



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NATHÁLYA CARVALHO FARIAS

**ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE DA POPULAÇÃO DE GANGARRAS DO
BANDEIRA/BREJO DA MADRE DE DEUS – PE**

**CAMPINA GRANDE
2016**

NATHÁLYA CARVALHO FARIAS

**ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE DA POPULAÇÃO DE GANGARRAS DO
BANDEIRA/BREJO DA MADRE DE DEUS – PE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Simone Silva dos Santos Lopes.

**CAMPINA GRANDE
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

F224a Farias, Nathálya Carvalho
Análise de ancestralidade da população de Gangarras do
Bandeira/Brejo da Madre de Deus – PE [manuscrito] / Nathalya
Carvalho Farias. - 2016.
63 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dr^a. Simone Silva dos Santos Lopes,
Departamento de Biologia".

1. Variabilidade genética. 2. Polimorfismos. 3. Grupos
étnicos. I. Título.

21. ed. CDD 576.5

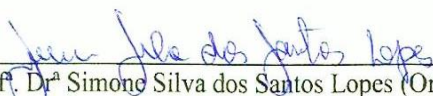
NATHÁLYA CARVALHO FARIAS

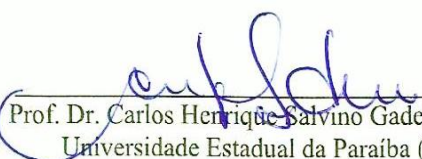
**ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE DA POPULAÇÃO DE GANGARRAS DO
BANDEIRA/BREJO DA MADRE DE DEUS – PE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 22 / Fevereiro / 2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr.^a Simone Silva dos Santos Lopes (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual da Paraíba por contribuir para o estímulo desta pesquisa.

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da UEPB, local o qual foi realizado a maior parte deste presente estudo.

Ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da UFPE, por contribuir na ajuda prática nas etapas deste trabalho.

A Deus, pela paz e luz.

À minha orientadora professora Dr^a Simone Lopes, por me abrir as portas da Genética e da Biologia Molecular e por me acolher em seu laboratório. Sou imensamente grata pela confiança que foi depositada em mim para a realização desta pesquisa. Tenho imenso orgulho em dizer que fui sua orientanda!

Ao professor Dr. Valdir Balbino pela concessão das amostras para o desenvolvimento deste estudo.

Ao professor Dr. Carlos Henrique pelas dicas, conselhos e esclarecimentos de dúvidas.

As técnicas de laboratório Patrícia Rocha e Andeilma Fernandes, pela amizade, pela ajuda e por sempre me apoiarem nos momentos em que me faltavam clarezas.

A minha família, em especial aos meus pais, pela paciência, pelo estímulo, e pelos grandiosos ensinamentos que fizeram de mim uma pessoa grata por todas as oportunidades.

Ao meu esposo, Thiago, por me acompanhar muito antes do início da graduação e por sempre me apoiar e me incentivar a se entregar nas escolhas e decisões. Pelo grande companheirismo e imensa compreensão durante o período das minhas pesquisas.

Aos meus colegas de laboratório da UEPB, que contribuíram ao longo de dois anos, com a alegria, festas, conversas e procedimentos laboratoriais. Em especial à Mayla, Eliene, Mayara e Hugo, este, que me deu suporte em todos os momentos necessários dentro e fora do laboratório.

Aos meus colegas de sala os quais conviveram comigo durante quatro anos, especialmente a Sinthia, Mário, Duval e Wellerson pela fiel amizade e por não me deixarem desistir frente aos primeiros obstáculos. Esses anos da minha vida acadêmica foram incríveis com vocês!

A todos, muito obrigada!

“O único homem que está isento de erros é aquele que não arrisca acertar.”

Albert Einstein

RESUMO

A variabilidade étnica presente na população brasileira é o produto de um complexo processo de miscigenação entre indivíduos ameríndios, africanos e europeus que ocorreu durante o período colonial. A distribuição da contribuição genética desses três grupos ao longo do território brasileiro não ocorreu de forma homogênea, ou seja, a proporção de ameríndios, africanos e europeus difere significativamente entre as regiões geográficas. Pequenas populações, tais como os Gangarras do Bandeira, oriundos do Brejo da Madre de Deus, em Pernambuco, vivem isoladas e ausentes de seu verdadeiro passado histórico, estes, por exemplo, acreditando que são descendentes de seus antigos colonizadores, os holandeses. A utilização de estudos com marcadores genéticos surge frente a estas dificuldades trazendo, por meio de análises no DNA, uma resposta para fatos que historicamente não foram esclarecidos. O presente estudo objetivou analisar a composição genética dos indivíduos pertencentes à Comunidade dos Gangarras do Bandeira através de marcadores moleculares de ancestralidade. Foram analisadas 17 amostras de DNA de indivíduos da comunidade. A genotipagem dos indivíduos foi realizada através de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e sequenciamento direto dos marcadores. A análise das sequências foram realizadas utilizando *softwares online*, tais como o MITOMASTER e HaploGrep, que auxiliaram na elucidação da ancestralidade materna, enquanto o *Structure* foi utilizado para a verificação da contribuição étnica em cromossomos autossomos. As observações feitas a partir dos resultados para o cromossomo Y permitiram a constatação da grande contribuição africana paterna, embora as análises feitas através do DNAm e dos AIMs indicarem que a maioria dos indivíduos pertencentes ao Bandeira tem sua origem ameríndia. Desta forma, os resultados analisados descrevem uma população com 37% de contribuições ameríndias, 31,5% africanas e 31,5% europeias para marcadores nos cromossomos autossomos; uma linhagem paterna com frequência de 67% de origem africana, 22% europeia e apenas 11% ameríndia e uma contribuição materna de 67% ameríndia e 33% europeia. Estes resultados diferem dos registros históricos encontrados para esta comunidade, levantando a hipótese de que estes indivíduos sejam descendentes de holandeses. Na amostra analisada não foram observadas a presença de haplogrupos pertencentes ao domínio da Holanda, no entanto, uma amostragem maior será necessária para observar a presença de marcadores específicos para populações europeias e holandesas.

Palavras-chave: Variabilidade genética. Polimorfismos. Grupos étnicos.

ABSTRACT

The present ethnic variability in the Brazilian population is the product of a complex process of miscegenation between Amerindian, African and European individuals that occurred during the colonial period. The distribution of the genetic contribution of these three groups along the Brazilian territory did not occur of homogeneous form, that is, the proportion of Amerindians, Africans and Europeans differs significantly between the geographic regions. Small populations, such as the "Gangarras do Bandeira", deriving of the "Brejo da Madre de Deus", in Pernambuco, live isolated and absent of its true passed historical one, these, for example, believing that they are descending of its old colonizers, the dutches. The use of studies with genetic markers appears front to these difficulties bringing, by means of analyses in the DNA, an answer for facts that were historically not clarified. The present study it objectified to analyze the genetic composition of the pertaining individuals to the "Comunidade dos Gangarras do Bandeira" through molecular markers of ancestry. 17 samples of DNA of individuals of the community were analyzed. The genotyping of the individuals was accomplished through RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and direct sequencing of the markers. The analysis of the sequences was accomplished using online softwares, such as the MITOMASTER and HaploGrep, that had assisted in the briefing of the ancestry materna, while the Structure was used for the verification of the ethnic contribution in autosomal chromosomes. The comments made from the results for chromosome Y had allowed to the observation of the great paternal African contribution, although the analyses made through the mtDNA and of the AIMs to indicate that the majority of the pertaining individuals to the "Bandeira" has its Amerindian origin. Of this form, the results analyzed describe a population with 37% of Amerindian contributions, 31.5% Africans and 31.5% Europeans for markers in the autosomal chromosomes; a paternal ancestry often of 67% of African origin, 22% European and only 11 % Amerindian and a maternal contribution of 67% Amerindian and 33% European. These results differ from the found historical registers for this community, raising the hypothesis of that these individuals are descending of dutches. In the sample analyzed they were not observed the presence of pertaining haplogroups to the domain of Netherlands, however, a larger sample will be necessary to observe the presence of specific markers for European and Dutch populations.

Keywords: Genetic variability. Polymorphisms. Ethnic groups.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Movimentos migratórios de grupos humanos	17
Figura 2 – Mapado litoral Norte dePernambuco em 1640	19
Figura 3 – Indivíduos moradores da Comunidade do Bandeira	20
Figura 4 – Distribuição dos haplogrupos do DNA mitocondrial	23
Figura 5 – Distribuição dos haplogrupos do cromossomo Y	24
Figura 6–Mapa do DNAm t humano	25
Figura 7 – Idiograma do bandeamento do cromossomo Y humano	27
Figura 8 – Árvore filogenética das variações apresentadas pelo cromossomo Y	29
Figura 9 – Mapa do Brasil com destaque para o Estado de Pernambuco e seu município Brejo da Madre de Deus	30
Figura 10 – Gel de poliacrilamida 8% com tipagem da mutação YAP	35
Figura 11 – Gel de poliacrilamida 12% com tipagem da mutação SRY1532	36
Figura 12 – Gel de poliacrilamida 12% com tipagem da mutação DYS199.....	36
Figura 13 – Gel de poliacrilamida 8% com tipagem da mutação 12f2	37
Figura 14 – Proporção de distintas ancestralidades paternas do cromossomo Y	37
Figura 15 – Sequências nucleotídicas após alinhamento com a sequência controle rCRS	38
Figura 16 – Contribuição da ancestralidade materna do DNAm t	39
Figura 17 – Proporção dos haplogrupos mitocondriais	39
Figura 18 – Estimativa da mistura interétnica da população analisada.....	40
Figura 19 – Estimativa da mistura interétnica individual da população analisada.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos marcadores moleculares utilizados	31
Tabela 2 – Enzimas de restrição utilizadas para análise de RFLP dos indivíduos	32
Tabela 3 – Principais polimorfismos que definem os haplogrupos C7, D4h2 e J1c1	38
Tabela 4 – Frequências dos alelos observados para os AIMs estudados	40
Tabela 5 – Variabilidade genética individual das amostras estudadas	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AIMs	<i>Ancestry Informative Markers</i> (Marcadores Informativos de Ancestralidade)
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Citosina
CRS	<i>Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
EXO I	Exonuclease I
G	Guanina
HSV	Região Hipervariável
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>Indel</i>	Inserção/Deleção
kb	Quilobase/Kilobase
LABBE	Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva
LGBM	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
Mb	Megabase
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version</i>
min	Minuto
MSY	<i>Male Specific Region of Y-chromosome</i> (Região específica masculina do cromossomo Y)
NRY	<i>Non-recombining Region of Y-chromosome</i> (Região não recombinante do cromossomo Y)
PAR	Região pseudo-autossômica
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PSAs	<i>Population-specific Alleles</i> (Alelos específicos de populações)
rCRS	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge Revisada)

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)
RNA	Ácido Ribonucléico
rRNA	RNA Ribossômico
s	Segundos
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SINEs	<i>Short Interspersed Elements</i> (Elementos Curtos Intercalados)
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismos de Nucleotídeo Único)
T	Timina
TBE	Tris-Borato-EDTA
U	Unidade
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
V	Volts
v.	Versão
YAP	<i>Y-Chromosome Alu Polymorphic Element</i> (Elemento Alu Polimórfico do cromossomo Y)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μl	Microlitro
μM	Micromol
mM	Milimol
ng	Nanograma
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Δ	Delta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1. Evolução humana	16
3.2. Povoamento da América	16
3.3. A formação da população brasileira	17
3.4. A colonização e a formação do povo pernambucano	18
3.5. Gangarras do Bandeira	19
3.6. Marcadores moleculares	20
3.7. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)	20
3.7.1. Inserção <i>Alu</i> (Sb19.3, APO4, PV92)	21
3.7.2. Inserção/Deleção (<i>Indel</i>) – (AT3-I/D)	22
3.7.3. Deleção (CCR5 Δ 32)	22
3.8. Marcadores de linhagens	23
3.8.1. DNA mitocondrial	24
3.8.2. Cromossomo Y	26
3.8.2.1. YAP	27
3.8.2.2. SRY1532	27
3.8.2.3. DYS199	28
3.8.2.4. 12f2	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Local do estudo e amostragem	30
4.2. Obtenção do material genético	30
4.3. Amplificação	30
4.4. Tipagem por análise de RFLP	32
4.5. Sequenciamento das amostras	32
4.6. Análise dos dados	33
4.7. Aspectos éticos	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Análise dos marcadores de ancestralidade para o cromossomo Y	35
5.2. Análise dos marcadores de ancestralidade para o DNAm	37
5.3. Análise dos marcadores informativos de ancestralidade	39
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE A – Parâmetros de amplificação e concentrações adotadas para as reações de PCR	55
APÊNDICE B – Haplótipos pertencentes aos indivíduos analisados, bem como seus respectivos haplogrupos	57
ANEXO A – Cromatogramas de todos os indivíduos analisados, bem como seus valores de confiança (Phred) respectivos	58

1. INTRODUÇÃO

Desde a propagação da espécie humana, há aproximadamente 150-200 mil anos atrás, diversas mutações ocorreram no DNA e geraram variações no genoma dos indivíduos, as quais podem ser transmitidas. Tanto o cromossomo Y quanto o DNAm_t fornecem informações complementares que podem alcançar dezenas de gerações no passado permitindo resgatar a história de uma população ou de um povo através dos movimentos de homens e mulheres, respectivamente (SANTOS et al., 2006).

A existência de diferentes tipos de polimorfismo de DNA, classificados de acordo com sua natureza molecular e sua localização no genoma, possibilita diversos estudos. Nos últimos anos, várias pesquisas no Brasil utilizam as variações acumuladas no nosso material genético, seja nos cromossomos autossômicos, DNAm_t ou cromossomo Y, para buscar recuperar, a partir de ferramentas genéticas, a história da nossa espécie e da formação do povo brasileiro (BENJEDDOU et al., 2006; PENA et al., 2000; SANTOS et al., 2006).

A formação de populações miscigenadas a partir de populações ancestrais geneticamente diferenciadas é um processo demográfico que pode ser utilizado para modelar muitas questões sobre a evolução humana e se estudar a dinâmica da miscigenação e a biologia de características (LOPES, 2011).

