

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Programa de Biociências e
Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Raquel de Freitas Figueiredo

ESTUDO DE SNPs DO CROMOSSOMO Y NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Araraquara-SP

2012

Raquel de Freitas Figueiredo

**ESTUDO DE SNPs DO CROMOSSOMO Y NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Araraquara-SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F475e Figueiredo, Raquel de Freitas
Estudo de SNPs na população do Estado do Espírito Santo Brasil /
Raquel de Freitas Figueiredo – Araraquara, 2012.
66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli

1. Cromossomo Y. II. SNPs. 3. SNaPshot. I. Cicarelli, Regina Maria
Barretto, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Banca Examinadora

Profa. Dra. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI – Orientadora
Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. GREICIANE GABURRO PANETO
Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo

Profa. Dra. RAQUEL MANTUANELI SCAREL CAMINAGA
Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia do Câmpus de
Araraquara da UNESP

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre ilumina meus caminhos.

À Professora Regina M. B. Cicarelli pela orientação e confiança, e pela grande contribuição em minha formação acadêmica.

Aos meus pais Walter e Clélia, que com muito amor e carinho, sempre me incentivaram nos estudos e me permitiram conquistar mais esta etapa em minha vida.

Às minhas irmãs Carla e Marcela por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado Rafael que sempre esteve ao meu lado, nos momentos bons e ruins, me incentivando em todas as minhas decisões.

À minha família, que sempre torceu por mim em todos os momentos da minha vida.

Às pesquisadoras Leonor Gusmão e Verônica Gomes por terem esclarecido diversas dúvidas no decorrer deste trabalho, contribuindo muito na realização do mesmo.

À Dra. Joyce, sempre disposta a me ajudar em todos os momentos, pela grande contribuição nesse trabalho assim como pela imensa amizade.

À Naiara e Danilo B. pelos momentos agradáveis no laboratório assim como pela amizade e conhecimento.

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia e Paternidade, Lis, Danilo R., Cris, Angela, Andréa, Bianca, Flávia e Bárbara, pelos momentos de distração e alegria no decorrer destes anos.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim e assim, fizeram parte desta conquista.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista por propiciar a realização desta etapa da minha vida.

Ao CNPq (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudo concedida durante o mestrado.

Ao PADC-UNESP (Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma maneira auxiliaram na realização deste trabalho, o meu agradecimento sincero.

RESUMO

A identificação humana pela análise de DNA utiliza o perfil genético de um indivíduo baseado no estudo de uma combinação de marcadores que são herdados de seus progenitores. Os marcadores genéticos mais utilizados na rotina forense estão presentes nos cromossomos autossomos, porém, os marcadores presentes nos cromossomos sexuais (X e Y) e no DNA mitocondrial auxiliam as análises de forma eficiente. Assim, os marcadores do cromossomo Y têm sido muito estudados, pois além do campo forense, estes possuem várias aplicações no campo evolucionário, como na compreensão da genética populacional e exploração da história da evolução humana. Duas categorias principais são atualmente utilizadas para examinar o cromossomo Y: loci bialélico (polimorfismos de nucleotídeo único – SNPs – e inserção Alu) e loci multialélico (minissatélites e microsatélites – STRs). SNPs possuem várias vantagens em relação aos STRs, principalmente com amostras degradadas ou em pequena quantidade, devido a sua alta frequência, simplicidade, menor tamanho e baixa taxa de mutação. Assim, visando à ampliação dos dados da população brasileira em relação aos marcadores genéticos, este estudo teve por objetivo identificar os maiores haplogrupos existentes na população do Estado do Espírito Santo e avaliar as contribuições de Africanos, Ameríndios e Europeus na sua formação, uma vez que esse estado recebeu imigrantes de várias origens. Para isso, foram estudados 35 Y-SNPs em 255 amostras de indivíduos do sexo masculino nascidos no Estado do Espírito Santo - Brasil. A genotipagem foi realizada por PCR seguida por minisequenciamento (SNaPshot Multiplex) e detecção por eletroforese capilar no analisador genético ABI3500 (Applied Biosystems by Life Technologies). Dos 38 haplogrupos possíveis de serem classificados com os 35 SNPs estudados, somente 19 foram detectados nesta amostragem. A diversidade de haplogrupos foi $0,7794 \pm 0,0229$ e o haplogrupo mais frequente foi o R1b1 seguido pelo I(xI2a2), G, J2 e E1b1a(xE1b1a4, E1b1a7). Na análise de distância genética, observou-se que a população do estado do Espírito Santo está mais próxima das populações Europeias e Latinas, estando mais distante das populações Africanas e das Asiáticas, e na classificação das linhagens paternas segundo a ancestralidade, observou-se uma maior contribuição europeia (85,88 %), seguida de africana (11,37 %) e ameríndia (2,75 %), corroborando com estudos anteriores realizados na população brasileira e

condizendo com o padrão de mistura genética no Brasil. Estes resultados permitiram a ampliação dos dados genéticos da população estudada em relação a tais marcadores, os quais, posteriormente, poderão alimentar um banco de dados da população brasileira, paralelamente ao internacional, viabilizando sua aplicação no contexto forense nacional.

Palavras-chave: Cromossomo Y. SNPs. SNaPshot. Espírito Santo. Brasil.

