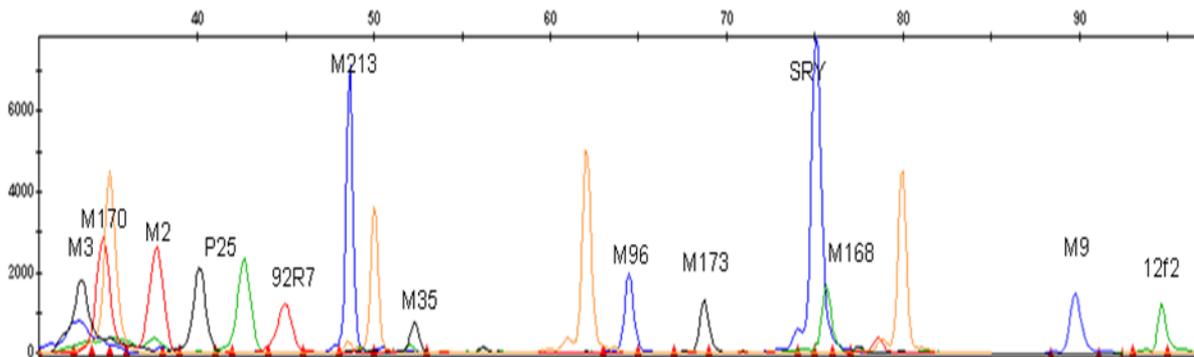


Figura 4.6: Eletoferograma contendo os treze polimorfismos de interesse, separados por tamanho de fragmento e fluorescência, que variam de acordo com a base esperada, e os picos laranja representam o padrão de peso molecular (LIZ™-120).

4.3) FREQUÊNCIA DOS SNPs NA POPULAÇÃO DO RIO DE JANEIRO X POPULAÇÃO GLOBAL

Foi calculada a frequência de cada um dos polimorfismos na população de estudo e essas foram comparadas com a distribuição global, disponível em banco de dados online (dbSNPs do Pubmed) (Tabela 4.2). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os polimorfismos da população do Rio de Janeiro com os da população mundial.

Tabela 4.2: Frequência dos alelos de cada polimorfismo estudado na população do Rio de Janeiro e a frequência global destes (dados do dbSNP Pubmed).

Alelo	Frequência na população	
	Rio de Janeiro	Global
M3	C= 0,99 / T= 0,01	C= 0,88 / T= 0,12
M170	A= 0,91 / C = 0,09	A= 0,91 / C = 0,09
M2	A= 0,94 / G= 0,06	A= 0,88 / G= 0,12
P25	C= 0,48 / A= 0,52	
92R7	G= 0,39 / A= 0,62	
M213	C= 0,81 / T= 0,19	C= 0,67 / T= 0,33
M35	G= 0,92 / C= 0,08	
M96	G= 0,84 / C= 0,16	
M173	A= 0,95 / C= 0,05	A= 0,91 / C= 0,09
SRY	A= 0,0 / G= 1,0	A= 0,11 / G=0,89
M168	C= 0,0 / T= 1,0	C= 0,11 / T= 0,89
M9	C= 0,37 / G= 0,63	C= 0,41 / G= 0,59
12f2	A= 0,93 / DEL= 0,07	

Ao compararmos os dados dos alelos T (ancestral) e C (derivado) do SNP M213 da população de estudos com os dados sobre Afro-americanos, e da região Subsaariana, disponíveis no dbSNP, foi observada uma diferença significativa ($\chi^2 = 78,70$; $p < 0,001$ e $\chi^2 = 33,28$; $p < 0,001$, respectivamente), como era de se esperar, uma vez que o SNP M213 caracteriza haplogrupos de origem européia, e corroborado por dados históricos, espera-se uma maior contribuição dos haplogrupos europeus na população masculina. Nenhuma diferença significativa foi observada entre a população de estudo e as populações da Europa e da Ásia ($\chi^2 = 0,23$; $p = 0,63$ e $\chi^2 = 0,138$; $p = 0,71$, respectivamente) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Frequência dos alelos ancestral e derivado do SNP M213 na população mundial, na Europa, na Ásia, nos Afro-americanos e região Subsaariana na África e no Rio de Janeiro.

Região	n	Alelo		χ^2	p
		C	T		
Global	42	0,667	0,333		
Europa	26	0,846	0,154	0,23	0,63
Ásia	46	0,870	0,130	0,138	0,71
Afro-Americano	22	0,182	0,818	78,70	$p < 0,001$
Subsaariana	60	0,000	1,000	33,28	$p < 0,001$
Rio de Janeiro	200	0,810	0,190		

4.4) FREQUÊNCIA DOS HAPLOGRUPOS

4.4.1) No Rio de Janeiro

Os três haplogrupos mais frequentes na nossa população, o R1b1, o I e o E1b1b1 representam juntos uma frequência de quase 70% e são frequentes também na Europa. O haplogrupo J que é comum no Oriente Médio foi o quarto mais frequente na população masculina do Rio de Janeiro. Enquanto que o menos frequente foi o de origem ameríndia, o Q1a3a, com apenas 1%. Já os haplogrupos de origem africana, o BCD, E* e o E1b1a* tiveram uma frequência ao redor de 10%. O haplogrupo R1a não foi observado em nossa população (Figura 4.7).

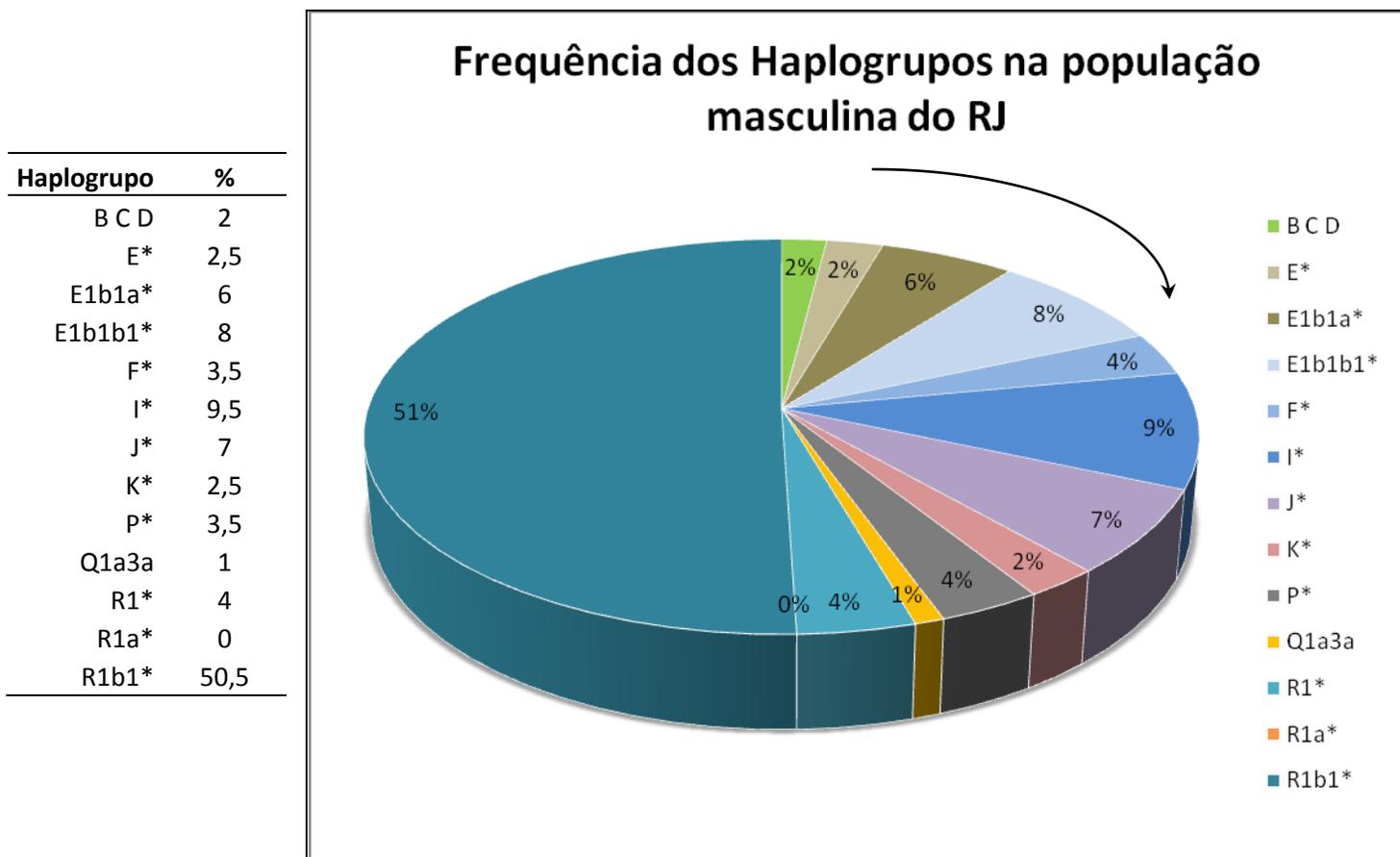


Figura 4.7: Porcentagem dos haplogrupos encontrados na população masculina do Rio de Janeiro.

4.4.2) Rio de Janeiro x População Brasileira

A diversidade do cromossomo Y, utilizando os marcadores binários, na população do Rio de Janeiro foi comparada com a população de indivíduos negros do Rio de Janeiro, com a população negra e branca de Porto Alegre e com dados de quatro das cinco regiões brasileiras, sendo cada uma delas consideradas populações para esta análise (dados da literatura: Carvalho-Silva *et al.* 2001; Hünemeier *et al.* 2007; Guerreiro-Junior *et al.* 2009), e foram formados grupos baseado no seguinte critério: 1) estudos que discriminam a cor da pele do indivíduo (RJ_B= Rio de Janeiro pretos; PA_B1, PA_B2= Porto Alegre pretos e PA_W= Porto Alegre brancos); 2) Regiões do Brasil; 3) Rio de Janeiro (Figura 4.8).

A ausência de diferença significativa foi observada entre grupos ($F_{CT}=0,012$; $p= 0,39$), enquanto diferenças significativas foram observadas entre as populações dentro de cada grupo ($F_{SC}=0,35$; $p<0,05$) e dentro das populações ($F_{ST}=0,36$; $p<0,05$). A população de estudo foi agrupada junto com a população branca de Porto Alegre, e nenhuma diferença significativa foi observada entre as regiões brasileiras.