Os estudos genéticos da população brasileira a partir de marcadores de DNA sinalizam as diferenças nas contribuições de ancestralidade europeia, africana e ameríndia em cada região e têm ajudado a resgatar os eventos sócio-históricos e demográficos relacionados ao povoamento e colonização do país (SANTOS et al., 2006).

Estudos filogeográficos revelam que a imensa maioria das patrilinhagens da população do Brasil é de origem europeia (provavelmente mais de 90%), enquanto a maioria das matrinhagens (cerca de 60%) é de origem ameríndia ou africana, muito embora possa haver diferenças significativas entre as várias regiões do país (PENA et al., 2000; SANTOS et al., 2006).

Diversas populações espalhadas pelo Brasil vivem isoladas e ausentes de total infraestrutura básica e assistência governamental. Uma dessas comunidades é a do Bandeira, localizada no Estado de Pernambuco, cujos habitantes se isolam devido ao preconceito racial por apresentarem hábitos e fenótipo diferenciados para a região.

Frente a uma Comunidade com história escassa e incertezas sobre seu passado, este estudo foi desenvolvido para que a ancestralidade desta população seja elucidada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar a ancestralidade de indivíduos da população de Gangarras do Bandeira através de marcadores moleculares (cromossomo Y, DNAMt e AIMS) afim de determinar a constituição genética e processo de formação da população.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a ancestralidade paterna através dos marcadores específicos para o cromossomo Y (YAP, SRY1532, DYS199, 12f2);
- Caracterizar a população de Gangarras do Bandeira quanto aos polimorfismos das regiões HSV-I e HSV-II do DNAMt para verificar a ancestralidade materna da população;
- Determinar as frequências alélicas dos marcadores autossômicos específicos de população (Sb19.3, APO4, PV92, AT3-I/D e CCR5);
- Identificar e estimar a frequência dos haplogrupos pertencentes da população estudada;
- Estimar as proporções das linhagens ancestrais africanas, ameríndias e europeias na formação desta população;
- Comparar os dados obtidos com os de populações ancestrais do Estado de Pernambuco e do Brasil.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Evolução humana

Os estudos relacionados aos processos de evolução humana, migração e relações entre as populações vêm ganhando ampla abordagem no mundo e, com os avanços dos marcadores genéticos moleculares, tornou-se possível inferir eventos demográficos passados através da análise de conjuntos de genes de populações modernas (FLORES et al., 2003).

Segundo Seilstad e colaboradores (1999), diversas teorias são levantadas acerca do surgimento do homem moderno e acredita-se que este teve uma origem única e relativamente recente (cerca de 100-200 mil anos atrás) na África. A partir deste ponto, ele migrou e ocupou progressivamente a Ásia, a Europa, a Oceania, as Américas, e todos os outros lugares distantes e pouco conhecidos da Terra. Essa dispersão foi acompanhada de diversificação morfológica, fruto da adaptação às condições climáticas e ambientais e inovações tecnológicas que possibilitaram, por exemplo, uma maior produção de ferramentas e alimentos (BARROS, 2006; PENA, 2000).

3.2 Povoamento da América

O processo de pré-colonização das Américas vem sendo estudado através de evidências arqueológicas, bem como evidências anatômicas, linguísticas e genéticas (HEY, 2005).

No quadro atual, após a saída da África, acredita-se que grupos humanos dispersaram-se pelo continente asiático e avançaram em direção ao leste ibérico alcançando a região do atual Estreito de Bering (Figura 1) e penetrado na América, até então despovoada. Este fato ocorreu devido à última glaciação há cerca de 20 mil anos atrás quando houve uma grande retenção de água pelas geleiras, baixando o nível global dos oceanos em cerca de 120 metros abaixo do nível atual (REIS, 2008).

Outras rotas, porém pouco discutidas, para o povoamento da América, refletem na chegada destes grupos através de deslocamentos pela costa do Oceano Pacífico (Figura 1) e por meio de migrações provenientes da África via Oceano Atlântico (SENE, 2013). Embora diversas hipóteses e achados arqueológicos procurem esclarecer explicações para tal fato, dúvidas a respeito desta onda migratória ainda permanecem em discussão nos dias atuais (HEY, 2005).

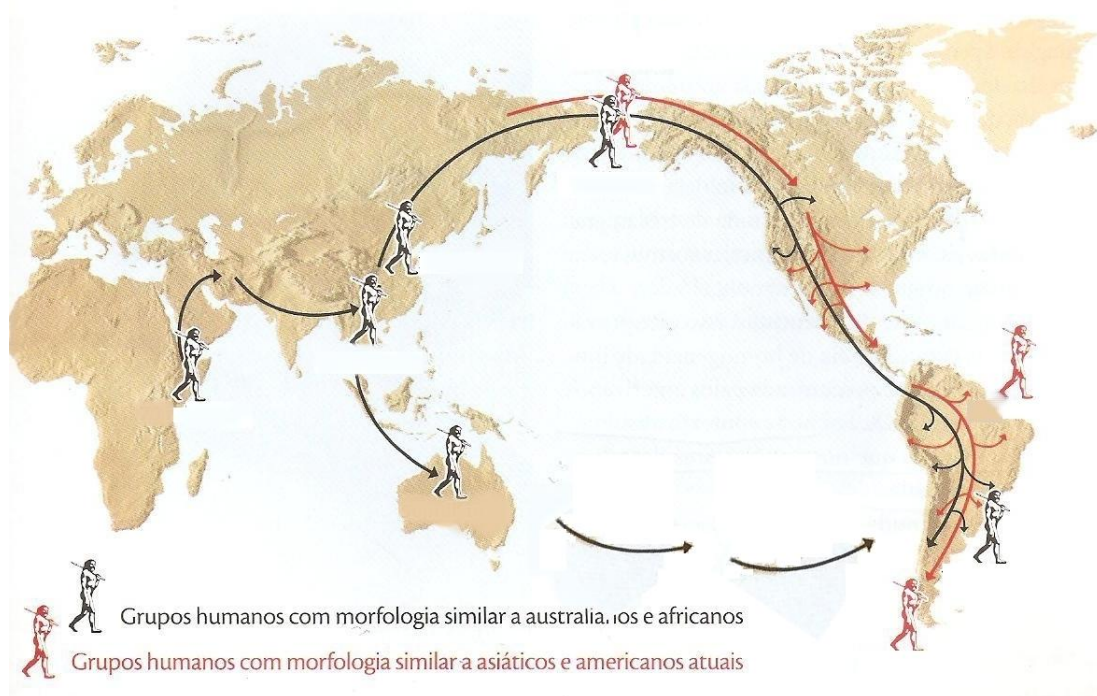


Figura 1– Movimentos migratórios de grupos humanos (Fonte: adaptada de SENE, 2013)

3.3 A formação da população brasileira

Em 1500, ao chegar ao Brasil, Pedro Álvares Cabral encontrou a região habitada por vários povos indígenas. Estima-se que, na época do descobrimento, existiam no Brasil cerca de 2,5 milhões de índios (SALZANO e FREIRE-MAIA, 1970 *apud* ALVES-SILVA et al., 2000) entretanto, a chegada dos portugueses ao território brasileiro não perturbou o equilíbrio da vida tribal nos primeiros anos. Decorridos 34 anos desde a ocupação das terras, povos oriundos da Espanha, França, Holanda e, principalmente Portugal, desembarcaram em terras brasileiras atraídos pelas riquezas e abundância dos recursos naturais (BARROS, 2006).

O encontro destas populações no Brasil, durante o século XVI, iniciou um dos maiores processos de mistura gênica na história da humanidade e a nossa população é o resultado de cruzamentos interétnicos entre os povos de três continentes, tais como nativos americanos, africanos e europeus. Este acentuado nível de miscigenação torna os brasileiros uma das populações mais heterogêneas do mundo (PENA et al., 2000; BARROS, 2006).

Pesquisas recentes buscam reconstruir e compreender, do ponto de vista genético, o processo que gerou o povo brasileiro e qual seria a contribuição real dos três grupos étnicos em sua composição genética (LOPES, 2007). O primeiro trabalho foi desenvolvido por Pena (2000) intitulado “Retrato Molecular do Brasil” o qual analisou homens auto-classificados como brancos em quatro regiões do país. Os resultados obtidos com este estudo

demonstraram que a linhagem paterna destes indivíduos é quase exclusivamente europeia, enquanto a materna está distribuída em africana, ameríndia e europeia.

3.4 A colonização e a formação do povopernambucano

Para facilitar a administração e garantir a defesa do território recém-conquistado, a coroa portuguesa tem por decisão dividir o Brasil em capitanias hereditárias. As terras do atual Estado de Pernambuco foram doadas como capitania pelo rei de Portugal a Duarte Coelho em 1535, onde, nestas terras prosperavam a cana-de-açúcar e o algodão (MELLO, 2009).

Com o grande destaque para as exportações, Pernambuco torna-se a mais promissora das capitanias da Colônia Portuguesa na América. Logo após o domínio da Espanha sob Portugal, a Holanda, em busca de açúcar e atraída pelo grande pólo exportador, resolveu enviar suas expedições para invadirem o Nordeste do Brasil. A ocupação holandesa no Nordeste compreende dois episódios de duração desigual: a conquista de Salvador (1624-1625) e a invasão de Pernambuco (1630-1654). A invasão a Salvador não ocorreu de forma bem sucedida, entretanto, na segunda invasão, os holandeses alcançaram uma colonização e logo garantiram seu espaço em terras nordestinas, sendo representados pelo príncipe Maurício de Nassau que governou o comércio açucareiro local, fazendo-a a capital do Brasil holandês (Figura 2) (MELLO, 2009).

Com o decorrer dos anos, a insatisfação com os altos impostos cobrados pelos holandeses, geraram muitas revoltas e conflitos o que fez com que o príncipe Nassau, deixasse seu cargo e os holandeses fossem expulsos do território brasileiro (GESTEIRA, 2004; MELLO, 2009). Acredita-se que um grupo, com cerca de 20 holandeses, se recusaram a deixar a Província Pernambucana e então teriam fugido e se escondido às margens do Rio Capibaribe, onde permaneceram (DUARTE, 2005).

O tempo de permanência no Brasil consolidou a estrutura genética da população pernambucana, com o cruzamento entre índios nativos, negros africanos e brancos europeus. Dentre os brancos que fixaram sua permanência, os portugueses, franceses e holandeses obtiveram destaque, entretanto, os franceses e holandeses, apesar de tentarem se estabelecer na capitania, deixaram uma restrita contribuição étnica (BARROS, 2006).

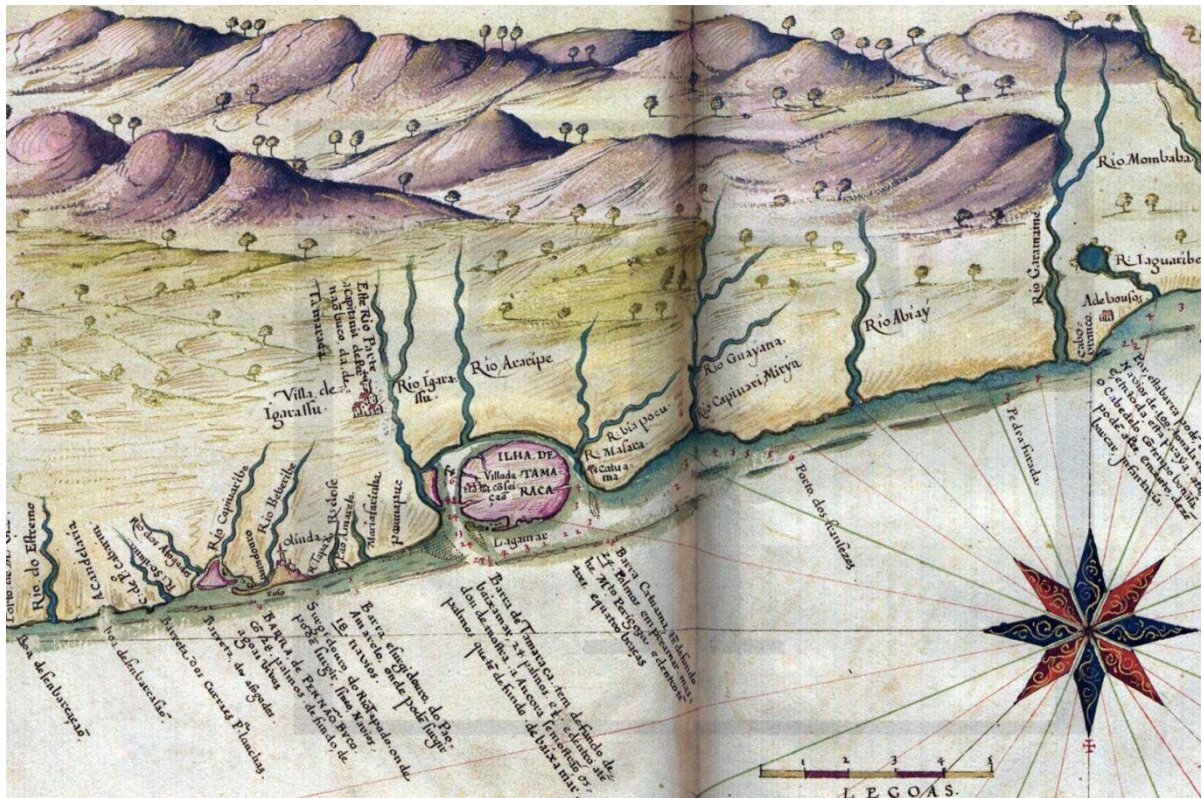


Figura 2 – Mapa do litoral Norte de Pernambuco em 1640. Olinda está representada no lado esquerdo. Nessa época, a Capitania de Pernambuco estava ocupada pelos holandeses (Fonte: Guia Geográfico por João Teixeira. Disponível em: <<http://www.brasil-turismo.com/peernambuco/mapa-historico.htm>>. Acessado em: 10/02/2016).

3.5 Gangarras do Bandeira

Os Gangarras do Bandeira é uma população com aproximadamente 340 habitantes localizada no Agreste Pernambucano a cerca de seis quilômetros do município de Brejo da Madre de Deus (DUARTE, 2005).