ABSTRACT

Human identification by DNA analysis uses the genetic profile of an individual studying a combination of markers inherited from their parents. The genetic markers most widely used in routine forensic are present in the autosomes, however, the markers present in sex chromosomes (X and Y) and mitochondrial DNA helps analysis efficiently. Thus, the Y chromosome markers have been widely studied because beyond the forensic field, they have several applications in the field of evolution, such as in the understanding of population genetics and exploitation of human evolutionary history. Two main categories are currently used to examine the Y chromosome: biallelic loci (single nucleotide polymorphisms - SNPs - and Alu insertion) and multiallelic loci (minisatellites and microsatellites - STRs). SNPs have several advantages over STRs, especially with degraded or in small quantities samples, due to its high frequency, simplicity, small size and low mutation rate. Thus, aiming to increase the data of the Brazilian population related to genetic markers, the objective of this study was to identify the major haplogroups existing in the population of Espírito Santo and evaluate the contribution of Africans, Amerindians and Europeans in their formation, since this state has received immigrants from various origins. For this purpose, 35 Y-SNPs in 255 blood samples from male individuals born in Espírito Santo State-Brazil. Genotyping was performed by PCR followed by minisequencing reaction (SNaPshot Multiplex) and detection by capillary electrophoresis on ABI3500 genetic analyzer (Applied Biosystems by Life Technologies). Of the 38 possible haplogroups to be classified with the 35 SNPs studied, only 19 were detected in this sample. The haplogroup diversity was 0.7794 ± 0.0229 and the most frequent haplogroup was R1b1 followed by I(xI2a2), G, J2 and E1b1a(xE1b1a4, E1b1a7). In the analysis of genetic distance, we observed that the population of Espírito Santo State is closer to European and Latin American populations, being more distant from African and Asian populations, and in the classification of paternal lineages according to their ancestry, there was a greater European contribution (85.88 %), followed by African (11.37 %) and Amerindian (2.75 %), confirming previous studies conducted in the Brazilian population and consistent to the pattern of genetic admixture in Brazil. These results allowed the expansion of the genetic data of the studied population in relation to these markers,

which then could feed a database of the Brazilian population, in addition to the international, allowing its use in national forensic context.

Keywords: Y Chromosome. SNPs. SNaPshot. Espirito Santo. Brazil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do cromossomo Y humano.....	19
Figura 2	Migrações e variações dos haplogrupos do cromossomo Y.....	21
Figura 3	Árvore filogenética do cromossomo Y gerada pelos SNPs analisados neste projeto.....	37
Figura 4	Estratégia utilizada no estudo dos 35 Y-SNPs.....	38
Figura 5	Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 9 SNPs do Multiplex I.....	42
Figura 6	Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 5 SNPs do Multiplex II.....	42
Figura 7	Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 13 SNPs do Multiplex E.....	43
Figura 8	Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 7 SNPs do Multiplex Q.....	43
Figura 9	Gel de agarose 0,8 % em TAE [1x], corado com BrEt.....	44
Figura 10	Frequência dos haplogrupos na população do Espírito Santo....	45
Figura 11	Análise multidimensional (MDS) da distância genética entre populações brasileiras, latinas, europeias, africanas e asiáticas.....	52
Figura 12	Classificação das amostras segundo a ancestralidade dos haplogrupos.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos <i>primers</i> para PCR do <i>Multiplex I</i>	30
Tabela 2	Sequência dos <i>primers</i> para PCR do <i>Multiplex II</i>	31
Tabela 3	Sequência dos <i>primers</i> para PCR do <i>Multiplex E</i>	32
Tabela 4	Sequência e concentração dos <i>primers</i> SBE para SNaPshot do <i>Multiplex I</i>	34
Tabela 5	Sequência e concentração dos <i>primers</i> SBE para SNaPshot do <i>Multiplex II</i>	34
Tabela 6	Sequência e concentração dos <i>primers</i> SBE para SNaPshot do <i>Multiplex E</i>	35
Tabela 7	Frequência relativa (%) dos haplogrupos em diferentes populações.....	48
Tabela 8	Diversidade de haplogrupos em várias populações.....	49
Tabela 9	Comparação entre 16 populações.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Base Nitrogenada Adenina
AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i>
BrEt	Brometo de Etídio
C	Base Nitrogenada Citosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
ddNTP	Dideoxynucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Eletroforese capilar
FCFAr-UNESP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista de Araraquara
F_{ST}	Distância genética
G	Base Nitrogenada Guanina
HEMOES	Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kb	Quilobase
Mb	Megabase
MDS	<i>Multidimensional Scaling</i>
ME	<i>Multiplex E</i>
MI	<i>Multiplex I</i>
MII	<i>Multiplex II</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MQ	<i>Multiplex Q</i>
NRY	<i>Non-recombinant Region of the Y Chromosome</i>

PAR	<i>Pseudoautosomal Region</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
rpm	Rotações por minuto
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SBE	<i>Single Base Extension</i>
SP	São Paulo
T	Base Nitrogenada Timina
TAE	Tris Acetato EDTA
U	Unidade
UEPs	<i>Unique-event Polymorphisms</i>
V	Volts
YCC	<i>Y-Chromosome Consortium</i>
Y-SNPs	<i>Y-Chromosome Single Nucleotide Polymorphisms</i>
Y-STRs	<i>Y-Chromosome Short Tandem Repeats</i>
μL	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Identificação Humana.....	17
1.2. Cromossomo Y.....	18
1.3. Marcadores do Cromossomo Y.....	19
1.4. Árvore filogenética do Cromossomo Y.....	20
1.5. Aplicações dos marcadores genéticos do Cromossomo Y.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Aspectos Éticos.....	28
3.2. Casuística.....	28
3.3. Extração do DNA.....	28
3.4. Tipagem de marcadores.....	29
3.4.1. Amplificação em multiplex.....	29
3.4.2. Purificação do produto de PCR.....	32
3.4.3. Reação de SNaPshot.....	33
3.4.4. Purificação do SNaPshot.....	35
3.4.5. Preparo das amostras para eletroforese capilar (EC).....	35
3.4.6. Classificação em haplogrupos.....	36
3.4.7. Verificação do SNP 12f2 em gel de agarose 0,8 %.....	38
3.5. Análise Estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Avaliação e considerações da metodologia de tipagem.....	41
4.2. Frequência dos haplogrupos encontrados.....	44