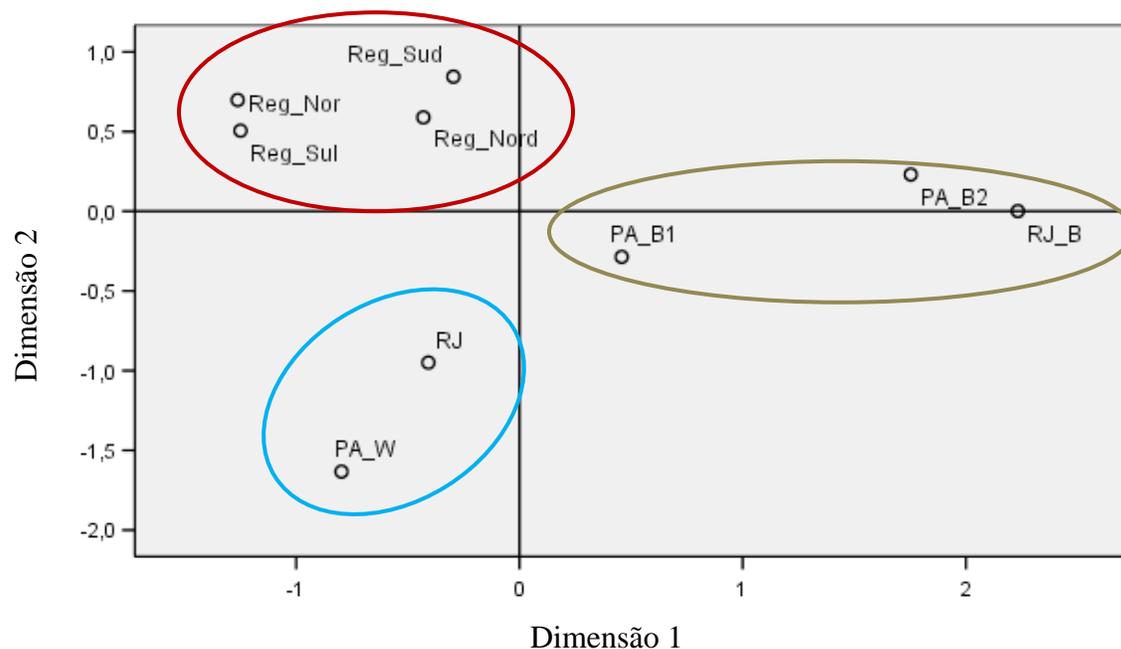


Figura 4.8: Escala multidimensional baseada na distância genética (F_{ST}) entre populações brasileiras, através de dados de indivíduos homens do Rio de Janeiro (RJ); indivíduos de cor de pele do Rio de Janeiro (RJ_B) (Hünemeier *et al.* 2007), indivíduos brancos de Porto Alegre (PA_W) e de cor de pele preta de Porto Alegre (PA_B1) (Guerreiro-Junior *et al.* 2009) e outro estudo utilizando também indivíduos negros de Porto Alegre (PA_B2) (Hünemeier *et al.* 2007); e dados da Região Sul (Reg_Sul), Sudeste (Reg_Sud), Norte (Reg_Nor) e Nordeste (Reg_Nord) (Carvalho-Silva *et al.* 2001).

Através dos dados de distância genética (F_{ST}) baseado no algoritmo UPGMA do programa GDA (Lewis 2001) foi gerada uma árvore do cromossomo Y que representa a relação de proximidade dessas populações. Foi observado um agrupamento da população do Rio de Janeiro com a população branca de Porto Alegre e uma proximidade dessa com uma das população de indivíduos pretos de Porto Alegre.

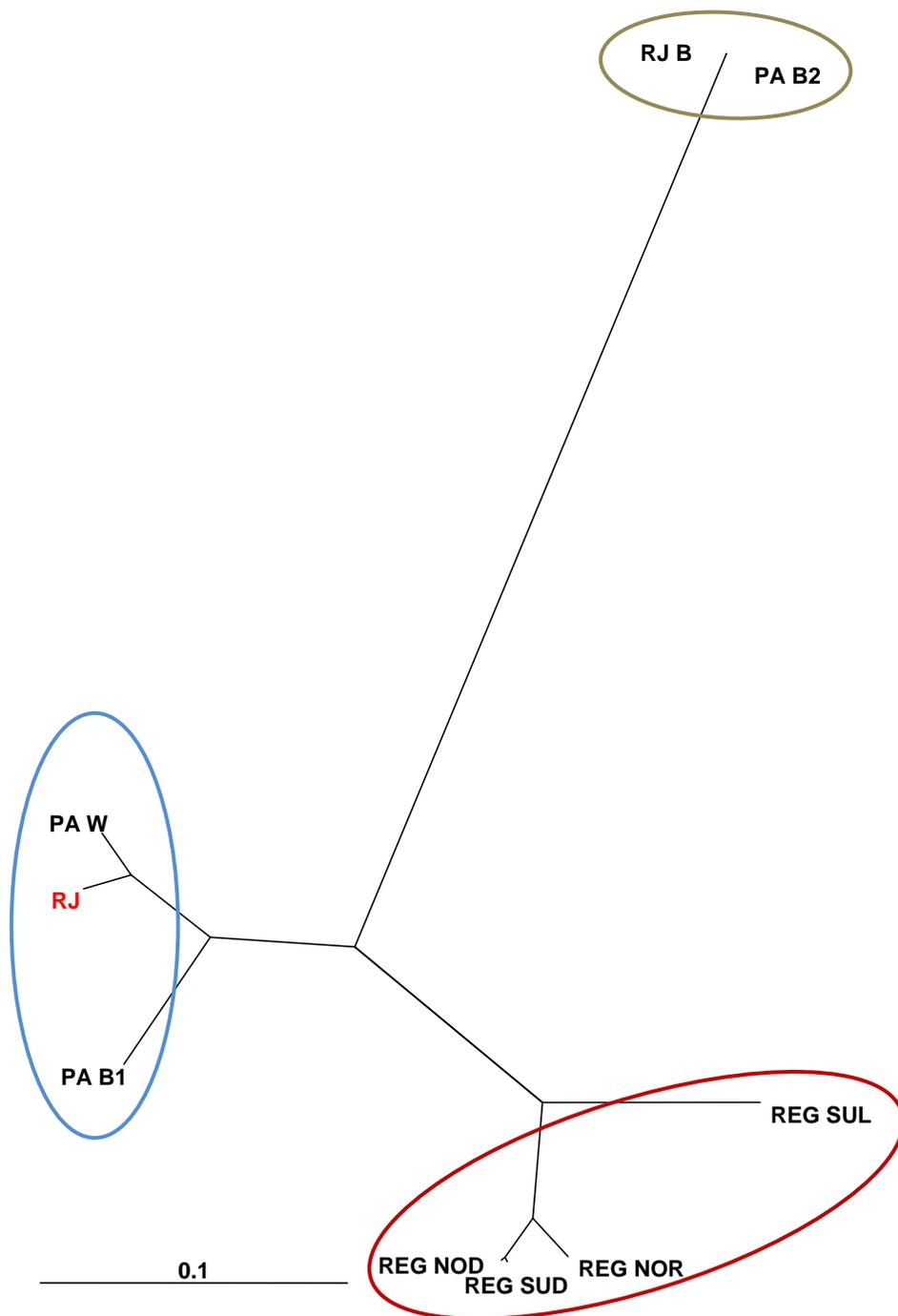


Figura 4.9: Árvore de diversidade do cromossomo Y nas populações brasileiras. Os círculos indicam um agrupamento das populações estudadas e a população de estudo, o Rio de Janeiro está destacado em vermelho.

4.4.3) Rio de Janeiro x Portugal

Ao excluirmos da análise a frequência dos haplogrupos de origem africana e ameríndia e comparamos com os dados de Portugal (Beleza *et al.* 2006), e através de um teste de não diferenciação entre essas duas populações, nenhuma diferença significativa foi observada ($p=0,54$), e a partir do cálculo da distância genética entre essas duas populações também nenhuma diferença significativa foi observada ($F_{ST}=0$; $p=0,48$).

4.4.4) População Brasileira x Portugal

Posteriormente foi incluído os dados de Portugal (Beleza *et al.* 2006), considerando-o um grupo isolado dos demais, formando assim o quarto grupo (Figura 4.10), e com a inclusão desse aos dados, não foi observada diferença significativa entre os grupos ($F_{CT}=0,03$; $p= 0,48$), porém foi observada uma diferença significativa dentro dos grupos ($F_{SC}=0,37$; $p<0,05$) e entre populações ($F_{ST}=0,35$; $p<0,05$).

A população de estudo foi agrupada juntamente com a população branca de Porto Alegre e com a população portuguesa, e com a inclusão da população portuguesa, foi observado um agrupamento das populações negras em um mesmo quadrante e um afastamento da população do Rio de Janeiro com relação a população negra de Porto Alegre 1 (PA_B1).

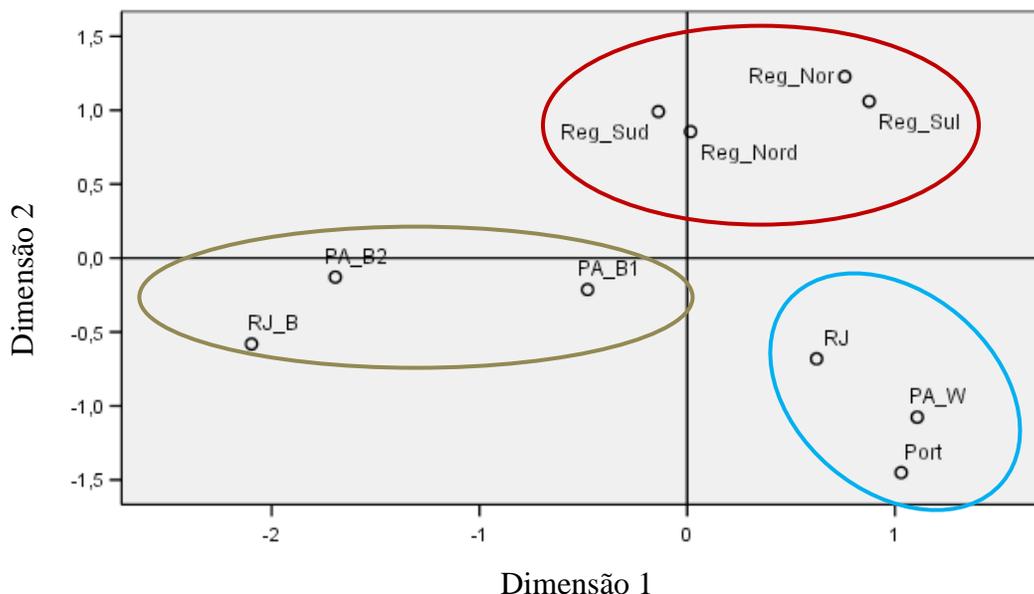


Figura 4.10: Escala multidimensional baseada na distância genética (F_{ST}) entre populações brasileiras, através de dados populacionais de homens do Rio de Janeiro (RJ); indivíduos de cor de pele preta do Rio de Janeiro (RJ_B) (Hünemeier *et al.* 2007), indivíduos brancos de Porto Alegre (PA_W) e de negros de Porto Alegre (PA_B1); (Guerreiro-Junior *et al.* 2009) e outro estudo utilizando também indivíduos negros de Porto Alegre (PA_B2) Hünemeier *et al.* 2007; e dados da Região Sul (Reg_Sul), Sudeste (Reg_Sud), Norte (Reg_Nor) e Nordeste (Reg_Nord) (Carvalho Silva *et al.* 2001) e dados da população Portuguesa (Beleza *et al.* 2006).