Esta população vive numa pequena vila rodeada por casas de taipas, ruas de terra e total ausência de infraestrutura, saneamento básico, escolas, postos de saúde e a energia elétrica fazendo parte do dia-a-dia apenas há alguns anos atrás. A principal forma de subsistência, há séculos, é dada pela agricultura familiar, uma vez que, o desenvolvimento econômico industrial das cidades vizinhas (Santa Cruz do Capibaribe e Toritama) é barrado para esta região (ALVES, 2005).

O termo “Gangarras” surgiu de uma ave de cor amarelada e de canto estridente, e faz referência à cor dos cabelos e ao sotaque dos moradores do Sítio Bandeiras (DUARTE, 2005). O estigma maior desta população é o fato deles apresentarem um fenótipo diferente da maioria dos moradores da região, em geral, eles são loiros, têm olhos e pele clara e uma baixa estatura (Figura 3) (ALVES, 2005).

Pouco se sabe sobre o passado destes indivíduos, entretanto, alguns pesquisadores acreditam que eles apresentem uma descendência europeia visto que, após a invasão e a posterior expulsão, alguns holandeses se esconderam no interior de Pernambuco evitando a sua saída do país durante o período colonial (CAVANI, 2004).



Figura 3 - Indivíduos moradores da Comunidade do Bandeira - PE. Imagens retiradas do documentário "Gangarras do Bandeira" produzido pela Fundação Joaquim Nabuco (Fundaj) em 2004 (Fonte: <<https://www.youtube.com/watch?v=fxKUBLcS8gE>>. Acessado em: 14/01/2016)

3.6 Marcadores moleculares

Marcadores genéticos têm sido elementos fundamentais nos estudos de segregação de caracteres hereditários, na análise do comportamento de genes em populações e na reconstrução da história evolutiva de populações, entre outras aplicações (REGITANO et al., 2009).

Para se estudar questões sobre a origem e evolução do homem moderno, a genética molecular utiliza a variabilidade genômica para compreender sua origem e manutenção, usando-a como ferramenta para inferir em cenários evolutivos passados (LOPES, 2007).

São diversos os marcadores genéticos utilizados para a identificação de polimorfismos, tais como, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), ou polimorfismos de ponto; os polimorfismos de inserções/deleções (*Indel*) e os polimorfismos de elementos de transposição, como por exemplo, inserções *Alu*, estes, atualmente bastante utilizados em estudos evolutivos populacionais (BASTOS-RODRIGUES et al., 2006).

3.7 Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)

Na reconstrução da história evolutiva da espécie, considera-se desde a descrição dos primeiros marcadores genéticos para humanos, que os melhores locais do genoma a serem analisados são aqueles em que podemos diferenciar uma população de outra, seja pela

frequência diferencial ou pela ocorrência de um alelo em uma população e em outra não (GONTIJO, 2008).

Para se avaliar a composição ancestral de uma população são utilizados marcadores genéticos que apresentam grandes diferenciais de frequências alélicas entre populações (LEITE, 2012). Estes marcadores passaram a ser, primeiramente, denominados de PSAs (*Population-specific Alleles*) (SHRIVER et al., 1997), e atualmente são conhecidos por AIMs (*Ancestry Informative Markers*) (BONILLA et al., 2004).

Os AIMs são empregados para se fazer estimativas eficazes de mistura populacional permitindo estimar a contribuição de distintos grupos na formação de uma população, ou seja, inferir na sua ancestralidade. Além disso, são considerados como um grande diferencial de frequência por apresentarem um valor mínimo de 50% entre ao menos duas grandes populações definidas geográfica e/ou etnicamente (MUNIZ, 2008; SHRIVER et al., 1997; PEDROSA, 2006). Estes AIMs podem pertencer a qualquer uma das classes moleculares já citadas anteriormente.

3.7.1 Inserção *Alu* (Sb19.3, APO4, PV92)

Inserções *Alu* são a maior família de repetições intercalantes curtas (*Short Interspersed Elements* – SINEs), sendo exclusivamente encontradas no genoma de primatas possuindo aproximadamente 300pb (TELÓ, 2010).

Estima-se que estas retroelementos *Alu* tenham surgido a 65 milhões de anos atrás originadas através da transcrição reversa de RNA intermediário (7 SL RNA) e que representem cerca de 5% do genoma humano (GONTIJO, 2008; TELÓ, 2010).

Segundo um estudo dirigido por Batzer e colaboradores em 1996b, sequências *Alu* dentro do genoma humano podem ser divididas em grupos de elementos relacionados com base nas mutações de diagnóstico partilhados, ou seja, cada inserção *Alu* surgiu dentro da população humana como um evento único na história evolutiva, fazendo esta repetição idêntica por descendência de um ancestral comum.

A inserção *Alu* Sb19.3 pertence a subfamília Yb8 e está localizada no cromossomo 19p12, como descrito por Arcot e colaboradores em 1998. A presença da inserção caracteriza o alelo *Sb19.3*1*, sendo este, apresentado em elevada frequência em europeus (MACHADO, 2008).

O locus *Alu* APO situa-se no braço longo do cromossomo 11, na região não codificadora próxima ao complexo de genes da apolipoproteína AI-CIII-AIV e apresenta-se bastante frequente em europeus dada a sua inserção alélica (MACHADO, 2008).

O *Alu* PV92 localiza-se no cromossomo 16 (BATZER et al., 1994) e a caracterização do alelo *PV92*1* dá-se pela presença da inserção que gera um fragmento de aproximadamente 400pb, sendo mais prevalente em populações asiáticas (MACHADO, 2008).

3.7.2 Inserção/Deleção (*Indel*) – (*AT3-I/D*)

A antitrombina III (*AT3*) é membro da família dos inibidores da serina protease e sua função biológica é a inativação, irreversivelmente, de várias proteinases de coagulação, tais como os fatores IXa, Xa, XaII e trombina (CASPER et al., 2012; MACHADO, 2008). A deficiência de antitrombina III resulta em numerosas mutações, deleções e inserções e, apesar de sua baixa prevalência, pode ser decorrente de causas hereditárias ou adquiridas (GODOY et al., 1998; LIMA, 2006).

O gene da *AT3* localiza-se no cromossomo 1 (1q25.1), possui 19kb, sete éxons e é caracterizado pela presença ou ausência de uma inserção de 76pb no éxon 1 do gene da antitrombina III (GONTIJO, 2008). A presença desta inserção caracteriza o alelo *AT3-I/D*1*, sendo útil em análises de populações híbridas por apresentar uma frequência da inserção de 0,858 em populações africanas (BONFIM, 2008).

3.7.3 Deleção (*CCR5Δ32*)

O receptor quimiocina 5 (*CCR5*) pertence a uma família de receptores acoplados a proteínas G que cruzam a membrana celular, estando envolvido na quimiotaxia dos leucócitos para as áreas de inflamação. O gene que codifica *CCR5* (*CKR5*) está localizado na região p21.3 do cromossomo 3, formando um aglomerado com outros genes dos receptores de quimiocina (MACÊDO, 2003).

Estudos de genética evolutiva mostraram que a deleção de 32pb neste gene, surgiu no norte da Europa há cerca de 1.200 anos atrás e foi disseminada pelo continente europeu pela população Viking. As altas frequências da deleção $\Delta 32$ que são encontradas nos europeus têm sido atribuídas a uma forte pressão seletiva, possivelmente exercida por patógenos ou por algumas doenças infecciosas tais como a varíola, comum naquela época. Atualmente, estima-se que cerca de 10% dos indivíduos de origem europeia tenham a deleção $\Delta 32$ no gene *CCR5* (GALVANI et al., 2003).

3.8 Marcadores de linhagens

As mutações no DNA que ocorreram após a dispersão protagonizada pela espécie humana há aproximadamente 150-200 mil anos atrás até o presente momento

geraram variações nos haplótipos que podem servir como marcadores de linhagem por serem geográfico-específicas. Os haplótipos são conjuntos de alelos, isto é, sequências variantes em *locus* que são, em geral, transmitidos como uma unidade única devido sua baixa frequência de recombinação. Através da análise dos haplótipos de cada indivíduo é possível a identificação de locais polimórficos estáveis entre as populações, que normalmente são restritos a determinadas áreas geográficas. Um grupo de haplótipos, que compartilham um ancestral em comum, designa um haplogrupo (MORAIS, 2013).

Tanto o cromossomo Y quanto o DNAmf fornecem informações complementares que permitem traçar martilinhagens (Figura 4) e partilinhagens (Figura 5) que podem alcançar dezenas de gerações no passado, podendo assim, reconstruir a história genética e evolutiva de uma população ou de um povo (SANTOS et al., 2006; PENA et al., 2000).

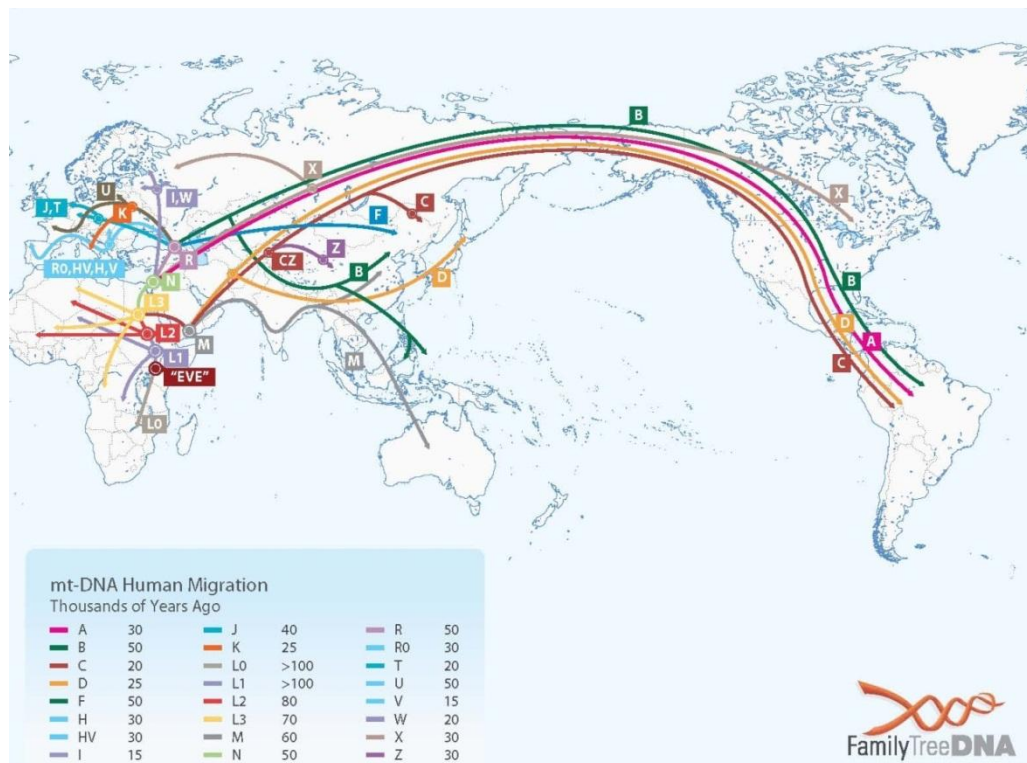


Figura 4 – Distribuição dos haplogrupos do DNA mitocondrial (Fonte: Charles Kerchner's – MtDNA Haplogroup Descriptions & Information Links, 2006 < <http://www.kerchner.com/haplogroups-mtdna.htm> >. Acessado em: 17/01/2016)

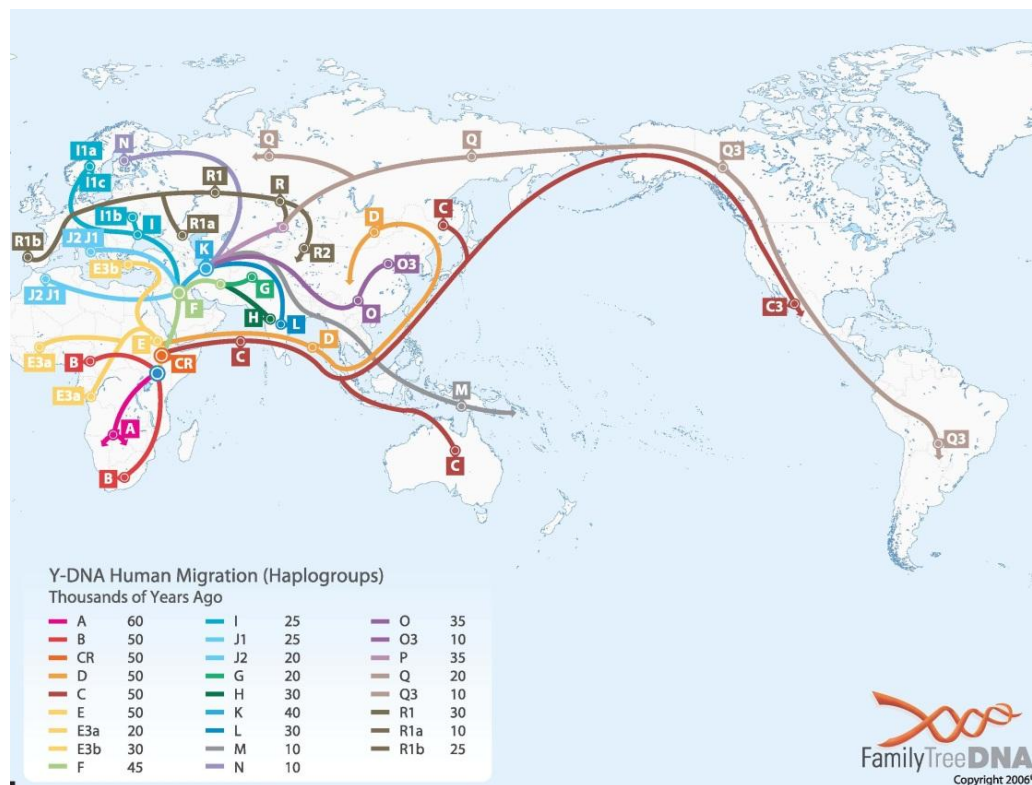


Figura 5 – Distribuição dos haplogrupos do cromossomo Y (Fonte: Charles Kerchner's – YDNA Haplogroup Descriptions & Information Links, 2006<<http://www.kerchner.com/haplogroups-ydna.htm>>. Acessado em: 17/01/2016)

3.8.1 DNA mitocondrial

As mitocôndrias apresentam várias cópias de seu material genético, o DNA mitocondrial (DNAm). Dependendo do tipo celular e função biológica, uma única célula pode conter de centenas a milhares de mitocôndrias. As principais funções dessa organela no nosso organismo são: produção de adenosina trifosfato (ATP), mediação da morte celular programada (apoptose) e produção de calor (FINSTERER, 2004; RINCON, 2009).