4.3. Diversidade de haplogrupos.....	49
4.4. Comparação entre populações.....	49
4.5. Ancestralidade dos haplogrupos.....	53
5. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO.....	65

1.1. Identificação Humana

A introdução das técnicas de biologia molecular na área de identificação humana é um avanço relativamente recente. A identificação humana pela análise do ácido desoxirribonucléico (DNA) tornou-se, com o tempo, uma ferramenta fundamental ao sistema judiciário, sendo atualmente um dos principais pilares das ciências forenses no que diz respeito ao apoio à investigação criminal e cível, compreendendo o estabelecimento de laços de parentesco e a identificação individual de pessoas e/ou vestígios.

A identidade é o conjunto de caracteres que individualizam uma pessoa ou uma coisa, fazendo-a distinta das demais; é um elenco de atributos que torna alguém ou alguma coisa igual apenas a si próprio (PINHEIRO, 2004). É o conjunto de caracteres físicos ou psíquicos, normais ou patológicos, que individualizam determinada pessoa (ALVES, 1965).

A identificação humana por DNA fundamenta-se na individualização biológica que cada ser humano representa e na exclusividade do seu perfil genético, apresentando, normalmente, igualdade e invariabilidade deste em todas as células do organismo ao longo da vida (PINHEIRO, 2004).

O perfil genético de um indivíduo utilizado para identificação humana, do ponto de vista médico-legal, pode ser definido como sendo o conjunto de características hereditárias ou padrões fenotípicos que um indivíduo possui, para um determinado número de marcadores genéticos, detectável em qualquer amostra biológica que lhe pertença (PINHEIRO, 2004). Estes marcadores correspondem a sequências de DNA que variam de um indivíduo para outro, denominadas regiões polimórficas. Os marcadores genéticos mais utilizados na rotina forense estão presentes nos cromossomos autossomos, porém, os marcadores presentes nos cromossomos sexuais (X e Y) e no DNA mitocondrial auxiliam as análises de forma eficiente (HOLLAND; PARSONS, 1999; BUDOWLE et al., 2003; PRINZ, 2003; SZIBOR et al., 2003; EDELMANN et al., 2004; MARTINS et al., 2010; PANETO et al., 2010; WALSH; REDD; HAMMER, 2008).

1.2. Cromossomo Y

O cromossomo Y possui muitas características que são únicas no genoma: ele não é essencial para a vida de um indivíduo (uma vez que sua ausência nas mulheres não é fatal), metade consiste de DNA satélites repetidos consecutivamente e a outra metade possui alguns genes, sendo que a maioria não recombina. No entanto, é por causa dessas particularidades que o cromossomo Y é uma ferramenta excelente para a investigação da evolução humana e apresenta funções especializadas na genética médica e forense (JOBILING; TYLER-SMITH, 2003).

Embora descrita como uma sequência finalizada, Skaletsky et al. (2003) relataram somente 23 Mb (Mega pares de bases) dos aproximados 50 Mb presentes no cromossomo Y humano (Figura 1). A porção de aproximadamente 30 Mb ainda não referida e não sequenciada é uma região da heterocromatina localizada no braço longo do cromossomo Y, varia no tamanho em homens fenotipicamente normais e não é transcrita, sendo composta de sequências altamente repetitivas. Já a região eucromática possui tamanho constante e engloba o braço curto do cromossomo Y, o centrômero e o braço proximal longo, sendo composta de quatro classes de sequências: blocos de sequências que são homólogas ao cromossomo X, incluindo o material no final do braço curto do cromossomo Y; sequências repetitivas ao redor do centrômero; famílias de sequências repetitivas Y-específicas e sequências de cópia única Y-específicas (HAMMER; ZEGURA, 1996).

A região não-recombinante do cromossomo Y (NRY – *Non-recombinant Region of the Y Chromosome*) é a única parte do cromossomo Y que exibe herança paterna clássica e possui os marcadores de interesse no estudo de patrilinhagem. A NRY representa todo o cromossomo Y, exceto as 2 pequenas regiões que apresentam homologia com o cromossomo X que são denominadas pseudo-autossômicas (PAR – *Pseudoautosomal Region*) e estão localizadas nas extremidades do braço curto (PAR1 – 2,5 Mb) e do braço longo (PAR2 – 1 Mb) do cromossomo Y (GRAVES; WAKEFIELD; TODER, 1998). A homologia existente entre o cromossomo Y e o X permite o pareamento e a recombinação normal entre estes nas regiões pseudo-autossômicas (BRADMAN; THOMAS, 1998).

Figura 1 – Estrutura do cromossomo Y humano. Regiões pseudo-autossômicas (em preto), heterocromatina (em cinza) e porção sequenciada por Skaletsky et al., 2003 (em branco).