4.3.4) População Brasileira x População Mundial

A diversidade do cromossomo Y foi analisada, através da comparação dos dados obtidos da população de estudo com dados disponível na literatura de populações parentais que teriam migrado para o nosso país, contribuindo assim para a atual composição genética da nossa população, como: Portugal, Espanha, Itália, Alemanha; além de países africanos, como: Moçambique, Benin e Camarões e populações de São Tomé e Porto Príncipe, os Angolares. Além de populações vizinhas, como Colômbia e Argentina, e uma população representativa da Ásia, o Japão (Figura 4.11).

Foi observada diferença significativa entre os grupos ($F_{CT}=0,34$ $p=0,001$), dentro dos grupos ($F_{SC}=0,31$; $p<0,05$) e entre as populações ($F_{ST}=0,54$; $p<0,05$). Foi observado um agrupamento das populações africanas e um isolamento da população japonesa.

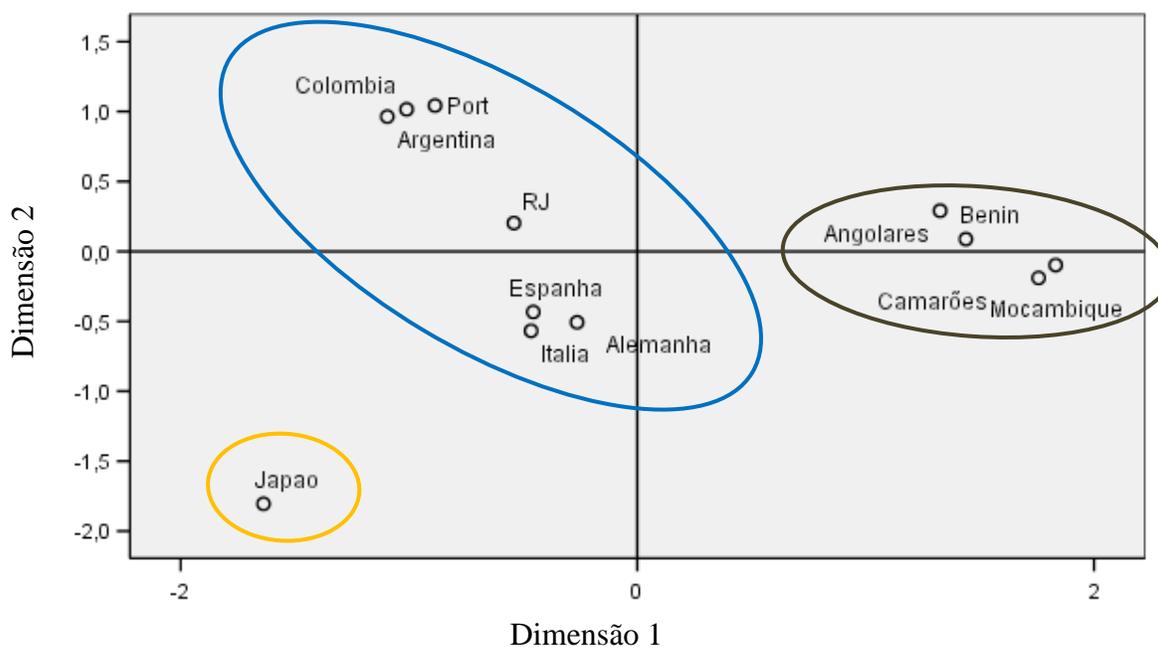
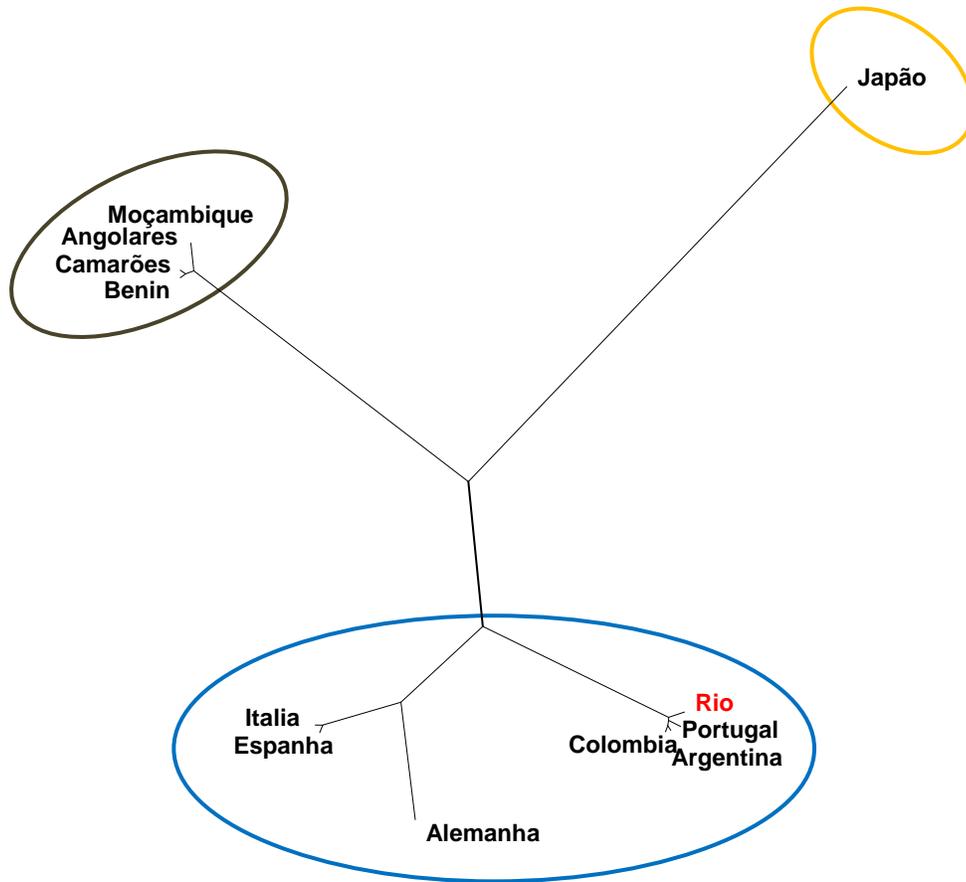


Figura 4.11: Escala multidimensional baseada na distância genética (F_{ST}) entre a população brasileira e as populações de Portugal (Beleza *et al.* 2006); Espanha (Flores *et al.* 2004); Itália (Capelli *et al.* 2007); Alemanha (Kayser *et al.* 2005); Colômbia, Argentina e Japão (Brion *et al.* 2005); Angolares (Trovoada *et al.* 2006); Benin, Camarões e Moçambique (Hünemeier *et al.* 2007).

Através dos dados de distância genética (F_{ST}) baseado no algoritmo UPGMA do programa GDA (Lewis 2001) foi gerada uma árvore do cromossomo Y que representa a relação de proximidade dessas populações, que mostrou um padrão tri-híbrido. Foi observado um agrupamento das populações africanas e um isolamento da população japonesa. A população estudada ficou agrupada juntamente com os outros dois vizinhos da América do Sul, e com Portugal, nossos colonizadores (Figura 4.12).



0.1

Figura 4.12: Árvore da diversidade do cromossomo Y nas populações que contribuíram para a atual estrutura genética encontrada em nossa população. Os círculos indicam um agrupamento das populações estudadas e a população de estudo, o Rio de Janeiro está destacada em vermelho.

4.5) CONTRIBUIÇÃO PARENTAL

4.5.1) No Rio de Janeiro

Pela contagem direta dos haplogrupos e sua distribuição segundo a origem geográfica, os haplogrupos difundidos pela Europa: R1b1, I, E1b1b1, J, R1, F, K, representam juntos uma contribuição européia de 85% na população masculina do Rio de Janeiro. Enquanto que a contribuição de haplogrupos africanos corresponde a 10,5%, e a contribuição de haplogrupos dos nativos ameríndios, os primeiros habitantes desta região, representou a menor contribuição, com apenas 1%. Alguns haplogrupos identificados na nossa população que têm uma distribuição muito ampla e não puderam ser atribuídos a nenhuma população em específico corresponderam a 4% da amostra (Figura 4.13).

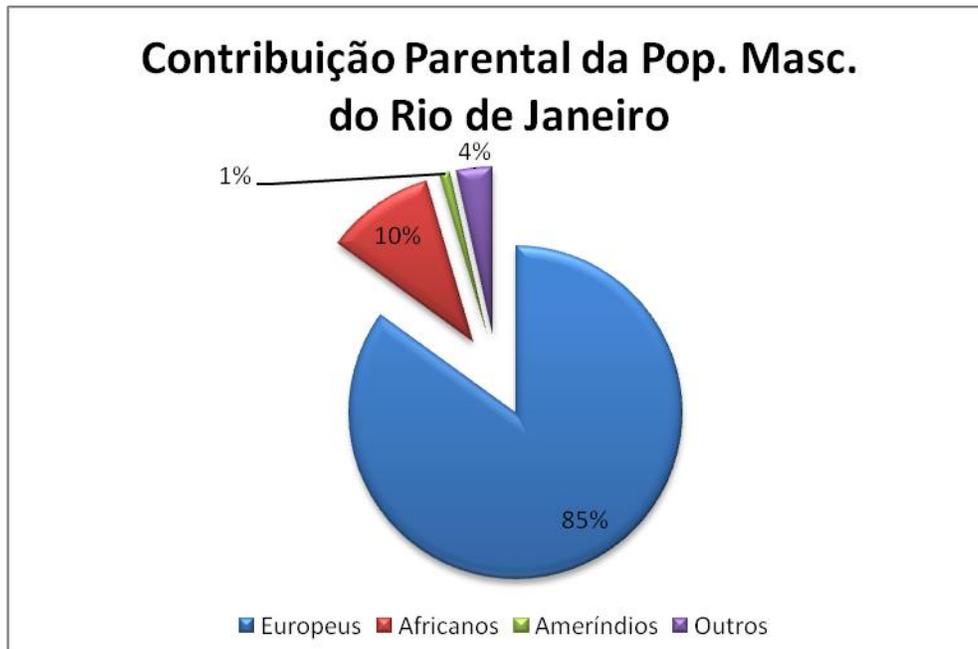


Figura 4.13: Contribuição parental dos haplogrupos do Cromossomo Y na população do Rio de Janeiro.

4.5.2) Na população brasileira

A partir da distribuição dos haplogrupos de acordo com a origem geográfica, foi estimada a contribuição parental da população masculina do Rio de Janeiro, e essa foi comparada com os dados da literatura de outras populações brasileiras. As populações brancas apresentaram uma maior contribuição dos haplogrupos de origem européia, e um cenário diferente foi observado entre as populações negras, onde o componente predominante foi africano (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Comparação da contribuição parental (%) em diversas regiões do país.