Em 1981, Anderson e colaboradores descreveram a primeira sequência do genoma mitocondrial humano, a qual viria a ser a sequência de referência designada por *Cambridge Reference Sequence* (CRS), entretanto, em 1999, Andrews e colaboradores corrigiram 11 nucleotídeos sendo, atualmente, denominada de *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) (MORAIS, 2013).

O genoma mitocondrial (Figura 6) é composto por uma molécula dupla-fita circular, com uma distribuição assimétrica de guaninas e citosinas, apresentando 16.596 pares de bases (pb) e que pode ser dividido em duas regiões principais: a região codificadora, que constitui

cerca de 90% da molécula e que contém 37 genes, entre eles 13 que codificam para polipéptidos envolvidos na fosforilação oxidativa, 2 que codificam para RNA ribossômico e 22 para RNA de transferência; e a região não codificadora, também designada de *D-loop* ou região controle por estar envolvida na replicação e transcrição do genoma mitocondrial. Esta região é construída por regiões hipervariáveis I (HSV-I), II (HSV-II) e III (HSV-III) e está localizada na posição 16024 à 16569 e da posição 1 à 576 (ANDERSON et al., 1981; BUTLER, 2011; LOPES, 2007; SANTOS, 2012a).

Por não possuir íntrons, a molécula de DNAm não sofre recombinação, é haplóide, possui um modo de herança uniparental quase exclusivamente materna e sua taxa de mutação é de aproximadamente 20 vezes mais rápido que o DNA nuclear devido a falta de histonas e um sistema de reparo menos efetivo (ANDERSON et al., 1981; SACCONI et al., 1999; MAGALHÃES, 2006). Todas essas características agrupadas, fazem do DNAm uma fonte rica de informações para os estudos de filogenia molecular o que a torna bastante interessante para a identificação de espécies e a possível reconstrução de linhagens genealógicas, com ênfase em fatores históricos (PENA et al., 2000).

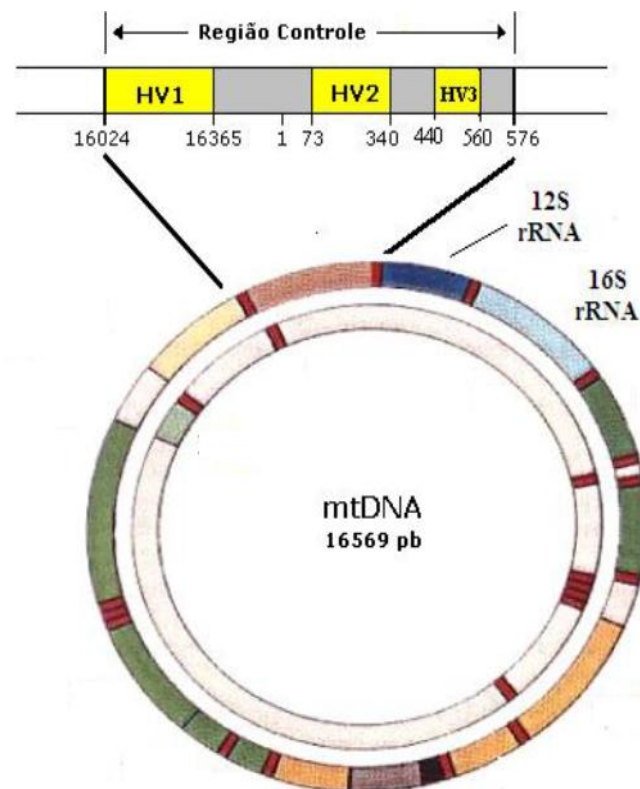


Figura 6 - Mapa do DNAm humano. Em destaque para a região controlenão-codificante. Os genes 12S rRNA e 16S rRNA codificam os RNAs ribossômicos (Fonte: adaptado de RINCON, 2009)

O primeiro estudo aprofundado sobre a variação do DNAm humano, foi realizado por Rebecca Cann, Mark Stoneking e Allan Wilson em 1987. Os dados abordados neste estudo, deixaram fortemente explícito que a África era a fonte de toda a diversidade existente de DNAm humano e que essa diversidade começou a surgir cerca de 150 mil anos atrás, indicando uma origem africana para a Eva mitocondrial (SANTOS et al., 2012b).

Inicialmente este trabalho não teve grandes repercussões no meio científico, no entanto, ainda hoje é utilizado como base para diversos estudos recentes por se mostrar eficiente para inferir a origem geográfica de indivíduos (SANTOS et al., 2012b).

3.8.2 Cromossomo Y

O cromossomo Y, ao contrário de outros cromossomos, não apresenta uma natureza recombinante em parte de sua estrutura e possui aproximadamente 6×10^7 pb (60Mb), representando cerca de 3% do genoma haplóide, sendo o terceiro menor cromossomo humano, apenas ligeiramente maior que os cromossomos 21 (47Mb) e 22 (49Mb) (JOBILING et al., 2003; MARTINS, 2008).

No cromossomo Y são encontrados poucos genes funcionais, os quais desempenham importante função biológica com consequências diretas na determinação do sexo e na fertilidade masculina, estando envolvidos no desenvolvimento e manutenção das células germinativas do homem (QUINTANA-MURCI et al., 2001).

Para manter as diferenças sexuais, os cromossomos X e Y são estrutural e funcionalmente distintos. Entretanto, existem regiões de homologia entre estes cromossomos (BARROS, 2006). Essas regiões são denominadas pseudo-autossômicas (PAR1 = 2,60Mb e PAR2 = 0,32Mb) e estão localizadas nas porções distais dos braços do cromossomo (Figura 7) desempenhando um papel importante durante a meiose masculina, sendo responsáveis pelo pareamento, recombinação e segregação corretas do par de cromossomos sexuais (BARROS, 2006; MARTINS, 2008).

Cerca de 95% da sequência de DNA do cromossomo Y é exclusiva a este cromossomo e, portanto, são encontradas apenas no homem. Por se apresentar em estado haplóide, esta região não sofre recombinação com nenhum outro cromossomo e é denominada de NRY (*Non-recombining Region of Y-chromosome*) ou MSY (*Male Specific Region of Y-chromosome*). A NRY é constituída por aproximadamente 24Mb de eucromatina e 30Mb de heterocromatina inerte (BARROS, 2006).



Figura 7 – Idiograma do bandeamento do cromossomo Y humano (Fonte: adaptado de KIDO et al., 2015).

As informações contidas no cromossomo sexual do genoma humano masculino são transmitidas de pai para filho em uma forma intacta, repassando mutações e, desta forma, oferecendo importantes informações sobre as linhagens patrilineares ao longo da história biológica (Figura 8) (BRAVI, 2001; JOBLING et al., 2003).

Os primeiros estudos sobre o cromossomo Y iniciaram-se com o pesquisador Michel Hammer, o qual, durante vários anos, dedicou sua vida a estudos sobre a análise do DNA para se analisar populações, suas origens e migrações. Em um dos seus principais estudos, Skorecki et al., 1997 se empenharam a desvendar a origem de 188 judeus do sexo masculino. Os resultados que foram apresentados revelaram que estes indivíduos apresentam uma mistura de até oito linhagens, embora as variações africanas apresentadas ao cromossomo Y apresentaram-se baixas.

3.8.2.1 YAP

Assim como alguns AIMs já apresentados neste estudo, o marcador molecular YAP (*Y-Chromosome Alu Polymorphic Element*), trata-se de uma inserção de um retrotransposon que faz parte da família *Alu* e que está presente em alguns indivíduos do sexo masculino, sendo a única localizada no cromossomo Y humano. A referida inserção, provavelmente ocorreu uma vez na evolução, depois da divergência entre a espécie humana e outras espécies de primatas. Este marcador define o haplogrupo DE* que surgiu há cerca de 65.000 mil anos atrás e apresenta uma elevada frequência em populações africanas, baixa em populações europeias e está ausente em populações asiáticas (KARAFET et al., 2008; HAMMER et al., 1996).

3.8.2.2 SRY1532

Consiste numa substituição nucleotídica recorrente A→G, na posição -1532 do gene SRY, no braço curto do cromossomo Y (Yp) (RAMANA et al., 2001). Este polimorfismo classifica indivíduos no haplogrupo R1a e foi descrito pela primeira vez por Whitfield e

colaboradores em 1995, ao qual foi identificado o alelo ancestral a partir de um chimpanzé e outros primatas (KARAFET et al., 2008).

A presença da base nitrogenada G cria um sítio de reconhecimento para a enzima *DraIII* (*Deinococcus radiophilus*), permitindo a determinação dos variantes alélicos, já a presença do alelo A no cromossomo, apresenta um estado ancestral típico em populações europeias (centro da Europa) e asiáticas, estando praticamente ausentes em populações africanas e ameríndias (KARAFET et al., 2001; REBELO, 2003).

3.8.2.3 DYS199

É um marcador polimórfico que determina um polimorfismo de nucleotídeo único resultante de uma substituição C→T na posição -199. Estima-se que esta mutação surgiu há cerca de 30.000 anos atrás e se mantém até o presente definindo o haplogrupo Q3* no cromossomo Y, estando restrita a populações nativas americanas, ou seja, populações ameríndias (CARVALHO-SILVA et al., 1999; LARDONE et al., 2013).

O alelo ancestral T, com 202pb, pode ser encontrado numa frequência de 62% a 100% em seis populações nativas americanas e, apresenta-se ausente em populações africanas, europeias e asiáticas (Lell et al., 1997). A distinção básica entre indivíduos pertencentes a este grupo é realizada através de digestão enzimática, onde a enzima *MfeI* cria um sítio de reconhecimento caracterizando o alelo C moderno (CARVALHO-SILVA et al., 1999).

3.8.2.4 12f2

Este marcador polimórfico caracteriza uma mutação do tipo *Indel* pertencente a indivíduos do haplogrupo J* no cromossomo Y humano. Assim como o YAP é identificado pela presença ou ausência de alguns pares de bases (GIACHINI et al., 2009; PERICIC et al., 2005).

Estudos realizados por Blanco e colaboradores (2000) revelaram que o *amplicon* 12f2 está ausente em indivíduos de origem africana e que tais polimorfismos surgiram a partir de deleções durante a história evolutiva do homem a cerca de 31.700 mil anos atrás (SEMINO et al., 2004). A deleção de 9pb neste fragmento é encontrada com uma alta frequência (acima de 25%) em populações pertencentes ao Oriente Médio, Sul Europeu, Norte Africano e em etíopes (EWIS et al., 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo e amostragem

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – *Campus I*, Campina Grande e no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Foram analisadas 17 amostras de indivíduos oriundos da população Gangarras do Bandeira, Brejo da Madre de Deus – Pernambuco (Figura 9).



Figura 9–Mapa do Brasil com destaque para o Estado de Pernambuco e o município de Brejo da Madre de Deus (Fonte: adaptado de IBGE Mapas, 2016).

4.2 Obtenção do material genético

Todas as amostras utilizadas para este estudo foram cedidas pelo LABBE – UFPE.

4.3 Amplificação

Cada um dos marcadores moleculares utilizados para o cromossomo Y (YAP, SRY1532, DYS199 e 12f2), para as regiões hipervariáveis I (HVS-I) e II (HVS-II) do DNA mitocondrial (L15997/H017 e L16555/H599) e para a detecção de polimorfismos através dos AIMs (Sb19.3, APO4, PV92, AT3-I/D e CCR5) foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Marcadores moleculares utilizados no estudo.

Cromossomo Y		
Marcador	Sequência de primers	Tamanho do fragmento (pb)
YAP ¹	5' CAGGGGAAGATAAAGAAATA 3' 5' ACTGCTAAAAGGGGATGGAT 3'	455pb (YAP+) ou 150pb (YAP-)
SRY1532 ²	5' TCCTTAGCAACCATTAATCTGG 3' 5' AAATAGCAAAAATGACACAAGGC 3'	167pb
DYS199 ³	5' TAATCAGTCTCCTCCCAGCA 3' 5' AGGTACCAGCTCTTCCCAATT 3'	202pb
12F2 ⁴	5' CTGACTGATCAAAATGCTTACAGATC 3' 5' TCTTCTAGAATTTCTTCACAGAATT 3'	427pb
DNAmT		
L15997 ⁵ H017	5' CACCATTAGCACCCAAAGCT 3' 5' CCCGTGAGTGGTTAATAGGGT 3'	588pb
L16555 ⁶ H599	5' CCCACACGTTCCCCTTAAAT 3' 5' TTGAGGAGGTAAGCTACATA 3'	590pb
AIMs		
Sb19.3 ⁷	5' TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG 3' 5' AAGCACAATTGGTTATTTTCTGAC 3'	457pb e/ou 157pb
APO4 ⁸	5' AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG 3' 5' AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA 3'	400pb e/ou 100pb
PV92 ⁹	5' AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT 3' 5' TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG 3'	443pb e/ou 129pb
AT3-I/D ¹⁰	5' CCACAGGTGTAACATTGTGT 3' 5' GAGATAGTGTGATCTGAGGC 3'	572pb e/ou 496pb
CCR5 ¹¹	5' ACCAGATCTCAAAAAGAA 3' 5' CATGATGGTGAAGATAAGCTTCA 3'	225pb ou 193pb

1: Hammer et al., 1995; 2: Adaptado de Whitfield et al., 1995; 3: Adaptado de Santos et al., 1999; 4: Adaptado de Kamp et al., 2000; 5 e 6: Cerezo et al., 2009; 7: Parra et al., 1998; 8: Batzer et al., 1996a; 9: Njoroge et al., 2010; 10: Oliveira, 2014; Reiche et al., 2008.