Fonte: Figura de Charlesworth, 2003.

Acredita-se que os cromossomos X e Y tenham sido derivados de um par homólogo de autossomos em um vertebrado antecessor há cerca de 300 milhões de anos (GRAVES, 1995). Os proto-X e proto-Y de mamíferos iniciais eram provavelmente pequenos, de tamanhos similares. Graves (1995) apresentou um modelo interessante para descrever sua evolução subsequente, o que levou aos cromossomos sexuais heteromórficos de mamíferos modernos como um par X-Y em humanos. De acordo com sua hipótese, a mesma sequência de eventos genéticos ocorreu repetidamente: (1) adição de segmentos autossomais a região do braço curto do X, (2) recombinação destes segmentos com a região pseudo-autossômica no braço curto do Y, efetuando a transferência deste material genético para o cromossomo Y, (3) rearranjos no Y isolaram alguns dos seus genes de outras recombinações, e (4) progressivas deleções e mutações causaram o encurtamento do cromossomo Y ao seu tamanho atual de 50 Mb em humanos. Assim, as regiões pseudo-autossômicas no braço curto do cromossomo X humano meramente refletem a última relíquia da adição mais recente.

1.3. Marcadores do Cromossomo Y

No cromossomo Y, duas categorias principais dos marcadores de DNA têm sido utilizadas: *loci* bialélico, o qual exibe dois possíveis alelos, e *loci* multialélico. Resultados da tipagem de marcadores bialélicos são classificados em haplogrupos enquanto resultados multialélicos são caracterizados como haplótipos (DE KNIJFF, 2000).

Os marcadores multialélicos incluem 2 minissatélites e várias centenas de marcadores de regiões de repetições consecutivas curtas (Y-STRs – *Y-Chromosome Short Tandem Repeats*) (KAYSER et al., 2004; BUTLER, 2005). Esses *loci* multialélicos podem ser usados para diferenciar haplótipos do cromossomo Y com alta resolução devido a sua alta taxa de mutação (KAYSER et al., 2000). Regiões curtas repetitivas (STRs) consistem em repetições consecutivas de unidades constituídas por 2 a 7 pb (BUTLER, 2011).

Já os marcadores bialélicos incluem polimorfismos de nucleotídeo único (Y-SNPs – *Y-Chromosome Single Nucleotide Polymorphisms*) e uma inserção do elemento Alu, e são algumas vezes chamados de polimorfismos de evento único (UEPs – *Unique-event Polymorphisms*) devido as suas baixas taxas de mutação (BUTLER, 2005). SNPs são substituições de base, inserções ou deleções que ocorrem em posições únicas no genoma de qualquer organismo (BUDOWLE; VAN DAAL, 2008), possuem uma baixa taxa de mutação (2×10^{-8} por base por geração) (THOMSON et al., 2000) e são frequentemente considerados eventos únicos na evolução humana (JOBILING, 2001). O conjunto de haplótipos, definidos através do estudo de polimorfismos que constituem acontecimentos únicos (SNPs), é denominado haplogrupo.

1.4. Árvore filogenética do Cromossomo Y

As pesquisas e as aplicações dos marcadores do cromossomo Y têm tido um grande crescimento nos últimos anos. Em 2002, o *Y-Chromosome Consortium* (YCC), acessado em <http://ycc.biosci.arizona.edu/>, publicou um artigo no qual foi descrita uma árvore parcimoniosa de 153 haplogrupos, relacionando 245 polimorfismos binários entre si, e correlacionando sete nomenclaturas diferentes na definição dos haplogrupos. Neste processo, um novo método de classificação da nomenclatura dos haplogrupos do cromossomo Y foi sugerido; estes foram agrupados em clados, denominados por letras maiúsculas de A-R, que se dividem em subgrupos, os subclados. Para casos em que não foram tipados todos os marcadores dentro de um clado, foi introduzido um sistema de nomenclatura que inclui o “x” (para “excluindo”) mais as subdivisões do haplogrupo que foram testadas e se mostraram ausentes, por exemplo I(xI2a2): esta amostra foi classificada como pertencente ao haplogrupo I, exceto no subhaplogrupo testado, I2a2. A criação de

uma nomenclatura comum e unificada foi um grande apoio à comunidade pesquisadora do cromossomo Y, pois permitiu a classificação sistemática e não ambígua de novos haplogrupos que fossem descobertos.

Relatou-se, posteriormente, que a maioria dos haplogrupos pertencentes a cada um desses maiores clados tendem a ser confinados em continentes específicos (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003); então, esta distribuição geográfica pode ser usada para fazer inferências sobre a possível origem geográfica de qualquer amostra de interesse (Figura 2). Em um cenário forense, isto pode servir como uma ferramenta para prever a origem de uma linhagem paterna de qualquer vestígio biológico masculino (BRIÓN et al., 2005b).

Figura 2 – Migrações e variações dos haplogrupos do cromossomo Y



Fonte: <http://www.dnaroottester.com/index.php?p=conteudo&id=16>.

Levando em consideração a estrutura hierárquica dos Y-SNPs, para serem informativos em estudos forenses e evolucionários, eles devem ser analisados em duas ou mais etapas, começando dos ramos mais basais da árvore filogenética para especificar o principal clado, e então prosseguir ao longo dos ramos até o mais específico, para identificar os haplogrupos dentro de cada clado principal (BRIÓN et al., 2005b).