Localidade	Contribuição Parental (%)			Referência	
	Europeus	Africanos	Ameríndios		
RJ*	85	10,5	1	Presente Estudo	
RJ**	88,1	8,7	1,58	Silva <i>et al.</i> 2006	
Branca	Porto Alegre	99	<1	0	Guerreiro-Junior <i>et al.</i> 2009
	Norte	98	2	0	Carvalho-Silva <i>et al.</i> 2001
	Nordeste	96	4	0	Carvalho-Silva <i>et al.</i> 2001
	Sudeste	96	4	0	Carvalho-Silva <i>et al.</i> 2001
	Sul	99	0	<1	Carvalho-Silva <i>et al.</i> 2001 e Guerreiro-Junior <i>et al.</i> 2009
	Negra	Porto Alegre	56	38	6
Nordeste		34	64	2	Abe-Sandes <i>et al.</i> 2004
Sudeste		43	56	1	Abe-Sandes <i>et al.</i> 2004 e Guerreiro-Junior <i>et al.</i> 2009
Sul		56	38	6	Hünemeier <i>et al.</i> 2007 e Guerreiro-Junior <i>et al.</i> 2009

* 3,5% origem não determinada.

**1,6% origem não determinada.

4.6) MISTURA ÉTNICA

A mistura étnica da população masculina do Rio de Janeiro foi calculada através do programa ADMIX95 (Chakraborty 1986) usando a frequência do haplogrupo como frequência alélica de cada uma das populações parentais que contribuíram para a sua formação, baseada em dados da literatura. Os valores obtidos refletiram a distribuição dos haplogrupos observados anteriormente, com uma contribuição similar de haplogrupos de origem europeia, africana e ameríndia, que neste caso é representada pela população indígena Gavião, localizada em Rondônia e norte de Mato Grosso (Tarazona-Santos *et al.* 2001).

Com o objetivo de avaliar se há ou não diferença entre a contribuição de cada uma das três regiões africanas que importaram mão de obra escrava para o Brasil durante meados do século XVI, três países africanos: Benin (Hünemeier *et al.* 2007), Congo (Cruciani *et al.* 2002) e Moçambique (Brion *et al.* 2005), cada um representante respectivamente das seguintes regiões africanas: oeste, centro-oeste e sudeste, tiveram as frequências de seus haplogrupos testadas para o cálculo de mistura (Figura 4.14). Foi observado um padrão constante na contribuição de ameríndios e de portugueses e uma contribuição crescente do oeste para o leste da África.

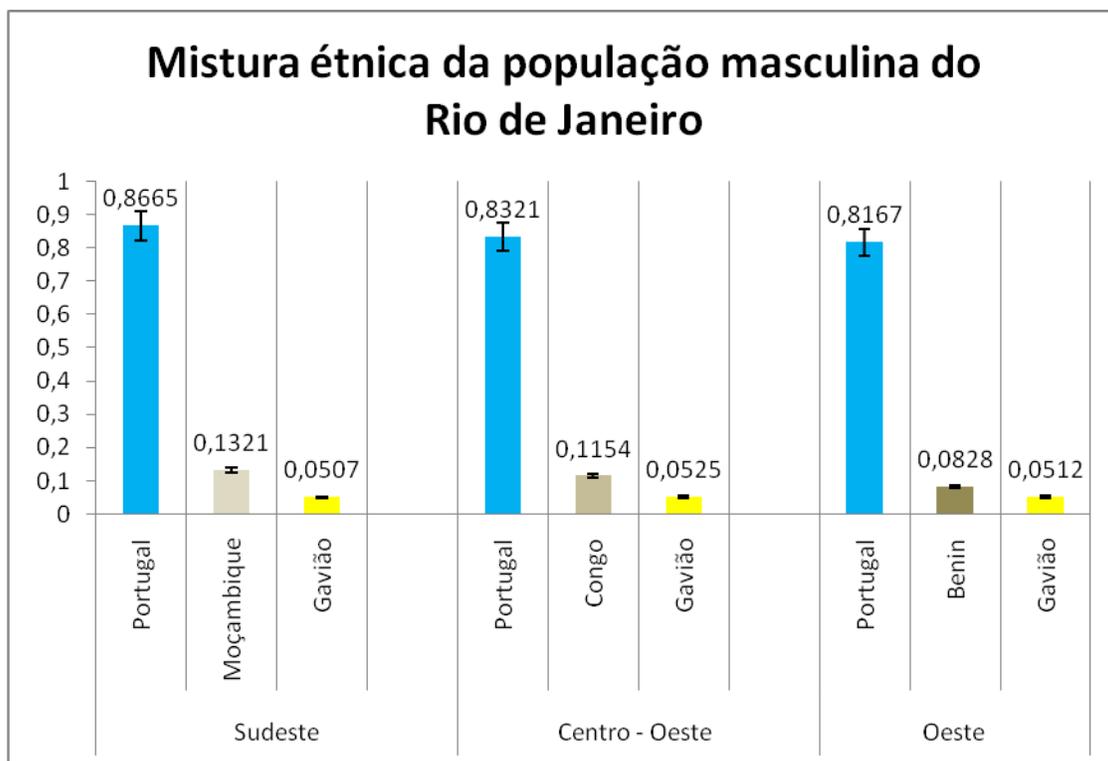


Figura 4.14: Frequência das populações parentais que contribuíram para o perfil tri-híbrido da população masculina do Rio de Janeiro, onde alternou-se entre três países africanos, cada um de uma região da África.

Posteriormente com o objetivo de avaliar se há ou não diferença significativa entre as populações europeias que mais contribuíram para o atual perfil encontrado na população masculina do Rio de Janeiro, analisou-se a frequência parental de três populações europeias: Espanha (Flores *et al.* 2004), Itália (Capelli *et al.* 2007) e Portugal (Beleza *et al.* 2006) (Figura 4.15). Foi observado o mesmo padrão de distribuição de haplogrupos, a maioria de europeus, sendo observado uma similaridade na contribuição de cada um desses países, com uma menor contribuição dos espanhóis, uma contribuição pequena e constante dos haplogrupos ameríndios, novamente representados pela população indígena de Gavião (Tarazona-Santos *et al.* 2001), e uma contribuição ao redor de 10% dos haplogrupos de Moçambique (Brión *et al.* 2005), dos haplogrupos que juntos contribuíram para o perfil tri-híbrido da nossa população.

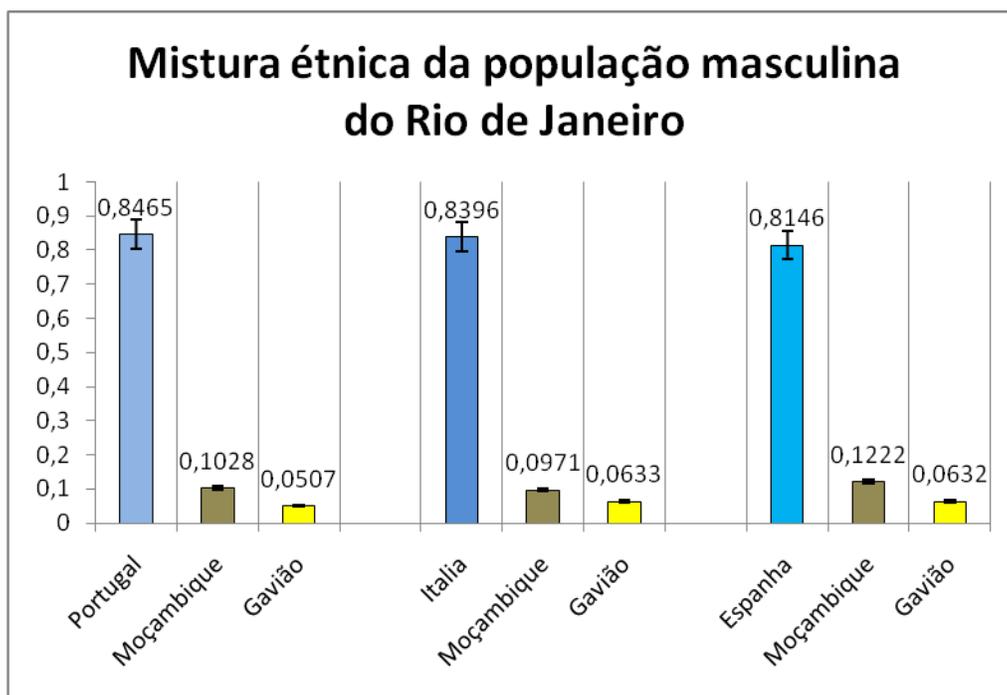


Figura 4.15: Frequência das populações parentais que contribuíram para o perfil tri-híbrido da população masculina do Rio de Janeiro, foram alternados os países europeus que mais teriam migrados para o Brasil.

5. DISCUSSÃO

A técnica adotada neste estudo possui a grande vantagem do *multiplex*, ou seja, permite a genotipagem de diversos SNPs em uma mesma reação, reduzindo assim o tempo e o consumo de material. Atualmente existem técnicas, como *microarray*, onde já foi descrita a genotipagem de 124 SNPs (Krjutškov *et al.* 2009), porém essa técnica é mais indicada para estudos forenses de identificação humana, estudos de indivíduos e não de populações. Através do *multiplex* desenvolvido, foi estabelecido um padrão de análise que pode ser facilmente reproduzido e utilizado em outras amostras populacionais, economizando tempo e gastos com a padronização.

Para estudos genéticos de ancestralidade, e estudos associativos de doenças, entre outros, a classificação realizada pelo IBGE, baseada no questionário de Censo Demográfico, que utiliza o critério de auto-declaração de cor de pele, é superficial e subjetiva, não sendo compatível com a real ancestralidade do indivíduo, como mostraram Parra e col. (2003) e Pimenta e col. (2006). Sabe-se que essa, assim como outras características físicas externas como formato da face, do nariz e textura do cabelo são traços literalmente superficiais, que espelham simplesmente adaptações ao clima e outras variáveis ambientais de diferentes partes da Terra, por isso a importância da utilização de marcadores moleculares adequados para estimar corretamente a ancestralidade do indivíduo e relacioná-los a esses estudos.

Polimorfismos genéticos clássicos tais como, tipos sanguíneos, hemoglobinas, proteínas séricas, isoenzimas entre outros, já foram investigados em populações nativas americanas (Santos 2006), entre eles um estudo realizado na população do Rio de Janeiro, utilizando marcadores clássicos como o sistema ABO e Rh que mostraram uma mistura alélica de 40% de origem européia, 52% africana e 8% ameríndia (Lopez-Camelo *et al.* 1996), dados muito diferentes dos observados em nosso estudo utilizando SNP do cromossomo Y. No entanto, marcadores clássicos, por não serem população-específico, não permitem traçar com segurança a origem e as rotas migratórias dos ancestrais. Para estudos de rotas migratórias os marcadores que não sofrem recombinação, como é o caso do cromossomo Y, são os mais indicados.

O cromossomo Y possui duas características que fazem dele uma ótima ferramenta para trabalhos de miscigenação sexo-específica, a primeira delas é que os marcadores do cromossomo Y mostram um alto nível de estruturação entre populações humanas (YCC 2002), sendo assim relativamente fácil associar o cromossomo Y à correta população ancestral e assim estimar a sua

contribuição. Além disso, diversos tipos de marcadores genéticos, que envolvem diferentes taxas de mutação já foram descritos para este cromossomo (Santos e Tyler-Smith 1996; De Knijff 2000; YCC 2002), permitindo assim estudos de fenômenos evolucionários que ocorreram ao longo do tempo.