As reações de amplificação totalizaram um volume de 15µl e foram realizadas no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). Todos os parâmetros utilizados estão descritos no apêndice A.

A análise dos produtos da PCR para o cromossomo Y e análise dos AIMS foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em cuba vertical com tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089M; Ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) por aproximadamente 150 minutos, com voltagem de 120V e 36 miliAmperes. Posteriormente, os géis foram corados com nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Cresteet al., (2001). Os géis de agarose a 1%, contendo alíquotas do DNAm dos indivíduos foram corados com brometo de etídio e visualizados através de transiluminador de luz UV. O tamanho dos fragmentos amplificados obteve sua caracterização utilizando um marcador padrão de peso molecular de 100pb e 1Kb em cada gel, respectivamente, para quantificação e análise da qualidade das amostras amplificadas.

4.4 Tipagem por análise de RFLP

Para a identificação das variações alélicas entre alguns indivíduos, foram utilizadas algumas enzimas de restrições descritas na tabela 2.

Utilizou-se o protocolo previamente padronizado pelo LGBM, o qual 5µl do produto de PCR foram digeridos com uma enzima de restrição específica, totalizando um produto de 10µl a qual, posteriormente, foi incubado em banho-maria a 37°C por aproximadamente 13 horas.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

Tabela 2 – Enzimas de restrição utilizadas para análise de RFLP dos indivíduos.

Marcador	Enzima de restrição	Alelo ancestral	Alelo moderno
SRY1532	<i>DraIII</i> ¹	167pb	112pb + 55pb
DYS199	<i>MfeI</i> ²	202pb	181pb + 21pb

4.5 Sequenciamento das amostras

A região controle do DNAm contém aproximadamente 1.100pb e se subdivide em duas regiões maiores HSV-I e HSV-II. Optou-se iniciar a numeração nucleotídica da

mitocôndria na região controle, de modo que esta compreende as posições finais (16.024 à 16.569) e iniciais (1 à 576).

Após a amplificação das regiões hipervariáveis HSV-I e HSV-II do DNAm, os produtos foram purificados através do método de enzimas hidrolíticas EXO I (*Exonuclease I*) e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). Posteriormente os produtos de PCR foram marcados em uma reação com *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit*, usando 4,75µl de água ultra pura, 1,75µl de tampão de sequenciamento 5X, 0,5µl de *Dye Terminator*, 0,031µl do *primer* (5pMol/µl) e 2µl do produto de PCR. As condições de termociclagem da reação consistiram em 1 min a 96°C seguidos por 40 ciclos de 15s a 96°C, 15s a 50°C e 4 min a 60°C. Em seguida os produtos sequenciados foram purificados por precipitação com EDTA/acetato de sódio/etanol, e então sequenciados bidireccionalmente em sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 3500XL).

4.6 Análisedos dados

As seqüências obtidas do sequenciamento direto das regiões HSV-I e HSV-II foram analisadas nos *softwares Genetic Analyzer 3.0 (Applied Biosystems)* e *Sequencing Analysis v.5.1*, os quais permitem verificar a qualidade das seqüências obtidas. A formação do *contig* foi dado a partir da utilização do programa computacional *Standen* (pregap4 e gap 4) (BONFIELD et al., 1995) e o alinhamento múltiplo das seqüências de DNAm foi realizado pelo programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version*) v.6.0, descrito por Tamura et al. (2013).

Softwares online, tais como, o MITOMASTER(<http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMASTER/>) descrito por Brandon et al. (2009) e o HaploGrepv.2.0 (<https://haplogrep.uibk.ac.at/>) descrito por Kloss-Brandstaetter et al. (2010) foram utilizados para a detecção dos haplogrupos mitocondriais de cada indivíduo.

O programa *Structure v.2.3.1* (PRITCHARD et al., 2000) (parâmetros: k=3; 20.000 *burning* por 200.000 interações MCMC; *Admixture model*) e sua extensão *online Structure Harvester v.0.6* (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) descrita por Earl et al., 2012 foram utilizados para a verificação da estrutura populacional em estudo a partir dos marcadores informativos de ancestralidade.

Para todos os marcadores analisados (cromossomo Y, DNAm e AIMs) foi utilizada a estatística direta para a obtenção das frequências dos haplogrupos analisados.

4.7 Aspectos éticos

Por tratar-se de uma pesquisa envolvendo seres humanos, a documentação para a aprovação da pesquisa encontra-se na posse de pesquisadores da UFPE.

5. RESULTADOS

5.1 Análise dos marcadores de ancestralidade para o cromossomo Y

Foram analisados os seguintes marcadores para o cromossomo Y: YAP, SRY1532, DYS199 e 12f2 em 9 indivíduos do sexo masculino da população de Gangarras do Bandeira. Cada marcador define um haplogrupo específico de um grupo populacional.

As amostras seguiram um padrão hierárquico de análise, as quais, sendo positivas para determinado marcador, eram direcionadas para os próximos marcadores. Em todas as PCRs foram utilizados dois controles pertencentes ao laboratório, os quais os haplogrupos já são conhecidos, a fim de ser realizadas comparações com os resultados obtidos. O controle europeu pertence ao haplogrupo R1a (haplogrupo mais frequente no leste europeu) e o controle africano (YAP+) pertence ao haplogrupo DE (haplogrupo mais frequente na África Subsaariana).

A genotipagem teve início pelo marcador YAP o qual pudemos fazer a distinção entre africanos (455pb) e não africanos (150pb). O resultado está demonstrado na figura 10. Das 9 amostras, apenas três mostraram-se YAP-, ou seja, apresentaram um fragmento de 150pb comprovando sua descendência não africana.

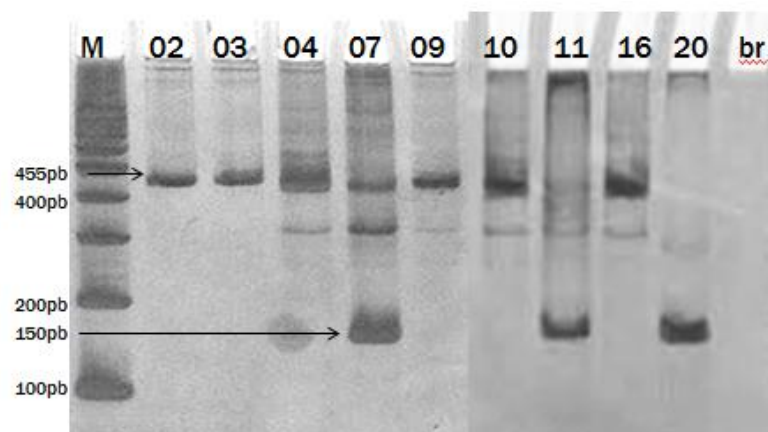


Figura 10–Gel de poliacrilamida 8% com tipagem da mutação YAP (Fonte: Autor).

O segundo marcador analisado foi o SRY1532, ao qual todas as amostras foram submetidas para se fazer a distinção entre os alelos ancestral (G) e moderno (A). Além da distinção inicial, pode-se identificar os indivíduos pertencentes ao haplogrupo europeu R1a.

Para a análise desta mutação, utilizamos a técnica de RFLP com a enzima *DraIII*. Como resultado, pode-se perceber na figura 11 que todos os indivíduos apresentaram o mesmo padrão para a digestão enzimática, ocorrendo a clivagem dos respectivos fragmentos de DNA,

fato observado de forma contrária no controle europeu (C+). Este indivíduo apresenta apenas um fragmento de 167pb comprovando sua origem europeia com a presença do alelo G ancestral em seu genótipo.

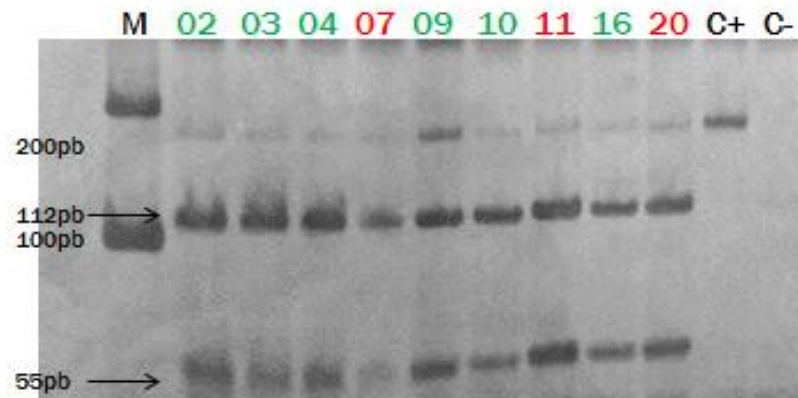


Figura 11 –Gel de poliacrilamida 12% com tipagem da mutação SRY1532. Os indivíduos identificados com a cor verde são YAP+, enquanto os que estão identificados com a cor vermelha são YAP- (Fonte: Autor).

Para o DYS199 apenas as amostras YAP- foram utilizadas. Além da PCR, foi realizada a digestão enzimática a qual produz um sítio de clivagem para a enzima *MfeI*, caracterizando indivíduos que apresentam o alelo moderno (181pb + 21pb). Os resultados encontrados classificam apenas um indivíduo (indivíduo 11) quanto à presença do alelo ancestral T (202pb) agrupando-o no haplogrupo Q3* (Figura 12).

O último marcador molecular utilizado para o cromossomo Y foi o 12f2 que caracteriza uma mutação *Indel* (deleção de 9pb), determinando o haplogrupo J*. Após a finalização dos testes laboratoriais, nenhum dos indivíduos foi alocado para este grupo (Figura 13).

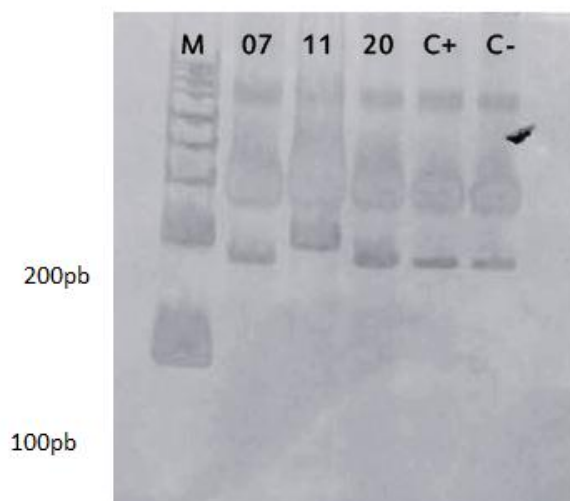


Figura 12 – Gel de poliacrilamida 12% com tipagem da mutação DYS199 (Fonte: Autor).

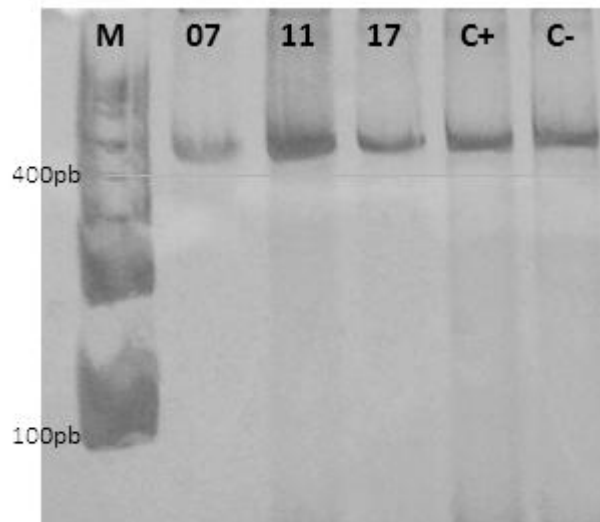


Figura 13– Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com a tipagem para a mutação 12f2 (Fonte: Autor).

Desta forma, para a análise do cromossomo Y dos 9 indivíduos analisados obtêm-se três distintos haplogrupos, os quais 6 indivíduos apresentam descendência africana (67%), 2 descendência europeia (22%) e apenas 1 denota ancestralidade paterna ameríndia (11%) (Figura 14), sendo estes pertencentes aos haplogrupos DE*, R e Q3*, respectivamente.

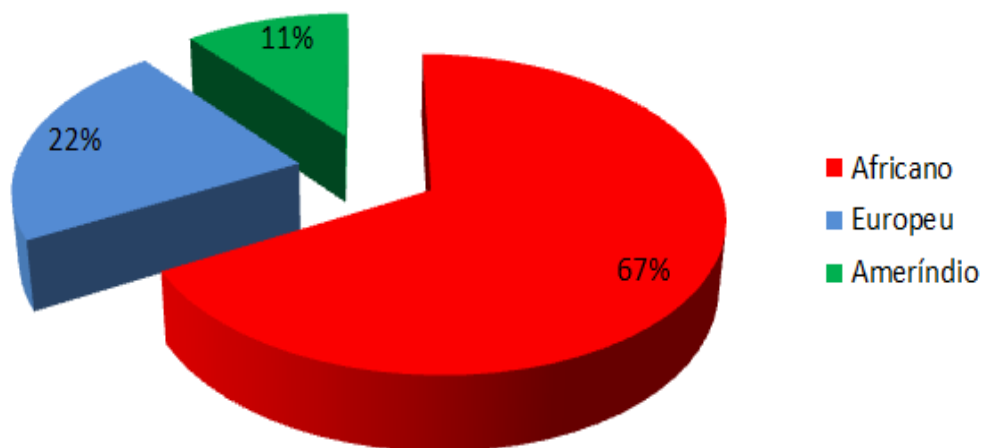


Figura 14 – Proporção de distintas ancestralidades paternas do cromossomo Y na amostra da população dos Gangarras do Bandeira, PE (Fonte: Autor).

5.2 Análise dos marcadores de ancestralidade para o DNAm

Após a realização da PCR todas as amostras foram submetidas ao sequenciamento de DNA das regiões HSV-I e HSV-II. O resultado do sequenciamento dos indivíduos gerou 24

sequências nucleotídicas. Embora tenham sido realizados diversos processos de sequenciamento, as amostras pertencentes aos indivíduos G5, G10, G14, G15 e G17 não obtiveram sucesso quanto ao valor de confiança das bases (Phred), desta forma, foram descartadas para esta análise.