Mais recentemente, Karafet et al. (2008) publicaram novos polimorfismos e após exaustiva revisão da árvore proposta para o cromossomo Y, propuseram um total de 311 haplogrupos distintos, incluindo dois novos haplogrupos principais (S e T) e incorporando aproximadamente 600 marcadores binários.

1.5. Aplicações dos marcadores genéticos do Cromossomo Y

A comunidade forense tem aumentado seu interesse particularmente nos Y-SNPs por várias razões: primeiro, os SNPs são os mais frequentes tipos de polimorfismos; segundo, por causa de sua simplicidade, SNPs podem ser analisados a partir de uma pequena quantidade de DNA em pequenos fragmentos e são identificados facilmente em análises com tecnologias de automação; terceiro, a baixa taxa de mutação permite seu uso no teste de paternidade.

Os Y-SNPs possuem várias aplicações em testes de identificação humana, incluindo as análises forenses em casos de agressão sexual ou casos complexos de paternidade em que o suposto pai está ausente e analisa-se seu ascendente ou descendente masculino, pois em ambas as situações é possível a obtenção da linhagem masculina (JOBBLING; PANDYA; TYLER-SMITH, 1997; JOBLING, 2001). Mesmo apresentando somente dois alelos, e assim, dois indivíduos poderão compartilhar o mesmo haplótipo para um conjunto de SNPs, sem estarem aparentados ou relacionados à cena do crime, tais marcadores são muito úteis em casos forenses para verificar a exclusão de um indivíduo.

A presença de somente dois alelos em adição à ausência de recombinação e à distribuição de linhagens do cromossomo Y altamente específica nas populações, encontrada no cromossomo Y, torna necessária a análise de um grande número de Y-SNPs (BRIÓN et al., 2004; SOBRINO; BRIÓN; CARRACEDO, 2005) em um processo de identificação humana. No entanto, combinados com os marcadores STR convencionais, estes constituem uma ferramenta poderosa em situações de desastres em massa, em que pessoas de várias áreas geográficas estão envolvidas (BOUAKAZE et al., 2007).

A afiliação geográfica dos Y-SNPs torna-os atrativos para os fins forenses, quando o conhecimento da afiliação geográfica pode ajudar na identificação pessoal. Em desastres de massa, incluindo quedas de avião ou acidentes de navio, quando os corpos das vítimas a serem identificadas estão danificados por trauma ou

putrefação e pessoas de várias áreas geográficas estão envolvidas, a detecção de haplogrupos que são específicos ou mais frequentes em certas áreas geográficas representa uma contribuição poderosa na investigação forense (ONOFRI et al., 2006).

Outra aplicação é na genética médica como a investigação de genes presentes no cromossomo Y que têm sido relacionados com a infertilidade masculina (JOBILING; TYLER-SMITH, 2000).

A baixa taxa de mutação, herança somente paterna e ausência de recombinação dos Y-SNPs, também, os fazem particularmente importantes na compreensão da genética populacional, na identificação de linhagens paternas estáveis e na reconstrução de um estado ancestral para a exploração da história da evolução humana, assim como na análise das relações evolutivas entre diferentes grupos de indivíduos (HAMMER, 1995; ONOFRI et al., 2006).

Uma vez que o cromossomo Y passa de pais para filhos sem alterações, excetuando a gradual acumulação de mutações, significa que a porção não-recombinante do cromossomo Y de um homem representa a história única de sua linhagem patrilinea e contém um registro de eventos mutacionais que ocorreram ao longo da evolução em toda a linhagem (HAMMER; ZEGURA, 1996). Assim, o anseio pelo entendimento da história da humanidade e os padrões de migração através do tempo têm preenchido muitos dos desenvolvimentos dos marcadores de cromossomo Y, particularmente na área de Y-SNP.

Sabe-se que a população brasileira é uma das populações mais heterogêneas do mundo. A questão que surge então é quanto os diferentes grupos – Ameríndios, Europeus e Africanos – realmente contribuíram para o “pool” genético dos brasileiros de hoje? (CARVALHO-SILVA et al., 2001). Assim, estudos genéticos têm sido utilizados para adquirir pegadas destes eventos demográficos na população brasileira (SILVA et al., 2006).

Além disso, os SNPs têm sido amplamente utilizados no campo forense e antropológico, pois o material biológico disponível nestes é geralmente muito degradado e em pequenas quantidades. Assim, a análise de tais amostras usando tipagem STR convencional pode falhar na resolução de perfis informativos, situações estas em que a análise dos SNPs complementa de forma muito eficiente os marcadores tradicionais (BUDOWLE; VAN DAAL, 2008).

Muitas tecnologias estão disponíveis, atualmente, para a genotipagem de SNPs, como Pirosequenciamento, Hibridização e Espectrometria de Massas (CHEN; SULLIVAN, 2003; SOBRINO; BRIÓN; CARRACEDO, 2005). Neste estudo, foi selecionado a genotipagem por minisequenciamento, conhecida também por SNaPshot e amplamente utilizada em laboratórios de identificação humana (BRIÓN et al., 2005b; ONOFRI et al., 2006; BOUAKAZE et al., 2007). Esta técnica consiste na extensão de uma única base (SBE – *single base extension*), um dideoxynucleotídeo (ddNTP) marcado com fluoróforo, que se anela ao SNP de interesse a partir de um *primer* não marcado.