Além disso, a comparação entre os polimorfismos do Y, do DNAm e dos autossomos, mostram que o Y apresenta a melhor diferenciação genética pela distância geográfica, uma observação que pode ser explicada pela estimativa de que a taxa de migração das mulheres é maior do que a dos homens – resultado de patrilocalidade, onde as mulheres tem a tendência de se mudar para o local onde moram os maridos depois que se casam e não o contrário (Seielstad *et al.* 1998). A diferenciação geográfica dos haplogrupos do cromossomo Y sugere que este cromossomo pode ser um marcador útil como preditor da população de origem (Jobling 2001).

A análise dos SNPs na população masculina do Rio de Janeiro mostrou que os haplogrupos de origem africana encontrados foram menos frequentes do que os europeus, o que é perfeitamente consistente com informações históricas da formação da nossa população, principalmente se considerarmos o período, meados do século XIX, onde ocorreu uma vasta imigração europeia do sexo masculino. Esses resultados corroboram os encontrados por outros autores, tanto na população do Rio de Janeiro (Silva *et al.* 2006), quanto em outras regiões do Brasil (Carvalho-Silva *et al.* 2001). A frequência do haplogrupo de origem ameríndia foi virtualmente ausente, o que também é corroborado por estudos prévios na população urbana masculina (Carvalho-Silva *et al.* 2001; Silva *et al.* 2006; Carvalho-Silva *et al.* 2006), porém estudos utilizando especificamente populações indígenas brasileiras (Vallinoto *et al.* 1999), mostraram que este haplogrupo possui frequências muito maiores, podendo chegar a 78%, dependendo da população indígena estudada. A alta frequência desta mutação também foi encontrada em outras tribos na Argentina, Chile, Colômbia e América do Norte, com exceção do Canadá (Underhill *et al.* 1996; Bianchi *et al.* 1997; Rodriguez-Delfin *et al.* 1997; Scozzari *et al.* 1997), o que mostra a importância do estudo deste haplogrupo em populações das Américas.

O haplogrupo europeu mais representativo foi o R1b1, com 51% e esse também foi o mais frequente na população portuguesa, com uma contribuição superior a 50% (Gonçalves *et al.* 2005; Beleza *et al.* 2006), e o mais frequente também entre a população branca de Porto Alegre (Guerreiro-Junior *et al.* 2009). A alta frequência deste haplogrupo é típica da população do oeste europeu (Rosser *et al.* 2000), o que explica a alta frequência encontrada em nossa população masculina. Muitos outros haplogrupos representados em populações do oeste europeu também foram encontrados em nossa amostra, entre eles: E1b1b1, I, J e K.

O haplogrupo I também é característico em diversas populações do oeste Europeu, atingindo frequências superiores a 5% em populações portuguesas, a mesma frequência observada em nossa população.

A significativa frequência do haplogrupo E1b1b1 (8%) observada em nossa amostra populacional pode ser explicada, pois apesar da origem deste haplogrupo ser o norte da África, onde ele tem uma predominância em mais de 50% dos homens (Cruciani *et al.* 2004), ele também é encontrado em toda a região do Mediterrâneo, com uma frequência ao redor de 30% e é o segundo haplogrupo mais comum em judeus, tanto Sefaraditas quanto Asquenazitas. É frequente no sul de Portugal (25%), diminuindo em direção ao norte (12%) (Beleza *et al.* 2006) e na Espanha possui uma frequência de 12% (Flores *et al.* 2004) parecendo assim ser uma relíquia da ocupação moura na Península Ibérica. Em estudos prévios no Brasil, este haplogrupo já foi encontrado em 14% dos homens brancos (Pena *et al.* 2000), por isso provavelmente a maioria destes cromossomos Y encontrados em nossa população masculina não vieram diretamente do Norte da África, mas sim através de Portugal e de outros países do mediterrâneo.

Mais de 10% dos cromossomos Y portugueses podem ser classificados dentro do haplogrupo J e em nossa população sua frequência foi de 7%. A frequência deste haplogrupo em portugueses é significativamente maior do que a encontrada em espanhóis ou em outras populações do oeste europeu (Rosser *et al.* 2000), com exceção da Itália (Semino *et al.* 2004). A linhagem do haplogrupo J ocorre em ambos judeus e não judeus do Oriente Médio (Semino *et al.* 2004) e em frequências notáveis entre os Árabes de Omã (Luis *et al.* 2004). Este haplogrupo é altamente frequente em sírios e turcos variando em torno dos 40% (Al-Zahery *et al.* 2003; Di Giacomo *et al.* 2004). A alta frequência encontrada na Turquia, em judeus e não judeus identificaram o Oriente Médio e leste do Mediterrâneo (Hammer *et al.* 2000) como área foco para a dispersão ocidental deste haplogrupo. Entretanto estudos prévios (Rosser *et al.* 2000; Al-Zahery *et al.* 2003; Di Giacomo *et al.* 2004) mostraram que este haplogrupo não deixou uma assinatura forte em pessoas do norte dos Balcãs e Europa Central. Em vez disso, dados de frequência dentro da Península Ibérica e Itália são a alternativa mais provável de rotas da dispersão ocidental deste haplogrupo, possivelmente marinha. Então, apesar da migração de cerca de 110 mil sírios e turcos para o Brasil durante o final do século XIX, a provável explicação da presença do haplogrupo J em nossa população é através de migrantes europeus provavelmente pelos portugueses e italianos.

O haplogrupo E1b1a comum no leste da África Subsaariana e virtualmente ausente em populações portuguesas, teve uma frequência significativa de 6% em nossa população. Este haplogrupo tem sido associado com a dispersão Bantu (Underhill *et al.* 2001) e chega a atingir uma frequência de 80% no Senegal (Semino *et al.* 2002), >70% na Guiné e 16% em Cabo Verde (Gonzálves *et al.* 2003), ou seja, provavelmente a entrada deste haplogrupo em nossa população masculina deu-se por escravos vindos dessas regiões.

A estrutura genética da população masculina do Rio de Janeiro foi comparada com outras populações brasileiras e observou-se um agrupamento desta com a população branca de Porto Alegre, provavelmente pela alta frequência dos haplogrupos de origem européia, o R1b1, por exemplo, presente nestas duas populações, enquanto que na população negra de Porto Alegre a frequência deste haplogrupo foi baixa (~13%). A possível explicação para o agrupamento da população de estudo com a população negra de Porto Alegre é o baixo número de indivíduos negros analisados, uma vez que em outro estudo com a mesma população, porém com um número maior de indivíduos esta mesma população ficou em outro grupo, juntamente com a população negra do Rio de Janeiro.

A ausência de diferença significativa observada entre os grupos e a presença de diferença dentro de cada população indica uma homogeneidade na contribuição dos haplogrupos das populações parentais na população brasileira de uma maneira geral, com uma alta diversidade de haplogrupos dentro do Brasil.

Ao compararmos duas populações do Rio de Janeiro, a primeira com indivíduos que foram separados de acordo com a cor da pele (Hünemeier *et al.* 2007) e outra sem qualquer discriminação por cor (presente estudo), foi observada, na primeira população, uma frequência um pouco maior dos haplogrupos de origem africana quando comparada com os de origem européia, e o oposto ocorreu na população onde os indivíduos não foram separados por cor da pele. Os casamentos assimétricos ocorridos no passado mostram que a maioria dos cromossomos Y da população brasileira tem origem européia, o que é compatível com os nossos resultados, porém apesar dos haplogrupos de origem africana observada por Hünemeier e col. (2007) serem maiores do que a de haplogrupos europeus, os autores alegam que a quantidade destes é notável. E estudos realizados com a população negra de São Paulo (Gonçalves *et al.* 2008), revelaram resultados similares ao realizado com os indivíduos negros da cidade do Rio de Janeiro, sendo 48% dos cromossomos de origem da África Subsaariana.

Os resultados encontrados, em relação à ausência de diferença significativa entre os cromossomos Y da população do Rio de Janeiro com os cromossomos Y da população de Portugal, são

corroborados por outros estudos realizados em nossa população (Marrero *et al.* 2005; Silva *et al.* 2006; Carvalho-Silva *et al.* 2006), e suportam observações históricas prévias sobre a vinda de europeus homens para o Brasil durante o processo de mistura resultando na formação atual da nossa população. E como era de se esperar também não foi observada diferença significativa entre a população portuguesa e a população brasileira, o que nos indica uma forte semelhança entre essas duas populações. Porém estudo utilizando marcadores de evolução rápida, como os STRs, revelou uma diversidade haplotípica maior dentro da população brasileira do que em Portugal, explicada pela entrada de cromossomos Y europeus de diversas origens (Carvalho-Silva *et al.* 2006), o que corrobora os dados sobre ausência de diferença significativa entre a população brasileira com as populações italiana e espanhola.

Além dos portugueses, outras ondas migratórias se seguiram, principalmente italianos, espanhóis e alemães, durante os séculos XIX e XX, e essas migrações tiveram uma maior participação de homens, originando os casamentos assimétricos observados em nossa população. Padrões similares de fluxo gênico sexualmente tendencioso foram descritos em outros países das Américas, como na Argentina (Martinez *et al.* 2004), Chile (Rocco *et al.* 2002), Colômbia (Bedoya *et al.* 2006) e Costa Rica (Carvajal-Carmona *et al.* 2003). Talvez isto revele uma característica geral da colonização Ibérica das Américas, o que explica o agrupamento observado dessas populações.

Diversos estudos já foram realizados em nossa população e dependendo do marcador utilizado resultados diferentes e algumas vezes complementares são encontrados. Resultados baseados no DNA mt da população do Rio Grande do Sul revelaram uma contribuição de 48% de europeu, 16% de africano e 36% de ameríndios (Marrero *et al.* 2005). Enquanto que Y-STR revelaram uma contribuição de 92% de europeus, 5 % de africanos e 3% de ameríndios (Leite *et al.* 2008). Já os cromossomos autossomos revelaram uma contribuição de 82% de europeus, 11% de africanos e 7% de ameríndios (Callegari-Jacques *et al.* 2003).

Martins (2007) estudou a população de Pernambuco, utilizando como marcadores STR do cromossomo Y e observou uma contribuição de 83% desses marcadores de origem européia, 15% africana e somente 2% de nativos ameríndios.

Tanto os resultados encontrados em nosso trabalho, quanto outros encontrados na população brasileira, utilizando marcadores uniparentais, revelaram uma forte tendência ao casamento direcionado entre homens europeus, com mulheres indígenas e africanas, o que corrobora perfeitamente os dados históricos conhecidos desde a colonização do Brasil em 1500. Esses estudos também revelam que o

genoma da maioria dos brasileiros é um mosaico, possuindo mtDNA e NRY de diferentes origens filogeográficas.