Os eletroferogramas resultantes do processo de sequenciamento apresentaram no geral nucleotídeos com picos bem estabelecidos, bem como valores de confiança (Phred) superior ou igual a 25 (AnexoA).

No alinhamento múltiplo das sequências (Figura 15) realizados no programa MEGA v.6.0, foi adicionada a rCRS. Esta é a sequência controle adotada, a qual foi revisada por Andrews e colaboradores em 1999 e reflete todo genoma mitocondrial humano. A partir deste alinhamento foram estabelecidos todos os sítios de mutações entre as sequências.



Figura 15 - Sequências nucleotídicas após alinhamento com a sequência controle rCRS (Fonte: Autor).

A utilização do *software MITOMASTER* revelou a presença de 38 haplótipos diferenciados (Apêndice B) entre todos os indivíduos, dentre estes, 5 definem haplogrupos bastante específicos (Tabela 3). Entre as mutações encontradas pelo programa, destacam-se as deleções, transversões e substituições.

Tabela 3– Principais polimorfismos que definem os haplogrupos C7, D4h2 e J1c1

Polimorfismos identificadas	Haplogrupo
16051G	C7
16278T; 16325C	D4h2
482C; 16069T	J1c1

Perfazendo todas análises na população dos Gangarras do Bandeira, pode-se observar uma restrita diversidade de haplogrupos mitocondriais encontrados, onde, é possível constatar apenas a presença de duas linhas de contribuição para a ancestralidade materna: a ameríndia (67%) e a europeia (33%) (Figura 16).

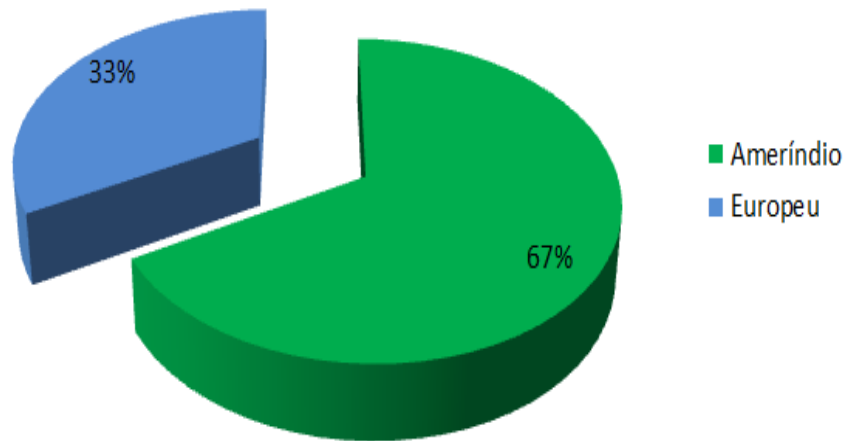


Figura 16 – Proporção da ancestralidade materna encontrada nos indivíduos estudados (Fonte: Autor).

Uma baixa diversidade haplotípica também foi revelada, sendo estas apresentando: dois haplótipos ameríndios (C7, presente em 6 indivíduos (50%) e D4h2 em apenas 2 indivíduos (17%)); e apenas um haplótipo europeu observado em 4 indivíduos analisados (J1c1 – 33%) obteve destaque entre as amostras analisadas (Figura 17).

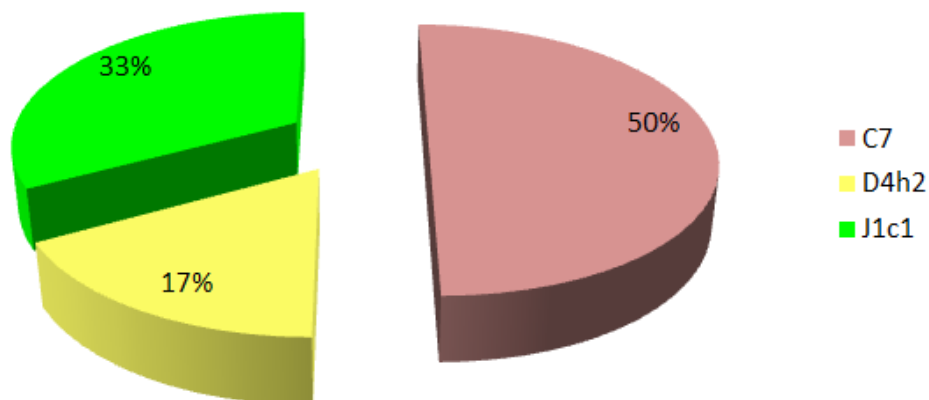


Figura 17– Proporção dos haplogrupos mitocondriais observados (Fonte: Autor).

5.3 Análise dos Marcadores Informativos de Ancestralidade

A partir dos dados alélicos analisados para os marcadores Sb19.3, AT3-I/D, APO4, CCR5 e PV92, a variabilidade genética restringiu-se a 3 populações: africanas, ameríndias e europeias, como pode ser observado na figura 18.

A contribuição ameríndia deteve um maior percentual sob as demais, demonstrando uma frequência de 37% entre os indivíduos, enquanto a africana e europeia, apresentaram 31,5%.

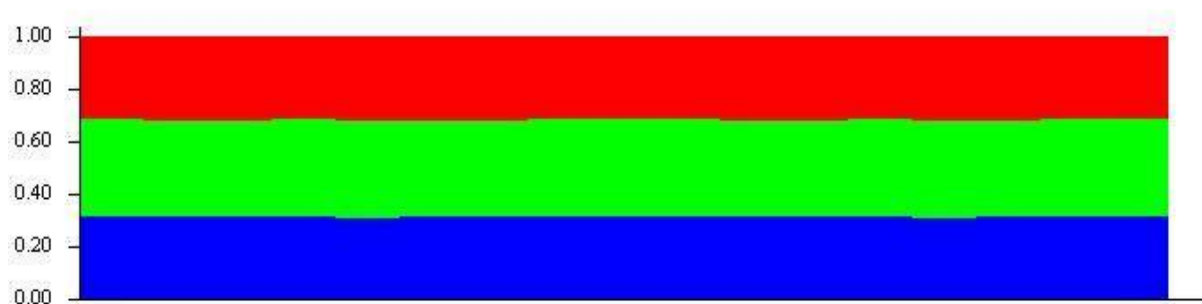


Figura 18 – Estimativa da mistura interétnica da população analisada. As cores vermelho, verde e azul correspondem a contribuições africanas, ameríndias e europeias, respectivamente (Fonte: Imagem retirada do *software Structure*).

O número de amostras analisadas para cada marcador, os genótipos encontrados e suas frequências alélicas estão sumarizadas na tabela 4.

Tabela 4 – Frequências dos alelos observados para os AIMs estudados.

Marcador	Genótipo	n	Frequência alélica (%)
Sb19.3	0	1	6%
	1	7	41%
	2	9	53%
AT3-I/D	0	2	12%
	1	7	41%
	2	8	47%
APO4	0	0	0%
	1	16	94%
	2	1	6%
PV92	0	12	71%
	1	1	6%
	2	4	23%

CCR5	0	11	65%
	1	6	35%

Sb19.3; AT3-I/D; APO4; PV92: 0= homozigoto sem inserção; 1= homozigoto com inserção; 2= heterozigoto; CCR5: 0= homozigoto sem deleção; 1= homozigoto com deleção (Fonte: Autor - Dados retirados do *Software Structure*).

As contribuições da variabilidade genética de cada indivíduo podem ser visualizadas na tabela 5 e na figura 19. Nota-se que os maiores valores percentuais estão expressos para a descendência ameríndia.

Tabela 5–Variabilidade genética individual das amostras estudadas.

Indivíduo	Contribuições individuais (%)		
	Africana	Ameríndia	Europeia
G1	31,4%	36,8%	31,8%
G2	31,5%	37%	31,5%
G3	31,5%	37%	31,5%
G4	31,4%	36,9%	31,7%
G5	31,7%	37,3%	31%
G6	31,5%	36,9%	31,6%
G7	31,6%	36,9%	31,5%
G8	31,4%	37,1%	31,5%
G9	31,3%	37%	31,7%
G10	31,4%	36,9%	31,7%
G11	31,5%	37%	31,5%
G12	31,5%	37%	31,5%
G13	31,5%	37%	31,5%
G14	31,6%	37,1%	31,3%
G15	31,5%	36,9%	31,6%
G16	31,3%	37,2%	31,5%
G17	31,4%	36,9%	31,7%

Fonte: Autor – Dados retirados do *Software Structure*

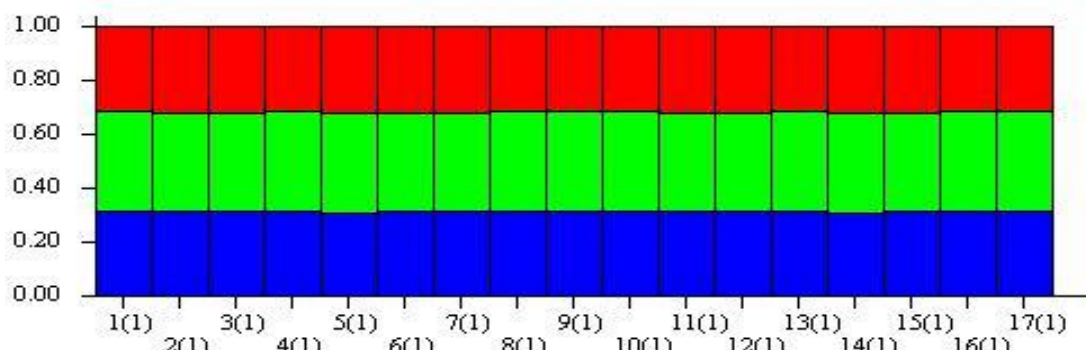


Figura 19 – Estimativa da mistura interétnica individual da população analisada. Cada barra corresponde a um indivíduo. As cores vermelho, verde e azul correspondem a contribuições africanas, ameríndias e europeias, respectivamente (Fonte: Imagem retirada do *software Structure*).

6. DISCUSSÃO

Polimorfismos de DNA presentes nos cromossomos autossomos, sexuais e no DNA mitocondrial, vêm sendo utilizados em estudos relacionados à formação da população brasileira, a qual sabe-se que sua contribuição populacional se deu a partir da miscigenação de três grupos étnicos principais: europeus, ameríndios e africanos (SANTOS, 2012).

A partir dos estudos sobre evolução humana realizados através da análise do DNA, identificou-se que as linhagens maternas e paternas estão relacionadas com regiões geográficas específicas, o que possibilita a reconstrução da história demográfica, migrações e determinações da ancestralidade genética de indivíduos e grupos humanos (HUNEMEIER et al., 2007). Embora dados históricos e genéticos mostrem que a distribuição desses três grupos étnicos ao longo do território brasileiro não ocorreu de forma homogênea, ou seja, a proporção de africanos, ameríndios e europeus difere significativamente a depender da região geográfica (TELÓ, 2010; IBGE, 2000).

O presente estudo avaliou a variabilidade genética da população de Gangarras do Bandeira no Estado de Pernambuco a partir de marcadores moleculares de ancestralidade. Assim como ocorre em outros estados brasileiros, do ponto de vista de sua formação, Pernambuco possui uma população bastante heterogênea. Na história do Estado, que abriga diversos fluxos migratórios durante o período colonial, indivíduos oriundos do exterior contribuíram para o elevado grau de miscigenação da sua população atual.

As formas como esses grupos se distribuíram e contribuíram para a formação das populações de diversas regiões do país reflete, também, na distribuição diferencial de fenótipo entre elas. Por exemplo, ocorreu um maior fluxo de africanos para o Nordeste e Sudeste do Brasil, enquanto que os extremos do país, Norte e Sul, tiveram menor participação desses migrantes (IBGE, 2010; HERMIDA, 2013).

Marcadores uniparentais como o cromossomo Y e o DNAmT, podem auxiliar no entendimento do processo de povoamento, pois permitem distinguir o quanto da mistura herdada deriva da contribuição diferencial entre homens e mulheres. No Brasil, exceto pelas invasões temporárias de franceses no Rio de Janeiro e de holandeses em Pernambuco, praticamente apenas portugueses vieram para o Brasil até o início do século XIX. Os primeiros imigrantes portugueses não trouxeram mulheres, e registros históricos indicam que eles iniciaram rapidamente um processo de miscigenação com mulheres africanas e ameríndias contribuindo para o processo da colonização brasileira (PENA et al., 2000; HERMIDA, 2013).

Em um estudo elaborado por Pena e colaboradores em 2000, sobre a formação da população brasileira, os resultados obtidos demonstraram que a imensa maioria (provavelmente mais de 90%) das partilinhagens dos brancos brasileiros é de origem europeia. Fato corroborado por pesquisas desenvolvidas por Abé-Sandes e colaboradores em 2004.

Barros (2006) ao analisar a diversidade haplotípica de 500 indivíduos pernambucanos, propôs uma íntima relação de parentesco entre pernambucanos e europeus, o que permitiu considerar que a maioria dos cromossomos Y da população de Pernambuco apresentou origem europeia, fato que se torna consistente com a história da colonização do Estado.

Maciel (2003) desenvolveu um estudo relacionado apolimorfismos no cromossomo Y com 240 indivíduos homens no Estado de Pernambuco e os resultados demonstraram que a população pernambucana é geneticamente similar às populações europeias e está geneticamente mais distante das populações asiáticas.

Apesar dos diversos estudos, aqui citados, apontarem para a maior contribuição do cromossomo Y brasileiro ser europeu, os dados apresentados neste estudo entraram em divergência (predominância africana) com resultados já apresentados na literatura, principalmente o indivíduo G11 por tratar-se de um ameríndio. Em dois estudos desenvolvidos, um por Pena et al. (2000), e outro por Alves-Silva et al. (2000) com uma amostra de mais 200 indivíduos, nenhumhaplogrupoameríndio para a linhagem paterna foi encontrado, fato que mostra que o homem indígena deixou pouquíssimos descendentes no Brasil mas que um deles encontra-se habitando as terras da Comunidade do Bandeira.