Como apresentado, o potencial dos marcadores genéticos do cromossomo Y tem sido amplamente explorado pela genética populacional e forense com um futuro promissor para o crescimento contínuo das pesquisas e aplicações dos Y-SNPs (BUTLER, 2005). No entanto, o Brasil, com sua enorme população, possui poucos trabalhos até o momento (CARVALHO-SILVA et al., 2001; ABE-SANDES; SILVA; ZAGO, 2004; SILVA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2008; DE AZEVEDO et al., 2009; GUERREIRO-JUNIOR et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; SÃO-BENTO et al., 2009), não sendo encontrado nenhum trabalho com a população do Espírito Santo.

Tendo em vista a amplitude de aplicações e a necessidade de avaliações prévias dos marcadores do cromossomo Y nas diferentes populações, constata-se que mais estudos devem ser realizados com tais marcadores no Brasil, a fim de compilar informações, viabilizando sua aplicação no contexto forense nacional.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- Identificar os principais haplogrupos do cromossomo Y presentes na população brasileira do Estado do Espírito Santo e, assim, auxiliar na caracterização desta população e fornecer mais uma ferramenta útil para a investigação forense.
- Ampliar os dados da população brasileira em relação aos marcadores genéticos, avaliando as contribuições de Africanos, Ameríndios e Europeus na formação da população brasileira do Estado do Espírito Santo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista de Araraquara (FCFAR-UNESP) (CEP/FCF/CAr n.12/2010) (Anexo A).

3.2. Casuística

Foram utilizadas 255 amostras de sangue de indivíduos do sexo masculino e os únicos critérios de inclusão foram os indivíduos serem nascidos no Estado do Espírito Santo e não aparentados. A coleta do material biológico (sangue) foi realizada no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo – HEMOES, no momento da triagem dos doadores. As demais etapas desse projeto foram realizadas no Laboratório de Investigação de Paternidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara – SP.

3.3. Extração do DNA

A amostra sanguínea foi coletada em papel FTA (Whatman) e até o momento da extração, os cartões FTA foram mantidos à temperatura ambiente. Para a extração do DNA das amostras de sangue, dois discos de 1,2 mm de papel FTA foram cortados utilizando *Harris Micro Punche e Cutting Mat* e o DNA foi extraído utilizando a resina Chelex (SINGER-SAM; TANGUAY; RIGGS, 1989) conforme protocolo que segue:

Protocolo:

Em tubo de 1,5 mL, colocaram-se 2 discos de papel com sangue, adicionou-se 50 µL de água e vortexou-se. Em seguida, a água foi descartada, adicionou-se mais 50 µL de água e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos. Após isso, a amostra foi centrifugada por 1 minuto (14.000 rpm) e em seguida, descartada a água. Adicionou-se, então, 100 µL de chelex 5 % e incubou-se por 1 hora a 56 °C. Em seguida, a amostra foi vortexada e incubada por 8 minutos a 100 °C. Para finalizar, centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido

para um novo microtubo, o qual foi mantido a 4 °C para posterior utilização na reação de amplificação.

3.4. Tipagem de marcadores

Foram genotipados 35 marcadores bialélicos (Y-SNPs) em quatro sistemas *multiplex*: *Multiplex I* (MI) (92R7, M70, M22, Tat, P25, SRY10831, M173, M213, M9), *Multiplex II* (MII) (M26, M62, M170, M172, M201, 12f2), ambos descritos por Brión et al. (2005b); *Multiplex E* (ME) (M96, M33, P2, M2, M154, M191, M35, M78, M81, M123, V6, M293, M85) descrito por Gomes et al. (2010) e *Multiplex Q* (MQ) (M242, P36.2, M346, M3, M19, M194, M199) descrito por Gusmão et al. (dados não publicados). As sequências dos primers do *Multiplex Q* podem ser obtidas diretamente com os autores (Leonor Gusmão: lgusmao@ipatimup.pt).

3.4.1. Amplificação em multiplex

As amplificações por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram realizadas utilizando as mesmas condições descritas por Gomes et al. (2010). A PCR foi realizada utilizando Qiagen *Multiplex Kit* (Qiagen), conforme protocolo que segue:

Protocolo PCR Qiagen *Multiplex Kit* (por amostra):

Master Mix: 5,0 µL

Água ultrapura (Milli-Q) autoclavada: 3,5 µL

Primer Mix: 1,0 µL (inclui todos os *primers* a uma concentração de 2 µM; a sequência destes pode ser encontrada nas tabelas 1, 2 e 3)

Solução resultante da extração com Chelex: 0,5 µL

Ciclagem PCR:

95 °C – 15 minutos

94 °C – 30 segundos

60 °C – 90 segundos

72 °C – 60 segundos

72 °C – 10 minutos

} 35x

Tabela 1 – Sequência dos *primers* para PCR do *Multiplex I*

SNP	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA (5' - 3')
92R7	<i>Forward</i>	TGCATGAACACAAAAGACGTA
	<i>Reverse</i>	GCATTGTTAAATATGACCAGC
M70	<i>Forward</i>	TCATAGCCCACTATACTTTGGAC
	<i>Reverse</i>	CTGAGGGCTGGACTATAGGG
M22	<i>Forward</i>	GCTGATAGTCCTGGTTTCCCTA
	<i>Reverse</i>	TGAGCATGCCTACAGCAGAC
Tat	<i>Forward</i>	GACTCTGAGTGTAGACTTGTGA
	<i>Reverse</i>	GAAGGTGCCGTAAAAGTGTGAA
P25	<i>Forward</i>	GGACCATCACCTGGGTAAAGT
	<i>Reverse</i>	AGTGCTTGTCCAAGGCAGTA
SRY10831	<i>Forward</i>	TCCTTAGCAACCATTAATCTGG
	<i>Reverse</i>	AAATAGCAAAAAGTACACAAGGC
M173	<i>Forward</i>	GCACAGTACTCACTTTAGGTTTGC
	<i>Reverse</i>	GCAGTTTTCCAGATCCTGA
M213	<i>Forward</i>	GGCCATATAAAAACGCAGCA
	<i>Reverse</i>	TGAATGGCAAATTGATTCCA
M9	<i>Forward</i>	GCAGCATATAAAAAGTTCAGG
	<i>Reverse</i>	AAAACCTAACTTTGCTCAAGC