Para a formação do Novo Mundo, houve a contribuição de diferentes regiões da África. Estudos utilizando o DNAmT em populações da América do Sul mostraram que a maioria dos escravos teriam vindo do centro-oeste da África e uma menor parcela teria vindo do oeste. Enquanto que, na América Central, essa contribuição é quase igual, sendo um pouco maior a contribuição de escravos vindo do oeste da África. Já na América do Norte a grande maioria (72%) teria vindo do oeste da África (Salas *et al.* 2004), ou seja, a contribuição de escravos vindo do oeste aumenta conforme vamos para o Norte da América. E ainda, segundo Salas e col. (2004) estima-se que, especificamente, nos Estados Unidos, a população afro-americana tenha uma contribuição da linhagem do DNAmT originárias do oeste da África de mais de 55%, e um pouco menos de 41% originária do centro-oeste e sudeste da África. Os escravos eram trazidos em sua maioria de Serra Leoa, Nigéria e República da África Central (Parra *et al.* 2001).

Dados da população brasileira, mais especificamente de afro-descendentes da cidade de São Paulo, mostraram que 45% da ancestralidade vêm do centro-oeste da África, 43% do Oeste e 12% do Sudeste (Gonçalves *et al.* 2008) dados diferentes dos encontrados para a população afro-descendente de Porto Alegre e do Rio de Janeiro, no qual a maioria dos haplogrupos do DNAmT são de ancestralidade do centro-oeste e sudeste da África e uma minoria (31%) com ancestralidade vinda do oeste da África (Hünemeier *et al.* 2007). Nossos dados populacionais de mistura étnica, utilizando um marcador de linhagem patrilínea, apesar de não serem diretamente indivíduos afro-descendentes, corroboram os resultados observados por Hünemeier e col. (2007), uma vez que também foi observado um padrão de ancestralidade crescente do oeste para o leste da África. Dados históricos confirmam que a maior fonte de migrantes africanos chegaram ao Brasil são originários do centro-oeste da África.

Esses dados de mistura étnica mostram que a utilização de medicamentos específicos para indivíduos de uma determinada cor de pele, como os que são vendidos nos EUA, devem ser cuidadosamente utilizados em nossa população, uma vez que os resultados descritos anteriormente mostram uma grande diferença entre a origem da ancestralidade genética entre esses indivíduos. E vale ressaltar que a correlação entre cor e ancestralidade genômica é imperfeita, ou seja, individualmente não há como se afirmar a ancestralidade de um indivíduo de acordo com a cor da pele, e uma vez que a atuação dessas drogas se baseia em um determinado perfil farmacogenético, não há como saber se um indivíduo possui as características necessárias a não ser que se façam os testes genômicos apropriados.

O cromossomo Y, além da importância já discutida para estudos evolutivos, também possui uma grande importância para estudos relacionados à doenças, como o câncer de próstata e do testículo por exemplo. Esses estudos relacionam a incidência dessas doenças a grupos étnicos específicos. Por exemplo, a incidência de câncer de próstata em afro-americanos homens (142 por 100.000) é dez vezes maior do que a encontrada em japoneses (14 por 100.000), essas diferenças podem ser explicadas pela dieta ou pela influência do ambiente nessas populações, ou por fatores genéticos. A alta especificidade geográfica dos haplotipos do cromossomo Y significa que esses diferentes grupos étnicos certamente possuem uma linhagem do cromossomo Y predominantemente diferente (Jobling e Tyler-Smith 2000).

6. CONCLUSÃO

Através da comparação de dados da literatura nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o *pool* gênico da população masculina do Rio de Janeiro com a portuguesa, e o haplogrupo R1b1 foi o mais frequente em ambas as populações, e em populações do oeste da Europa.

Corroborando os dados encontrados por Carvalho-Silva e col. (2001) em outras regiões do Brasil, a frequência do R1b1, juntamente com a representação relativamente mais baixa de outros haplogrupos mais frequentes fora região Ibérica mostraram a introdução de cromossomos Y de outras regiões que não só a portuguesa.

Os resultados aqui encontrados corroboram os dados históricos da formação da população do Rio de Janeiro durante o século XVI, período onde foi observada uma significativa redução de população ameríndios, com importante contribuição demográfica vinda da região Subsaariana da África e Europa, principalmente de portugueses.

Nosso estudo sugere que para alcançarmos futuras informações filogeográficas é ideal que usemos a combinação de marcadores de evolução lenta e rápida, como os STRs, uma vez que a estrutura da população genética é caracterizada por um mosaico de mutações que ocorrem ao longo do tempo, em diferentes momentos. Então para investigar populações mais recentes é necessário informações detalhadas que podem ser melhor obtidas com a combinação de marcadores de evolução lenta, os SNPs, com os STRs.

Os resultados deste estudo contribuem para um melhor entendimento dos processos colonizatórios que originaram a nossa população. Tendo em vista o alto grau de miscigenação da nossa população e os avanços na medicina personalizada, faz-se necessário uma melhor caracterização do grau de mistura observado na nossa população, uma vez que para esta abordagem, a coloração da pele é um preditor não confiável de ancestralidade étnica do indivíduo.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abe-Sandes K, Silva JrW, Zago MA. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. *Hum Biol.* 2004; 76: 77-86.
- Agúndez, JA, Golka K, Martínez C, Selinsky S, Blaszkewicz M, García-Martín E. Unravelling ambiguous NAT2 genotyping data. *Clin. Chem.* 2008; 54: 1390-1394.
- Alencar F, Ramalho LC, Ribeiro MVT. História da sociedade brasileira. Rio de Janeiro: Ao livro técnico, 1996.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67(2): 444-461.
- Al-Zahery N, Semino O, Benuzzi G, Magri C, Passarino G, Torroni A, et al. Y-chromosome and mtDNA polymorphisms in Iraq, a crossroad of the early human dispersal and of post-Neolithic migrations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2003 Set;28(3):458-472.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann. Hum. Genet.* 2006; 70(Pt 5): 658-665.
- Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, et al. Admixture dynamics in Hispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006 Maio 9;103(19):7234-7239.
- Beleza S, Gusmão L, Lopes A, Alves C, Gomes I, Giouzeli M, et al. Micro-phylogeographic and demographic history of Portuguese male lineages. *Ann. Hum. Genet.* 2006; 70(Pt 2): 181-194.
- Bianchi NO, Bailliet G, Bravi CM, Carnese RF, Rothhammer F, Martínez-Marignac VL, et al. Origin of Amerindian Y-chromosomes as inferred by the analysis of six polymorphic markers. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1997 Jan;102(1):79-89.
- Blanco-Verea A, Brión M, Sanchez-Diz P, Jaime JC, Lareu MV, Carracedo A. Analysis of Y chromosome lineages in native South American population. *Int Congress Series.* 2006 Apr; 1288: 222-224.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980 Maio;32(3):314-331.
- Brion M, Sobrino B, Blanco-Verea A, Lareu MV, Carracedo A. Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. *Int. J. Legal Med.* 2004 Apr;119(1):10-15.
- Brión M, Sanchez JJ, Balogh K, Thacker C, Blanco-Verea A, Børsting C, et al. Introduction of a single nucleotide polymorphism-based "Major Y-chromosome haplogroup typing kit" suitable for predicting the geographical origin of male lineages. *Electrophoresis.* 2005 Dez;26(23):4411-4420.
- Brión M, Sanchez JJ, Balogh K, Thacker C, Blanco-Verea A, Børsting C, Stradmann-Bellinghausen B, Bogus M, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N. Analysis of 29 Y-chromosome SNPs in a single multiplex useful to predict the geographic origin of male lineages. *Intern. Congress. Series.* 2006; 1288: 13-15.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):177-186.

- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am. J. Hum. Biol.* 2003 Dez;15(6):824-834.
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987; 325:31-36.
- Capelli C, Brisighelli F, Scarnicci F, Arredi B, Caglia' A, Vetrugno G, et al. Y chromosome genetic variation in the Italian peninsula is clinal and supports an admixture model for the Mesolithic-Neolithic encounter. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007;44(1): 228-239.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Hutz MH, Salzano FM, Pena SD. Divergent human Y-chromosome microsatellite evolution rates. *J. Mol. Evol.* 1999 Ago;49(2):204-214.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;68(1): 281-286.
- Carvalho-Silva DR, Tarazona-Santos E, Rocha J, Pena SDJ, Santos FR. Y chromosome diversity in Brazilians: switching perspectives from slow to fast evolving markers. *Genetica.* 2006 Jan;126(1-2):251-260.
- Carvajal-Carmona LG, Ophoff R, Service S, Hartiala J, Molina J, Leon P, et al. Genetic demography of Antioquia (Colombia) and the Central Valley of Costa Rica. *Hum. Genet.* 2003 Maio;112(5-6):534-541.
- Cavaco I, Reis R, Gil JP, Ribeiro V. *CYP3A4*1B* and *NAT2*14* alleles in a native African population. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 41: 606-609.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. *The History and Geography of Human Genes.* Princeton, New Jersey: Princeton University Press, Princeton, 1994.
- Cavalli-Sforza LL. Human Evolution and its relevance for genetics epidemiology. *Annu Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007; 8: 1-15.
- Chakraborty R. Gene admixture in human populations: Models and predictions. *Yearbook Phys. Anthropol.* 1986; 29:1-43.
- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature.* 2003;422(6934): 835-847.
- Cruciani F, Santolamazza P, Shen P, Macaulay V, Moral P, Olckers A, Modiano D, Holmes S, Destro-Bisol G, Coia V, Wallace D C, Oefner PJ, Torroni A, Cavalli-Sforza L, Scozzari R, Underhill PA. A Back Migration from Asia to Sub-Saharan Africa Is Supported by High-Resolution Analysis of Human Y-Chromosome Haplotypes. *Am J Hum Genet.* 2002; 70:1197-1214.
- Cruciani F, Fratta RL, Santolamazza P, Sellitto D, Pascone R, Moral P, Watson E, Guida V, Colomb EB, Zaharova B, Lavinha J, Vona G, Aman R, Caly F, Akar N, Richard M, Torroni A, Novelletto A, Scozzari R. Phylogeography analysis of haplogroup E3b (E-215) Y chromosome reveals multiple migratory events within and out of Africa. *Am J. Hum. Genet.* 2004; 74: 1014-1022.
- Dallas JF. Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1988; 85: 6831-6835.
- de Knijff P. Messages through Bottlenecks: On the Combined Use of Slow and Fast Evolving Polymorphic Markers on the Human Y Chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 2000;67(5): 1055-1061.