Alves-Silva e colaboradores (2000) realizaram um ensaio com amostras de DNAmT em brasileiros mostrando que a maioria das matrinhagens são de origem ameríndia, seguida de contribuições africanas e europeias. Quando estratificado pelas regiões do país, observou-se, como já era esperado, que a maioria das matrinhagens no norte era de origem

ameríndia(54%), no nordeste eram africanas (44%) e no sul as linhagens maternas eram principalmente europeias (66%).

Em adição, Pena et al., (2000) em estudo desenvolvido com participantes brasileiros, os DNAm obtiveram, para todo o Brasil, uma distribuição de origens também uniforme, apresentando 33% de linhagens ameríndias, 28% africanas e 39% europeias. Entre as linhagens europeias, destacam-se os haplogrupos H, T e J, sendo estes distribuídos em todas as regiões do Brasil.

Embora não encontrados haplogrupos africanos na presente pesquisa, os dados obtidos corroboram com as distribuições brasileiras de ancestralidade citadas nas literaturas, onde, os Gangarras do Bandeira, aparecem com elevadas contribuições ameríndias (67%) e europeias (33%), estando, o haplogrupo J, presente em 33% da população analisada.

Não existem muitos trabalhos utilizando marcadores em DNA nucleares autossômicos para estimativa de miscigenação étnica em populações brasileiras, principalmente em zonas mais afastadas dos grandes centros (PEDROSA, 2006). Embora, há alguns anos pesquisas tenham sido realizados.

Callegari-Jacques et al. (2003) analisaram mais de mil indivíduos, envolvidos em casos de paternidade, pertencentes as cinco regiões geográficas brasileiras. Estimou-se que a porcentagem da contribuição europeia é maior na região Sul (81%) e menor na região Nordeste (68%). A contribuição africana, por sua vez é menor na região Sul (11%), enquanto os maiores valores foram encontrados para as regiões Sudeste e Centro-Oeste (18%). As estimativas para a contribuição ameríndia foram menores no Sul e Sudeste (7%), enquanto a região Nordeste obteve o maior percentual (17%) de todo território brasileiro.

Parra et al. (2003), também utilizaram AIMs para estimar a miscigenação de homens auto-declarados brancos em quatro regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste). Os resultados obtidos apontaram que a contribuição africana é maior na região Sudeste (32%), seguida pelas regiões Nordeste (29%), Norte (23%) e Sul (13%).

As análises de 798 indivíduos feitas por Manta e colaboradores em 2013, por todo território brasileiro revelaram resultados mais refinados embora sejam similares ao de estudos citados anteriormente. A maior contribuição europeia se faz presente na região Sul e, a medida que se aproxima ao extremo norte do Brasil, a contribuição ameríndia passa a ser superior, seguida da africana.

Ainda que o número de marcadores informativos de ancestralidade tenha sido restrito para estimar a total contribuição genética desta população do presente estudo, os dados

observados já contribuem para uma estimativa populacional, onde 37% dos indivíduos pertencentes à Comunidade do Bandeira apresentam uma origem ameríndia, enquanto as descendências africanas e europeias apresentam uma contribuição de 31,5%, cada.

O excesso de indivíduos homocigotos e a baixa diversidade de haplogrupos podem ser explicados pela estruturação populacional ocasionada por casamentos consanguíneos entre indivíduos do mesmo grupo, uma vez que os Gangarras vivem afastados das grandes cidades e em comunidade.

Mesmo que, os indivíduos pertencentes à comunidade do Bandeira apresentem um fenótipo típico europeu, a cor da pele, assim como outras características físicas externas como formato da face, do nariz e textura do cabelo são traços superficiais, e podem ser espelhadas a adaptações ao clima e outras variáveis ambientais. Por isso, a utilização de marcadores genéticos adequados tem como definir corretamente a ancestralidade de um indivíduo e relacioná-los a estudos populacionais (HERMIDA, 2013).

O Brasil, como se sabe, é um país altamente miscigenado e a migração é o fator evolutivo capaz de dispersar a diversidade genética entre as populações. Um exemplo é que, os Gangarras, mesmo apresentando características bastante particulares, após a análise dos resultados obtidos observa-se que a miscigenação está presente.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo, assim como outros já realizados em diversas populações brasileiras, auxiliam o esclarecimento dos relatos históricos sobre as diferenças populacionais que ocorreram no processo de colonização do Brasil, assim com a formação tri-híbrida da nossa população.

Os dados aqui apresentados revelaram uma maior contribuição africana na patrilinearidade e uma ancestralidade ameríndia se fez presente com uma elevada frequência na matrilinearidade e nos cromossomos autossomos, fato que diverge com as hipóteses levantadas pela literatura de que os indivíduos pertencentes ao Bandeira sejam descendentes de holandeses, no entanto, é necessária uma maior amostragem e utilização de marcadores específicos para regiões da Europa e Holanda.

REFERÊNCIAS

ABÉ-SANDES, K.; SILVA, W.A.; ZAGO, M.A.; Heterogeneity of the Y chromosome in AfroBrazilian populations. **American Journal of Human Biology**, v. 76, n. 1, p. 77-86, 2004.

ALVES, Patrícia. Gangarras do Agreste Pernambucano. **Revista Pro News**, n. 68, 2005.

ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **The American Journal of Human Genetics**. v.67, p.444-461, 2000.

ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARREL, B.G.; de BRUIJN, M.H.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIR, P.H.; SMITH, A.J.H.; STADEN, R.; YOUNG, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 9, p. 457-465, 1981.

ANDREWS, R.M; KUBACKA, I.; CHINNERY, P.F.; LIGHTOWLERS, R.N.; TURNBULL, D.M.; HOWELL, N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, 1999.

ARCOT, S.S.; ADAMSON, A.W.; RISCH, G.W.; LAFLEUR, J.; ROBICHAUX, M.B.; LAMERDIN, J.E.; CARRANO, A.V.; BATZER, M.A. High-resolution cartography of recently integrated human chromosome 19-specific *Alu* fossil. **Journal of Molecular Biology**, v. 281, p. 843-856, 1998.

BARROS, J.E.X.S. **Diversidade haplotípica de microssatélites do cromossomo Y humano na população de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. UFPE: Recife, 2006.

BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J.R.; PENA, S.D.J. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. Em: **Annals of human Genetics**, v. 70, p. 1-8, 2006.

BATZER, M.A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D.H.; SHAIKH, T.H.; NOVICK, G.E.; IOANNOU, P.A.; SCHEER, W.D.; HERRERA, R.J. African origin of human-specific polymorphic *Alu* insertions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 12288-12294, 1994.

BATZER, M.A.; ARCOT, S.S.; PHINNEY, J.W.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; KASS, D.H.; MILLIGAN, S.M.; KIMPTON, C.; GILL, P.; HOCHMEISTER, M.; IOANNOU, P.A.; HERRERA, R.J.; BOUDREAU, D.A.; SCHEER, W.D.; KEATS, B.J.B.; DEININGER, P.L.; STONEKING, M. Genetic variation of recent *Alu* insertions in human populations. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p.22-29. 1996a.

BATZER, M.A.; DEININGER, P.L.; HELLMANN-BLUMBERG, U.; JURKA, J.; LABUDA, D.; RUBIN, C.M.; SCHMID, C.W.; ZIETKIEWICZ, E.; ZUCKERKANDL, E. Standardized nomenclature of *Alu* repeats. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, n.1, p. 3-6, 1996b.

BENJEDDOU, M.; LEAT, N.; DAVISON, S. Use of molecular genetics and historical records to reconstruct the history of local communities. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n° 25, p. 2516-2519, 2006.

BLANCO, P.; SHLUMUKOVA, M.; SARGENT, C.A.; JOBLING, M.A.; AFFARA, N.; HURLES, M.E. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, n° 10, p. 752-758, 2000.

BOMFIM, T.F. **Ancestralidade genômica em uma amostra de portadores do HIV-1 do Estado da Bahia**. FIOCRUZ: Salvador, 2008.

BONFIELD, J.K.; SMITH, K.F.; STADEN R. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 24, p. 4992-4999, 1995.

BONILLA, C.; PARRA, E.J.; DIOS, S.; MARSHALL, J.A.; HAMMAN, R.F.; FERREL, R.E.; HOGGART, C.L.; MCKEIGUE, P.M.; SHRIVER, M.D. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 139-153, 2004.

BRANDON, M.C.; RUIZ-PESINI, E.; MISHMAR, D.; PROCACCIO, V.; LOTT, M.T.; NQUYEN, K.C.; SPOLIM, S.; PATIL, U.; BALDI, P.; WALLACE, D.C. Mitomaster: a bioinformatics tool for the analysis of mitochondrial DNA sequences. **Human Mutation**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2009.

BRAVI, C.M.; BAILLIET, G.; MARTÍNEZ-MARIGNAC, V.L.; BIANCHI, N.O. Tracing the origin and geographic distribution of the ancestral form of the modern human Y chromosome. **Revista Chilena de Historia Natural**, n. 74, p. 139-149, 2001.

BUTLER, J.M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology**. Elsevier, Cap. 14, p. 405-456, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123745132>>. Acessado em 20/12/2015.

CALLEGARI-JACQUES, S.M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F.M.; SALAMONI, S.P.; CROSSETTI, S.G.; FERREIRA, M.E.; HUTZ, M.H. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, n. 6, p. 824-834, 2003.

CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M.; PENA, S.D.J. Divergent human Y-chromosome microsatellite evolution rates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, p. 204-214, 1999.

CASPERS, M.; PAVLOVA, A.; DRIESEN, J.; HARBRECHT, U.; KLAMROTH, R.; KADAR, J.; FISCHER, R.; KEMKES-MATTHES, B.; OLDENBURG, J. Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S – Practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 108, n. 2, p. 247-257, 2012.

CAVANI, J. **Drama dos moradores do Bandeira é plano-de-fundo de documentário**. Diário de Pernambuco, 2004. Disponível em:

<http://www.old.pernambuco.com/diario/2004/07/02/viver4_0.html>. Acessado em: 06 de julho de 2015.

CEREZO, M.; BANDELT, H.; MARÍN-GUERRERO, I.; ARDANAZ, M.; VEJA, A.; CARRACEDO, A.; GARCÍA-ORAD, A.; SALAS, A. High mitochondrial DNA stability in B-cell chronic lymphocytic leucemia. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, 2009.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

DUARTE, A. **Os Gangarras do Bandeira**. Diário de Pernambuco, 2005. Disponível em: <http://www.pernambuco.com/diario/2005/03/08/interior1_0.asp>. Acessado em: 04 de julho de 2015.

EARL, D.A.; vonHOLDT, B.M.; Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359-361, 2012.

EWIS, A.A.; LEE, J.; SHINKA, T.; NAKAHORI, Y. Two Y-chromosome-specific polymorphisms 12f2 and DFFRY in the Japanese population and their relations to other Y-polymorphisms. **The Journal of Medical Investigation**, v. 49, p. 44-50, 2002.

FINSTERER, J. Mitochondriopathies. **European Journal of Neurology**, v. 3, n. 11, p. 163-186, 2004.

FLORES, C.N.; MACA-MEYER, J.A.; PÉREZ, A.M.; GONZÁLEZ, J.M.; LARRUGA, V.; CABRERA, M. A Predominant European Ancestry of Paternal Lineages from Canary Islanders. Em: **Annals of Human Genetics**, n. 67, p. 138-152, 2003.

GALVANI, A.P.; SLATKIN, M. Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5- Δ 32 HIV-resistance allele. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, dezembro, 2003.

GESTEIRA, H.M. O Recife holandês: história natural e colonização neerlandesa (1624-1654). **Sociedade Brasileira de História da Ciência**: Rio de Janeiro, v. 2, n.1, p. 6-21, junho, 2004.

GIACHINI, C.; NUTI, F.; TURNER, D.J.; LAFACE, I.; XUE, Y.; DAGUIN, F.; FORTI, G.; TYLER-SMITH, C.; KRAUSZ, C. *TSPY1* copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, nº 10, p. 4016-4022, 2009.

GODOY, J.M.P.; SILVA, S.R.O.R.A.M.; NAGATO, L.; SOUZA, D.S. Prevalência da deficiência de antitrombina III na trombose venosa profunda. **Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascular**, n.14, p. 103-106, 1998.

GONTIJO, C.C. **Composição genética de duas populações afro-derivadas brasileiras inferidas a partir de marcadores informativos de ancestralidade**. UnB: Brasília, 2008.

HAMMER, M.F.; HORAI, S. Y chromosomal DNA variation and the peopling of Japan. **The American Journal of Human Genetics**. v. 56, p. 951-962. Janeiro, 1995.

HAMMER, M.F.; ZEGURA, S.L. The role of the Y chromosome human evolutionary studies. **Evolutionary Anthropology**, v. 5, p. 116-134, 1996.

HERMIDA, R.M.S.M. **Estudo de ancestralidade através de marcadores genéticos uniparentais**. UERJ: Rio de Janeiro, 2013.

HEY, J. On the number of new world founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. **PLoS Biology**, v.3, n.6, p. 965-975. Junho, 2005.

HUNEMEIER, T.; CARVALHO, C.; MARRERO, A.R.; SALZANO, F.M.; PENA, S.D.J.; BORTOLINI, M.C.; Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. **American Journal of Physical Anthropology**, v, 133, p. 854-867, 2007.

IBGE Mapas. **Mapas físicos**, 2016. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/>>. Acessado em: 28/01/2016.

IBGE. **Brasil: 500 anos de povoamento**. Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: <<http://brasil500anos.ibge.gov.br/>>. Acessado em: 25/01/2016.

JOBLING, M.A.; TYLER-SMITH, C. The human Y chromosome: na evolutionary marker comes of age. **Nature**, v. 4, 2003.

KAMP, C.; HIRSCHMANN, P.; VOSS, H.; HUELLEN, K.; VOGT, P.H. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. **Human Molecular Genetics**. v, 12, n. 9, p. 2563-2572, 2000.