Fonte: Brión et al., 2005b.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* para PCR do *Multiplex II*

SNP	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA (5' - 3')
12f2	<i>Forward</i>	CACTGACTGATCAAAATGCTTACAGAT
	<i>Reverse</i>	GGATCCCTTCCTTACACCTTATACA
M201	<i>Forward</i>	TCAAATTGTGACACTGCAATAGTT
	<i>Reverse</i>	CATCCAACACTAAGTACCTATTACGAA
M26	<i>Forward</i>	AGCAGAAGAGACCAAGACAGC
	<i>Reverse</i>	GACGAAATCTGCAGCAAAAA
M170	<i>Forward</i>	TGCAGCTCTTATTAAGTTATGTTTTCA
	<i>Reverse</i>	CCAATTACTTTCAACATTTAAGACC
M172	<i>Forward</i>	TCCTCATTACCTGCCTCTC
	<i>Reverse</i>	TCCATGTTGGTTTGGAACAG
M62	<i>Forward</i>	ACTAAAACACCATTAGAAACAAAGG
	<i>Reverse</i>	CTGAGCAACATAGTGACCCC

Fonte: Brión et al., 2005b.

Tabela 3 – Sequência dos *primers* para PCR do *Multiplex E*

SNP	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA (5' - 3')
M96	<i>Forward</i>	GTGATGTGTAACCTTGGAAAACAGG
	<i>Reverse</i>	GGACCATATATTTTGCCATAGGTT
M33	<i>Forward</i>	CACAACTTCATTGGCTACGG
	<i>Reverse</i>	GTTGAAGCCCCCAAGAGAGAC
P2	<i>Forward</i>	GCTCCAGCCATCTTTTCCTTA
	<i>Reverse</i>	CTTCTCTCATGAGGGTTTTGGA
M2	<i>Forward</i>	AAGTCCAGACCCAGGAAGGT
	<i>Reverse</i>	ACAGCTCCCCCTTTATCCTC
M154	<i>Forward</i>	TACTCACACAAACCAAGAAGAAACA
	<i>Reverse</i>	AACCATTGTGTTACATGGCCTA
M191	<i>Forward</i>	AAAATGGAGTGTTTATCAGAGCTT
	<i>Reverse</i>	CCCAGACACACCAAATATCTC
M35	<i>Forward</i>	GCATGGTCCCTTTCTATGGAT
	<i>Reverse</i>	GAGAATGAATAGGCATGGGTTT
M78	<i>Forward</i>	GGATGGCTGTATGGGTTTCT
	<i>Reverse</i>	ATAGTGTTCCCTTACCTTTCTT
M81	<i>Forward</i>	GCACTATCATACTCAGCTACACATCTC
	<i>Reverse</i>	AACCATTGTGTTACATGGCCTA
M123	<i>Forward</i>	TGCTCTCAGGGGAAAATCTG
	<i>Reverse</i>	AGCAAAGTTGAGGTTGCACA
V6	<i>Forward</i>	GATGGCACAGTGTTTCGACAG
	<i>Reverse</i>	CTTCTCTCCAAATGCCTGCT
M293	<i>Forward</i>	AAAGAGATTGATCGGTGCATA
	<i>Reverse</i>	GCTGGCTAATACTTCCACAGAG
M85	<i>Forward</i>	TGGCATCCAATACTAGCTGATAAAC
	<i>Reverse</i>	AATGCTCACGCTTGTGTTCT

Fonte: Gomes et al., 2010.

3.4.2. Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado previamente à realização da reação de SNaPshot para retirada dos nucleotídeos não incorporados e excesso de *primers*.

Para isso, adicionou-se 0,5 μL de EXOSAP-IT (GE Healthcare) a 1 μL de produto de PCR, incubou-se a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e procedeu-se com a desnaturação da enzima a 85 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

3.4.3. Reação de SNaPshot

As reações de SNaPshot foram realizadas utilizando o SNaPshot *Multiplex* kit (Applied Biosystems by Life Technologies), seguindo as mesmas condições descritas por Gomes et al. (2010) conforme segue:

- Protocolo SNaPshot *Multiplex* Kit para MI, ME e MQ (por amostra):

SNaPshot *Mix*: 1,0 μL

Água ultrapura (Milli-Q) autoclavada: 1,5 μL

Primer SBE *Mix*: 1,0 μL (as sequências e a concentração dos *primers* utilizados podem ser encontradas nas Tabelas 4 e 6)

PCR purificada: 1,5 μL

Ciclagem SNaPshot:

96 $^{\circ}\text{C}$ – 10 segundos	} 25x
50 $^{\circ}\text{C}$ – 5 segundos	
60 $^{\circ}\text{C}$ – 30 segundos	