- Di Giacomo F, Luca F, Popa LO, Akar N, Anagnou N, Banyko J, et al. Y chromosomal haplogroup J as a signature of the post-neolithic colonization of Europe. *Hum. Genet.* 2004 Oct;115(5):357-371.
- Einarson TR. Drug-related hospital admissions. *Ann Pharmacother.* 1993;27(7-8): 832-840.
- Estivill X, Cheung J, Pujana M A, Nakabayashi K, Scherer SW, Tsui L C. Chromosomal regions containing high-density and ambiguously mapped putative single nucleotide polymorphisms (SNPs) correlate with segmental duplications in the human genome. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 1987-1995.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolut Bioinform Online.* 2005; 1:47-50.
- Fagan BM. *The Great Journey: The Peopling of Ancient in America.* London: Thames & Hudson, 1987.
- Ferreira LB. *Diversidade do DNA mitocondrial em populações brasileiras ameríndias e afrodescendentes.* São Paulo, 2006. Doutorado em Genética Bioquímica - Universidade de São Paulo.
- Flores C, Maca-Meyer N, Gonzáles A M, Oefner P, Shen P, Pérez J A, Rojas A, Larruga J M, Underhill P A. Reduce genetic structure of the Iberian peninsula revealed by Y-chromosome analysis: implications for population demography. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 855-863.
- Fornarino S, Pala M, Battaglia V, Maranata R, Achilli A, Modiano G, Torroni A, Semino O, Santachiara-Benerecetti SA. Mitochondrial and Y-chromosome diversity of the Tharus (Nepal): a reservoir of genetic variation. *BMC Evol Biol* 2009; 9: 154
- Gonçalves R, Freitas A, Branco M, Rosa A, Fernandes AT, Zhivotovsky LA, et al. Y-chromosome lineages from Portugal, Madeira and Açores record elements of Sephardim and Berber ancestry. *Ann. Hum. Genet.* 2005 Jul;69(Pt 4):443-454.
- Gonçalves VF, Carvalho CMB, Bortolini MC, Bydlowski SP, Pena SDJ. The phylogeography of African Brazilians. *Hum Hered* 2008; 65(1):23-32.
- González AM, Brehm A, Pérez JA, Maca-Meyer N, Flores C, Cabrera VM. Mitochondrial DNA affinities at the Atlantic fringe of Europe. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2003 Abr;120(4):391-404.
- Guerreiro – Junior V, Bisso-Machado R, Marrero A, Hünemeier T, Salzano FM, Bortolini MC. Genetic signature of parental contribution in black and white populations in Brazil. *Gen Mol Biol* 2009; 31(1): 1-11.
- Guidon N. *Cliff Notes.* Nat Hist. 1987; 8: 6-12
- Hammer MF, Karafet T, Rasanayagam A, Wood ET, Altheide TK, Jenkins T, et al. Out of Africa and back again: nested cladistic analysis of human Y chromosome variation. *Mol. Biol. Evol.* 1998;15(4): 427-441.
- Hammer MF, Redd AJ, Wood ET, Bonner MR, Jarjanazi H, Karafet T, et al. Jewish and Middle Eastern non-Jewish populations share a common pool of Y-chromosome biallelic haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97(12): 6769-6774.
- Hammer MF, Zegura SL. The human Y haplogroup tree: nomenclature and phylogeny of its major divisions. *Annu Rev Anthropol* 2002; 31: 303-321.

- Hammer MF, Zegura SL. The role of the Y chromosome in human evolutionary studies. *Evol. Anthropol.* 1996; 5: 116-134.
- Hartl DL e Clark AG. *Principles of population genetics*. 4ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.
- Hünemeier T, Carvalho C, Marrero AR, Salzano FM, Junho Pena SD, Bortolini MC. Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2007;133(2): 854-867.
- Hurles ME, Veitia R, Arroyo E, Armenteros M, Bertranpetit J, Pérez-Lezaun A, et al. Recent male-mediated gene flow over a linguistic barrier in Iberia, suggested by analysis of a Y-chromosomal DNA polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;65(5): 1437-1448.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.
- ISA - Instituto Sócio Ambiental. Povos indígenas no Brasil. São Paulo: Editora do Instituto Sócio Ambiental, 2000.
- Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.* 1997; 110(3): 118-124.
- Jobling MA, Tyler-Smith C. New uses for new haplotypes the human Y chromosome, disease and selection. *Trends Genet.* 2000;16(8): 356-362.
- Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 2003;4(8): 598-612.
- Jobling MA. Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 2001; 118(2-3): 158-162.
- Jorge-Nebert L F, Eichelbaum M, Griese E U, Inaba T, Arias T D. Analysis of six SNPs of NAT2 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and determination of the Embera acetylation phenotype using caffeine. *Pharmacogenetics* 2002; 12:39-48.
- Karafet T M, Zegura S L, Vutura-Brady J, Posuki O, Osipova L, Weibe V, Romero F, Long J C, Harihara S, Jin F, Dashnyan B, Gerelsaikhan T, Omoto K, Hammer M. Y chromosome markers and trans-Beringia Strait dispersals. *Am J Phys Anthropol.* 1997; 102: 301-314.
- Karafet TM, Lansing JS, Redd AJ, Reznikova S, Watkins JC, Surata SP, Arthawiguna W A, Mayer L, Bamshad M, Jorde LB et al. Balinese Y-chromosome perspective on the peopling of Indonesia: Genetic contributions from pre-Neolithic hunter-gatherers, Austronesian farmers, and Indian traders. *Hum. Biol.* 2005; 77: 93–114.
- Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL e Hammer MF. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* 2008; 18(2): 830-838.
- Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edlmann J, et al. Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum. Genet.* 2005;117(5): 428-443.
- Klein HS. As origens africanas dos escravos brasileiros. 2002. In: Pena SDJ, editor: *Homo brasilis. Aspectos genéticos linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro*, Ribeirão Preto: FUNPEC Editora 93-112pp.

- Krjutskov K, Viltrop T, Palta P, Metspalu E, Tamm E, Suvi S, et al. Evaluation of the 124-plex SNP typing microarray for forensic testing. *Forensic Sci Int Genet.* 2009 Dez;4(1):43-48.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822): 860-921.
- Leite FPN, Callegari-Jacques SM, Carvalho BA, Kommers T, Matte CHF, Raimann PE, et al. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. *Am. J. Hum. Biol.* 2008 Jun;20(3):359-363.
- Lell JT, Brown MD, Schurr TG, Sukernik KI, Stariskovskaya VB, Torroni A, Moore LG, Troup GM, Wallace DC. Y chromosome polymorphism in Native American and Siberian populations: identification of chromosome haplotypes. *Hum. Genet.* 1997; 100: 536-543.
- Lewis PD, Zaykin D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 [d16c]. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. 2001.
- Levy, MSF. O papel da migração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). *Rev. Saúde Pública.* 1974; 8: 49-90.
- Lopez – Camelo JS, Cabello PH, Dutra MG. A simple model for the estimation of congenital malformation frequency in racially mixed populations. *Braz J Genetics* 1996; 19(4): 659-663.
- Luis JR, Rowold DJ, Rugeiro M, Caeiro B, Cinnioğlu C, Roseman C, et al. The Levant versus the Horn of Africa: evidence for bidirectional corridors of human migrations. *Am. J. Hum. Genet.* 2004 Mar;74(3):532-544.
- Maestri-Filho M. O escravo gaúcho: persistência e trabalho. Porto Alegre: Editora UFRGS. 1993.
- Marrero AR, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz IM, et al. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am. J. Hum. Biol.* 2005 Ago;17(4):496-506.
- Martínez Marignac VL, Bertoni B, Parra EJ, Bianchi NO. Characterization of admixture in an urban sample from Buenos Aires, Argentina, using uniparentally and biparentally inherited genetic markers. *Hum. Biol.* 2004 Ago;76(4):543-557.
- Martins AM. Análise genético –histórica de haplótipos do cromossomo Y humano no nordeste brasileiro. Pernambuco, 2007. Mestrado em Genética. Universidade Federal de Pernambuco.
- Mathias N, Bayés M, Tyler-Smith C. Highly informative compound haplotypes for the human chromosome. *Hum Mol Genet.* 1994; 3: 115-123.
- Mattoso K de Q. Ser Escravo no Brasil. São Paulo: Brasiliense, 1982.
- Meltezer DJ. Monte Verde and the Pleistocene peopling of the Americas. *Science.* 1997; 276: 754-755.
- Onofri V, Alessandrini F, Turchi C, Pesaresi M, Buscemi L, Tagliabracci A. Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. *Forensic Sci. Int.* 2006;157(1): 23-35.
- Parra EJ, Kittles RA, Argyropoulos G, Pfaff CL, Hiester K, Bonilla C, Sylvester N, Parrish-Gause D, Garvey WT, Jin L, McKeigue PM, Kamboh MI, Ferrel RE, Pollitzer WS, Shriver MD. Ancestral proportions and admixture dynamics in geographical defined African American living in South Carolina. *Am J Phys Anthropol.* 2001; 114: 18-29.

- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Jan 7;100(1):177-182.
- Pena SD, Santos FR, Bianchi NO, Bravi CM, Carnese FR, Rothhammer F, et al. A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. *Nat. Genet.* 1995;11(1): 15-16.
- Pena SDJ, Carvalho-Silva DR, Alves -Silva J, Prado VF. Retrato Molecular do Brasil. *Ciência Hoje*; 2000; 27: 16-25.
- Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum. Hered.* 2006;62(4):190-195.
- Reis JJ. Presença negra: conflitos e encontros; In: IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística Brasil: 500 Anos de Povoamento. Rio de Janeiro: IBGE; 2000, p. 80–99.
- Ribeiro D. O povo brasileiro - A formação e o sentido do Brasil. São Paulo: Ed. Companhia das Letras, 1995.
- Rodriguez-Delfin L, Santos SE, Zago MA. Diversity of the human Y chromosome of South American Amerindians: a comparison with blacks, whites, and Japanese from Brazil. *Ann. Hum. Genet.* 1997 Set;61(Pt 5):439-448.
- Rocco PP, Morales CG, Moraga MV, Miquel JFP, et al. Composición genética de la población chilena: distribución de polimorfismos de DNA mitocondrial en grupos originarios y en la población mixta de Santiago. *Rev. Med. Chile* 2002; 130: 125-131.
- Rootsi S, Magri C, Kivisild T, Benuzzi G, Help H, Bermisheva M, et al. Phylogeography of Y-Chromosome Haplogroup I Reveals Distinct Domains of Prehistoric Gene Flow in Europe. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1): 128-137.
- Rosser ZH, Zerjal T, Hurles ME, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, et al. Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 Dez;67(6):1526-1543.
- Salas A, Lareu RM, Scozzari R, Coppa A, Torroni A, Macaulay V, Carracedo A. The African diaspora mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 454-465.
- Salzano FM e Callegari-Jacques SM. South American Indians. A case study in Evolution. Oxford: Claredon Press.1988.
- Salzano FM e Freire-Maia N. Populações brasileiras, aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. São Paulo: Companhia Editora Nacional,1967.
- Sanchez JJ, Børsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs--a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci. Int.* 2003;137(1): 74-84.
- Sanchez JJ, Brión M, Parson W, Blanco-Verea AJ, Børsting C, Lareu M, Niederstätter, Oberacher H, Morling N, Carracedo A. Duplications of the Y-chromosome specific loci P25 and 92R7 and forensic implications. *Forensic Sci. Int.* 2004; 140: 241-250.
- Santos FR e Tyler-Smith C. Reading the human Y chromosome: the emerging DNA markers and human genetic history. *Braz J Genet* 1996; 19: 665-670.