KARAFET, T.; XU, L.; DU, R.; WANG, W.; FENG, S.; WELLS, R.S.; REDD, A.J.; ZEGURA, S.L.; HAMMER, MF. Paternal population history of East Asia: sources, patterns and microevolutionary processes. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 3, p. 615-628, 2001.

KIDO, T.; LAU, Y.C. Roles of the Y chromosome genes in human cancers. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, p. 373-380, 2015.

KLOSS-BRANDSTAETTER, A.; PACHER, D.; SCHOENHERR, S.; WEISSENSTEINER, H.; BINNA, R.; SPECHT, G.; KRONENBERG, F. **HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups**. 2010. Disponível em: <<http://www.haplogrep.uibk.ac.at>>. Acessado em: 07 de janeiro de 2016.

LARDONE, M.C.; MARENGO, A.; PARADA-BUSTAMANTE, A.; CIFUENTES, L.; PIOTTANTE, A.; EBENSPERGER, M.; VALDEVENITO, R.; CASTRO, A. Greater prevalence of Y chromosome Q1a3a haplogroup in Y-microdeleted Chilean men: a case-control study. **Journal os Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 531-538, 2013.

LEITE, T.K.M. **Variabilidade genética na população brasileira: ancestralidade genômica e fenótipos de capacidade cardiovascular**. UCB: Brasília, 2012.

LELL, J.T.; BROWN, M.D.; SCHURR, T.G.; SUKERNIK, R.I.; STARIKOVSKAYA, Y.B.; TORRONI, A.; MOORE, L.G.; TROUP, G.M.; WALLACE, D.C. Y chromosome polymorphisms in Native American and Siberian populations: identification of Native American Y chromosome haplotypes. **Humanan Genetics**, v. 100, p. 536-543, 1997.

LIMA, J. Trombofilias e gravidez. **Boletim da SPHM**, v. 21, n. 3, setembro, 2006.

LOPES, J.V.S. **Distribuição de segmentos do cromossoma X com ancestralidade europeia e africana na população de Cabo Verde: implicações para o estudo da miscigenação em populações humanas e para a história do povoamento do arquipélago**. Universidade do Porto: Portugal, 2011.

LOPES, S.S.S. **Estudos filogeográficos com uso de marcadores moleculares localizados em uma região de baixa taxa de recombinação do cromossomo X humano**. UFMG: Belo Horizonte, 2007.

MACÊDO, A.K.V. **Determinação do polimorfismo de Δ ccr5 e comparação com a distribuição de frequências encontradas em indivíduos infectados pelo HIV-1 na população de Pernambuco**. UFPE: Recife, 2003.

MACHADO, T.M.B. **Ancestralidade em Salvador – BA**. FIOCRUZ: Salvador, 2008.

MACIEL, E.M.B.B. Determinação do polimorfismo e análise de 5 marcadores do cromossomo Y em Pernambuco. UFPE: Recife, 2003.

MAGALHÃES, I. M; SILVA, D.M. Informações acerca de marcadores moleculares uniparentais: DNA mitocondrial e cromossomo Y. **Estudos de Biologia**, v. 28, n. 63, p. 81-88, abril/junho, 2006.

MARTINS, T.M.V. **Y-miniSTR: alternativa para a análise de amostras “complicadas” – Estudo da população do Norte de Portugal**. Universidade do Porto: Portugal, 2008.

MELLO, E.C. Imagens do Brasil holandês 1630-1654. **ARS**: São Paulo, v. 7, n. 13, 2009.

MORAIS, P.J.S. **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de Cabo Verde residentes em Lisboa**. Eganias Moniz: Portugal, 2013.

MUNIZ, Y.C.N. **Marcadores genéticos de ancestralidade em comunidades fundadas por açorianos na Ilha de Santa Catarina**. USP: São Paulo, 2008.

NJOROGE, S.K.; WITEK, M.A.; HUPERT, M.L.; SOPER, S.A. Microchip electrophoresis of Alu elements for gender determination and inference of human ethnic origin. **Eletrophoresis**, v.31, p. 981-990, 2010.

OLIVEIRA, P.C. **Ancestralidade genética e genes de susceptibilidade em portadores de câncer de próstata do Estado da Bahia**. FIOCRUZ: Bahia, 2014.

PARRA, E.J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M.A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D.B.; DEKA, R.; FERRELL, R.E.; SHRIVER, M.D. Estimation african american admixture proportions by use of population-specific alleles. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, p. 1839-1851, 1998.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 177-182, 2003.

PEDROSA, M.A.F. **Composição genética de quatro populações remanescentes de quilombos do Brasil com base em microssatélites e marcadores de ancestralidade**. UnB: Brasília, 2006.

PENA, S.D.J.; CARVALHO-SILVA, D.R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V.F.; SANTOS, F.R. Retrato molecular do Brasil. **Ciência Hoje**, v. 27, nº 159, p. 16-25, 2000.

PERICIC, M.; LAUC, L.B.; KLARIC, I.M.; ROOTSI, S.; JANICIJEVIC, B.; RUDAN, I.; TERZIC, R.; COLAK, I.; KVESIC, A.; POPOVIC, D.; SIJACKI, A.; BEHLULI, I.; DORDEVIC, D.; EFREMOVSKA, L.; BAJEC, D.D.; STEFANOVIC, B.D.; VILLEMS, R.; RUDAN, P. High-resolution pylogenetic analysis of southeastern Europe traces major episodes of paternal gene flow among slavic populations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, nº 10, p. 1964-1975, 2005.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

QUINTANA-MURCI, L.; KRAUSZ, C.; ZERJAL, T.; SAYAR, S.H.; HAMMER, M.F.; MEHDI, S.Q.; AYUB, Q.; QAMAR, R.; MOHYUDDIN, A.; RADHAKRISHNA, U.; JOBLING, M.A.; TYLER-SMITH, C.; MCELREAVEY, K. Y-chromosome lineages trace diffusion of people and languages in southwestern Asia. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 537-542, 2001.

RAMANA, G.; SINGH, L.; CHAKRABORTY, R. The SRY1532 of the human Y chromosome is subject to recurrent single nucleotide mutations. **Human Biology**, v. 73, n. 1, p. 71-80, 2001.

REBELO, M.L.P. **Aplicação do estudo de polimorfismos do cromossomo Y em genética forense Y-STRs e marcadores bialélicos**. Universidade do Porto: ICBAS, 2003.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. Em: **Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – Embrapa**, São Paulo. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPPSE2010/18627/1/PROCILCAR2009.00079.pdf>>. Acessado em: 01/02/2016.

REICHE, E.M.V.; WATANABE, M.A.E.; BONAMETTI, A.M.; MORIMOTO, H.K.; MORIMOTO, A.A.; WIECHMANN, S.L.; MATSUO, T.; OLIVEIRA, J.C.; REICHE, F.V. Frequency of CCR5-Δ32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of

Southern Brazilian population. **International Journal of Molecular Medicine**, v.22, p. 669-675, 2008.

REIS, R.P. **O tempo de pedra**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2008.

RINCON, D. **Estudos de DNA mitocondrial em populações remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira – São Paulo**. Instituto de Biociências: São Paulo, 2009.

SACCONI, C.; DE GIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 1, n. 238, p. 195-209, 1999.

SANTOS, F.R.; PANDYA, A.; TYLER-SMITH, C.; PENA, S.D.J.; SCHANFIELD, M.; LEONARD, W.R.; OSIPOVA, L.; CRAWFORD, M.H.; MITCHELL, R.J. The central Siberian origin for native american Y chromosomes. **The American Journal of Human Genetics**, v.64, p. 619-628. Fevereiro, 1999.

SANTOS, R.V.; BORTOLINI, M.C.; MAIO, M.C. No fio da navalha: raça, genética e identidades. **Revista USP**. São Paulo, n. 86, p. 22-35, 2006.

SANTOS, S.S.B. **Estudo da ancestralidade materna da população do Rio de Janeiro: análise do DNA mitocondrial**. UERJ: Rio de Janeiro, 2012a.

SANTOS, L.G; SANTOS, R.S. A utilização do DNA mitocondrial para elucidação dos processos de evolução e variabilidade genética humana. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n.15, p. 1720-1729, 2012b.

SEIELSTAD, M.; BEKELE, E.; IBRAHIM, M.; TOURÉ, A.; TRAORÉ, M. A view of modern human origins from Y chromosome microsatellite variation. **Genome Research**, v.9, p.558-567. Julho, 1999

SEMINO, O.; MAGRI, C.; BENUZZI, G.; LIN, A.A.; AL-ZAHERY, N.; BATTAGLIA, V.; MACCIONI, L.; TRIANTAPHYLIDIS, C.; SHEN, P.; OEFNER, P.J.; ZHIVOTOVSKY, L.A.; KING, R.; TORRONI, A.; CAVALLI-SFORZA, L.L.; UNDERHILL, P.A.; SANTACHIARA-BENERECETTI, A.S. 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. **The American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 1023-1034, 2004.

SENE, G.M. Caminhos pré-colombianos. **Revista de História**. Disponível em: <<http://www.revistadehistoria.com.br/secao/artigos/caminhos-pre-colombianos>>. Acessado em: 03/02/2016.

SHRIVER, M.D.; SMITH, M.W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J.M.; DEKA, R.; FERREL, R.E. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **The American Journal of Human Genetics**, v. 60, p. 957-964, 1997.

SKORECKI, K.; SELIQ, S.; BLAZER, S.; BRADMAN, R.; BRADMAN, N.; WABURTON, P.J.; ISMAJLOWICZ, M.; HAMMER, M.F. Y chromosomes of Jewish priests. **Nature**, v.2, n. 382, 1997.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TELÓ, E.P. **Estimativa de mistura étnica avaliada por marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) e microssatélites (STRs)**. FIOCRUZ: Salvador, 2010.

WHITFIELD, L.S.; SULSTON, J.E.; GOODFELLOW, P.N. Sequence variation of the human Y chromosome. **Nature**, n. 378, p. 379-380, 1995.

APÊNDICEA – Parâmetros de amplificação e concentrações adotadas para as reações de PCR

YAP: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 51°C por 1 min, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 5 min. Foi utilizado: Tampão IB; 0,2 mM de dNTPs; 0,12 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50ng de DNA genômico.

SRY1532:desnaturação inicial a 95°C por 10 min; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 56°C por 20s, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 1 min. Foi utilizado: Tampão IIC; 0,2 mM de dNTPs; 0,5 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50ng de DNA genômico.

DYS199 e 12F2:desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 61°C por 1 min, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi utilizado: Tampão IB; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50ng de DNA genômico.

L15997/H017 e L1655/H599: desnaturação inicial a 95°C por 10 min; seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 95°C por 15s, anelamento a 52°C por 30s, e alongação a 72°C por 90s; com extensão final a 72° C por 10 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 200 mM de dNTPs; 0,8mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 ng de DNA genômico.

Sb19.3: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 60°C por 30s, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72° C por 5 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 2,76 mM de dNTPs; 0,84 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 ng de DNA genômico.

APO4: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 2 min, e alongação a 72°C por 2 min; com extensão final a 72° C por 5 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 0,2 mM de dNTPs;375 ng de cada iniciador; 2,5U de Taq DNA Polimerase e 20-50 ng de DNA genômico.

PV92: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94°C por 40s, anelamento a 55°C por 50s, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72° C por 7 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 0,2 mM de dNTPs; 0,25µM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.

AT3-I/D: desnaturação inicial a 94°C por 6 min; seguida por 1 ciclo a 54°C por 2 min e mais 35 ciclos de: desnaturação a 72°C por 1 min, anelamento a 94°C por 30s, e alongação a 54°C por 1 min; com extensão final a 72° C por 10 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 200mM de dNTPs; 0,25 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.

CCR5: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 58°C por 1 min, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72° C por 10 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 1,25µM de dNTPs; 2,5µM de cada iniciador; 2,5U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.

APÊNDICE B – Haplótipos pertencentes aos indivíduos analisados, bem como seus respectivos haplogrupos

AMOSTRA	HAPLÓTIPOS	HAPLOGRUPO
G1	73G; 146C; 194T; 249d; 263G; 286d; 309.1C; 310C; 489C; 523d; 16051G; 16184T; 16223T; 16287T; 16298C; 16311C; 16325C; 16327T	C7
G2	73G; 146C; 194T; 249d; 263G; 286d; 309.1C; 310C; 489C; 523d; 16051G; 16184T; 16223T; 16287T; 16298C; 16311C; 16325C; 16327T	C7
G3	73G; 146C; 194T; 249d; 263G; 286d; 309.1C; 310C; 489C; 523d; 16051G; 16184T; 16223T; 16287T; 16298C; 16311C; 16325C; 16327T	C7
G4	73G; 195C; 263G; 315.1C; 489C; 16223T; 16278T; 16291T; 16325C; 16362C	D4h2
G6	73G; 146C; 194T; 248d; 263G; 286d; 309.1C; 310C; 489C; 523d; 559T; 570T; 16051G; 16184T; 16223T; 16287T; 16298C; 16311C; 16325C; 16327T	C7
G7	73G; 146C; 194T; 249d; 263G; 286d; 309.1C; 310C; 489C; 523d; 16051G; 16184T; 16223T; 16287T; 16298C; 16311C; 16325C; 16327T	C7
G8	73G; 228A; 263G; 295T; 309.1C; 310C; 462T; 482C; 489C; 16069T; 16126C	J1c1
G9	73G; 228A; 263G; 295T; 309.1C; 310C; 462T; 482C; 489C; 16069T; 16126C	J1c1
G11	73G; 195C; 263G; 315.1C; 489C; 16223T; 16278T; 16291T; 16325C; 16362C	D4h2
G12	73G; 228A; 263G; 295T; 309.1C; 310C; 462T; 482C; 489C; 16069T; 16126C	J1c1
G13	73G; 228A; 263G; 295T; 309.1C; 310C; 462T; 482C; 489C; 16069T; 16126C	J1c1
G16	73G; 146C; 194T; 249d; 263G; 286d; 309.1C; 310C; 489C; 523d; 16051G; 16184T; 16223T; 16287T; 16298C; 16311C; 16325C; 16327T	C7

ANEXO A – Cromatogramas de todos os indivíduos analisados, bem como seus valores de confiança (Phred) respectivos