- Santos FR. O Povoamento das Américas através de estudos de ancestralidade paterna. In: II Simpósio Internacional "Povoamento das Américas", Piauí, 2006.
- Scozzari R, Cruciani F, Santolamazza P, Sellitto D, Cole DE, Rubin LA, et al. mtDNA and Y chromosome-specific polymorphisms in modern Ojibwa: implications about the origin of their gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 1997 Jan;60(1):241-244.
- Seielstad MT, Minch E, Cavalli-Sforza LL. Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nat. Genet.* 1998 Nov;20(3):278-280.
- Sekine A, Saito S, Iida A, Mitsunobu Y, Higuchi S, Harigae S, Nakamura Y. Identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of human N-acetyltransferase genes *NAT1*, *NAT2*, *AANAT*, *ARD1* and *LICAN* in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 314-19.
- Semino O, Magri C, Benuzzi G, Lin AA, Al-Zahery N, Battaglia V, et al. Origin, Diffusion, and Differentiation of Y-Chromosome Haplogroups E and J: Inferences on the Neolithization of Europe and Later Migratory Events in the Mediterranean Area. *Am J Hum Genet.* 2004;74(5): 1023-1034.
- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE, et al. The genetic legacy of Paleolithic *Homo sapiens sapiens* in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science.* 2000, 290: 1155-1159.
- Semino O, Santachiara-Benerecetti AS, Falaschi F, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA. Ethiopians and Khoisan share the deepest clades of the human Y-chromosome phylogeny. *Am. J. Hum. Genet.* 2002 Jan;70(1):265-268.
- Silva DA, Carvalho E, Costa G, Tavares L, Amorim A, Gusmão L. Y-chromosome genetic variation in Rio de Janeiro population. *Am. J. Hum. Biol.* 2006;18(6): 829-837. (a)
- Silva WA, Bortolini MC, Schneider MPC, Marrero A, Elion J, Krishnamoorthy R, et al. MtDNA haplogroup analysis of black Brazilian and sub-Saharan populations: implications for the Atlantic slave trade. *Hum. Biol.* 2006;78(1): 29-41. (b)
- Spuhler JN. Genetic distances, trees and maps of North American Indians. In: Laughlin WS, Harper AB. *The First Americans: Origins, Affinities and Adaptations.* New York: G. Fischer; 1979. p. 135-183.
- Takane Y, Young FW, de Leeuw J. Nonmetric individual differences multidimensional scaling: An alternating least squares method with optimal scaling features. *Psychometrik.* 1977; 42: 7-67.
- Tarazona-Santos E, Carvalho-Silva DR, Pettener D, Luiselli D, De Stefano GF, Labarga CM, et al. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 2001 Jun;68(6):1485-1496.
- Teixeira RLF, Miranda AB, Pacheco AGF, Lopes MQP, Fonseca-Costa J, Rabahi M, Melo HM, Kritski AL, Mello FCQ, Suffys PN, Santos AR. Genetic profile of the arylamine N-Acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brasil. *Mutat. Res.* 2007; 624: 31-40.
- Thomson R, Pritchard JK, Shen P, Oefner PJ, Feldman MW. Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Jun 20;97(13):7360-7365.

- Underhill PA, Jin L, Zemans R, Oefner PJ, Cavalli-Sforza LL. A pre-Colombian Y chromosome-specific transition and implication for human evolutionary history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1996; 196-200.
- Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Shen P, Mirazón Lahr M, Foley RA, et al. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann. Hum. Genet.* 2001;65(Pt 1): 43-62.
- Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, et al. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat. Genet.* 2000;26(3): 358-361.
- Vallinoto AC, Cayres-Vallinoto IM, Ribeiro Dos Santos ÂK ÂK, Zago MA, Santos SE, Guerreiro JF. Heterogeneity of Y chromosome markers among Brazilian Amerindians. *Am. J. Hum. Biol.* 1999;11(4):481-487.
- Vianna D S. Heurística híbrida para o problema da filogenia. Pontifícia Universidade Católica / RJ. Tese de doutorado. 2004.
- Vogel F e Motulsky AG. Human genetics, problems and approaches. 3ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997.
- Wainscoat JS, Hill AV, Boyce AL, Flint J, Hernandez M, Thein SL. Evolutionary relationship of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. *Nature* 1986; 319: 491-493.
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene.* 5^aEd.. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., 2006. 830pp.
- Weir BS. *Genetic Data Analysis II.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts.1996.
- Xei HG, Xu ZH, Ou-Yang DS, Shu Y, Yang DL, Wang JS, Yan XD, Huang SL, Wang W, Zhou HH. Meta-analysis of phenotype and genotype of *NAT2* deficiency in Chinese populations. *Pharmacogenetics.* 1997; 7: 503-514.
- YCC. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 2002; 12(2): 339-348.
- Zembruski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann. Hum. Genet.* 2006 Nov;70(Pt 6):822-828.

ANEXO I

Indivíduo	Haplogrupo	Origem	Frequência
G5	B C D	Europa, África e Ásia	0,02
G26	B C D	Europa, África e Ásia	
G45	B C D	Europa, África e Ásia	
G94	B C D	Europa, África e Ásia	
G3	E	África Sub-saariana	0,025
G12	E	África Sub-saariana	
G34	E	África Sub-saariana	
D6	E	África Sub-saariana	
C3	E	África Sub-saariana	
G2	E1b1a	África Sub-saariana	0,06
G20	E1b1a	África Sub-saariana	
G29	E1b1a	África Sub-saariana	
G54	E1b1a	África Sub-saariana	
G55	E1b1a	África Sub-saariana	
G100	E1b1a	África Sub-saariana	
C11	E1b1a	África Sub-saariana	
C23	E1b1a	África Sub-saariana	
C34	E1b1a	África Sub-saariana	
C41	E1b1a	África Sub-saariana	
C56	E1b1a	África Sub-saariana	
G15	E1b1b1	Europa	0,08
G36	E1b1b1	Europa	
G46	E1b1b1	Europa	
G65	E1b1b1	Europa	
G68	E1b1b1	Europa	
G75	E1b1b1	Europa	
G90	E1b1b1	Europa	
G98	E1b1b1	Europa	
G108	E1b1b1	Europa	
D3	E1b1b1	Europa	
D14	E1b1b1	Europa	
C6	E1b1b1	Europa	
C14	E1b1b1	Europa	

C20	E1b1b1	Europa	
C26	E1b1b1	Europa	
C32	E1b1b1	Europa	
G9	I	Europa	
G17	I	Europa	
G21	I	Europa	
G24	I	Europa	
G31	I	Europa	
G39	I	Europa	
G42	I	Europa	
G48	I	Europa	
G50	I	Europa	
G60	I	Europa	0,095
G77	I	Europa	
G96	I	Europa	
G97	I	Europa	
D16	I	Europa	
C4	I	Europa	
C28	I	Europa	
C46	I	Europa	
C60	I	Europa	
C71	I	Europa	
G80	R1	Europa	
G103	R1	Europa	
D4	R1	Europa	
D18	R1	Europa	0,04
C15	R1	Europa	
C17	R1	Europa	
C18	R1	Europa	
C38	R1	Europa	
G6	R1b1	Europa	
G10	R1b1	Europa	
G11	R1b1	Europa	
G14	R1b1	Europa	
G16	R1b1	Europa	0,505
G18	R1b1	Europa	
G25	R1b1	Europa	
G27	R1b1	Europa	
G28	R1b1	Europa	
G30	R1b1	Europa	

G32	R1b1	Europa
G33	R1b1	Europa
G35	R1b1	Europa
G37	R1b1	Europa
G38	R1b1	Europa
G40	R1b1	Europa
G41	R1b1	Europa
G43	R1b1	Europa
G49	R1b1	Europa
G52	R1b1	Europa
G56	R1b1	Europa
G59	R1b1	Europa
G61	R1b1	Europa
G66	R1b1	Europa
G67	R1b1	Europa
G69	R1b1	Europa
G72	R1b1	Europa
G74	R1b1	Europa
G76	R1b1	Europa
G78	R1b1	Europa
G81	R1b1	Europa
G82	R1b1	Europa
G84	R1b1	Europa
G85	R1b1	Europa
G86	R1b1	Europa
G88	R1b1	Europa
G91	R1b1	Europa
G93	R1b1	Europa
G95	R1b1	Europa
G99	R1b1	Europa
G101	R1b1	Europa
G105	R1b1	Europa
G107	R1b1	Europa
G109	R1b1	Europa
D2	R1b1	Europa
D8	R1b1	Europa
D10	R1b1	Europa
D11	R1b1	Europa
D13	R1b1	Europa
D15	R1b1	Europa

D17	R1b1	Europa
D19	R1b1	Europa
D20	R1b1	Europa
C1	R1b1	Europa
C2	R1b1	Europa
C5	R1b1	Europa
C7	R1b1	Europa
C9	R1b1	Europa
C10	R1b1	Europa
C12	R1b1	Europa
C13	R1b1	Europa
C16	R1b1	Europa
C19	R1b1	Europa
C21	R1b1	Europa
C22	R1b1	Europa
C24	R1b1	Europa
C25	R1b1	Europa
C27	R1b1	Europa
C29	R1b1	Europa
C30	R1b1	Europa
C31	R1b1	Europa
C33	R1b1	Europa
C36	R1b1	Europa
C37	R1b1	Europa
C39	R1b1	Europa
C40	R1b1	Europa
C42	R1b1	Europa
C43	R1b1	Europa
C44	R1b1	Europa
C45	R1b1	Europa
C47	R1b1	Europa
C48	R1b1	Europa
C49	R1b1	Europa
C50	R1b1	Europa
C51	R1b1	Europa
C52	R1b1	Europa
C53	R1b1	Europa
C54	R1b1	Europa
C55	R1b1	Europa
C57	R1b1	Europa

C58	R1b1	Europa	
C59	R1b1	Europa	
C61	R1b1	Europa	
C62	R1b1	Europa	
C63	R1b1	Europa	
C65	R1b1	Europa	
C66	R1b1	Europa	
C67	R1b1	Europa	
C68	R1b1	Europa	
C69	R1b1	Europa	
C70	R1b1	Europa	
G1	J	Mediterrâneo	
G7	J	Mediterrâneo	
G19	J	Mediterrâneo	
G44	J	Mediterrâneo	
G47	J	Mediterrâneo	
G63	J	Mediterrâneo	
G73	J	Mediterrâneo	
G79	J	Mediterrâneo	0,07
G87	J	Mediterrâneo	
G102	J	Mediterrâneo	
G106	J	Mediterrâneo	
D1	J	Mediterrâneo	
D5	J	Mediterrâneo	
C8	J	Mediterrâneo	
G4	K	Sudoeste da Ásia	
G13	K	Sudoeste da Ásia	
G22	K	Sudoeste da Ásia	0,025
G53	K	Sudoeste da Ásia	
G57	K	Sudoeste da Ásia	
G8	F	Leste da Ásia	
G23	F	Leste da Ásia	
G51	F	Leste da Ásia	
G71	F	Leste da Ásia	0,035
G83	F	Leste da Ásia	
G104	F	Leste da Ásia	
D9	F	Leste da Ásia	
G64	Q1a3a	Ameríndio	
C35	Q1a3a	Ameríndio	0,01

G58	P	Indeterminada	0,035
G62	P	Indeterminada	
G70	P	Indeterminada	
G89	P	Indeterminada	
G92	P	Indeterminada	
D7	P	Indeterminada	
D12	P	Indeterminada	

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)