- Protocolo SNaPshot *Multiplex* Kit para MII (por amostra):

SNaPshot *Mix*: 1,0 μL

Água ultrapura (Milli-Q) autoclavada: 1,0 μL

Primer SBE *Mix*: 1,5 μL (as sequências e a concentração dos *primers* utilizados podem ser encontradas na Tabela 5)

PCR purificada: 1,5 μL

Ciclagem SNaPshot:

96 $^{\circ}\text{C}$ – 10 segundos	} 25x
50 $^{\circ}\text{C}$ – 5 segundos	
60 $^{\circ}\text{C}$ – 30 segundos	

Tabela 4 – Sequência e concentração dos *primers* SBE para SNaPshot do *Multiplex I*

SNP	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA (5' – 3')	Conc. (µM)
92R7	<i>Reverse</i>	CCCCGCATGAACACAAAAGACGTAGAAG	0,20
M70	<i>Reverse</i>	CCCCCCCCTAGGGATTCTGTTGTGGTAGTCTTAG	0,15
M22	<i>Forward</i>	CGCCATTCTGGTGGCTCT	0,10
Tat	<i>Reverse</i>	CCCCCCCCCCCCCCCCCTCTGAAATATTAATTAACAAC	0,20
P25	<i>Forward</i>	CCCCCCTCTGCCTGAAACCTGCCTG	0,15
SRY10831	<i>Forward</i>	CCCCCCTTGTATCTGACTTTTTTCACACAGT	0,20
M173	<i>Forward</i>	CCCCCCCCCCTTACAATTCAAGGGCATTTAGAAC	0,20
M213	<i>Reverse</i>	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTCAGAACTTAAAACATCTCGTTA C	0,25
M9	<i>Forward</i>	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGAAACGGCCTAAGATGGT TGAAT	0,20

Fonte: Brión et al., 2005b.

Tabela 5 – Sequência e concentração dos *primers* SBE para SNaPshot do *Multiplex II*

SNP	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA (5' – 3')	Conc. (µM)
M201	<i>Forward</i>	CCCCCCCCCCCCCGATCTAATAATCCAGTATCAACTGAGG	0,05
M26	<i>Reverse</i>	CCCCCCCCCCCCCATAGGCCATTTCAGTGTCTCTG	0,25
M170	<i>Reverse</i>	ACACAACCCACACTGAAAAAA	0,45
M172	<i>Forward</i>	CCCCCCCCCCCCCAAACCCATTTTGATGCTT	0,10
M62	<i>Reverse</i>	CCCCCCCAATGTTTGTGGCCATGGA	0,50

Fonte: Brión et al., 2005b.

Tabela 6 – Sequência e concentração dos *primers* SBE para SNaPshot do *Multiplex E*

SNP	ORIENTAÇÃO	SEQUÊNCIA (5' – 3')	Conc. (µM)
M96	<i>Forward</i>	CCCCCCCCCGTAACTTGGAAAACAGGTCTCTCATAATA	0,03
M33	<i>Reverse</i>	GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACAGTTACAAAAGTATAATAT GTCTGAGAT	0,10
P2	<i>Forward</i>	GCCCCTAGGAGGAGAA	0,04
M2	<i>Reverse</i>	GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAATTTATCCTCCACAGATCTCA	0,08
M154	<i>Reverse</i>	AAACATGGCCTATAATATTCAGTACA	0,04
M191	<i>Forward</i>	GGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACATTTTTTTCTTTACAACCTT GACTA	0,11
M35	<i>Reverse</i>	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGTCTCTGCCTGTGTC	0,44
M78	<i>Forward</i>	CCCCCCCCCACAACCTTAACAAAGATACTTCTTTC	0,44
M81	<i>Forward</i>	CCCCCTAAATTTTGTCTTTTTTTGAA	0,44
M123	<i>Reverse</i>	TAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAATTCTAGGTATTCAGGCG ATG	0,11
V6	<i>Forward</i>	GCCACGTCGTGAAAGTCTGACAATGCTGTGATTCTGATGTG	0,07
M293	<i>Forward</i>	AAAGAGATTGATCGGTGCATA	0,04
M85	<i>Reverse</i>	CTTGTGTTCTATTAAGTGTAGTTTTGTTAG	0,04

Fonte: Gomes et al., 2010.

3.4.4. Purificação do SNaPshot

Os produtos da reação foram purificados por tratamento enzimático para retirada dos dideoxynucleotídeos não incorporados, adicionando-se 1 U de SAP (fosfatase alcalina de camarão – GE Healthcare) ao produto final, seguido de incubação a 37 °C por 60 minutos e desnaturação da enzima a 85 °C por 15 minutos.

3.4.5. Preparo das amostras para eletroforese capilar (EC)

A detecção foi realizada por eletroforese capilar no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems by Life Technologies) e a análise dos eletroferogramas foi efetuada com o software GeneMapper ID-X v.1.2 (Applied Biosystems by Life Technologies), determinando-se o tamanho dos fragmentos baseado no padrão de peso Gene Scan-120 Liz (Applied Biosystems by Life Technologies). O preparo das amostras foi realizado conforme segue:

0,5 µL de padrão interno de corrida Gene-Scan-120 LIZ (Applied Biosystems by Life Technologies)

9,0 µL de Hi-Di *Formamide* (Applied Biosystems by Life Technologies)

0,5 µL do SNaPshot purificado

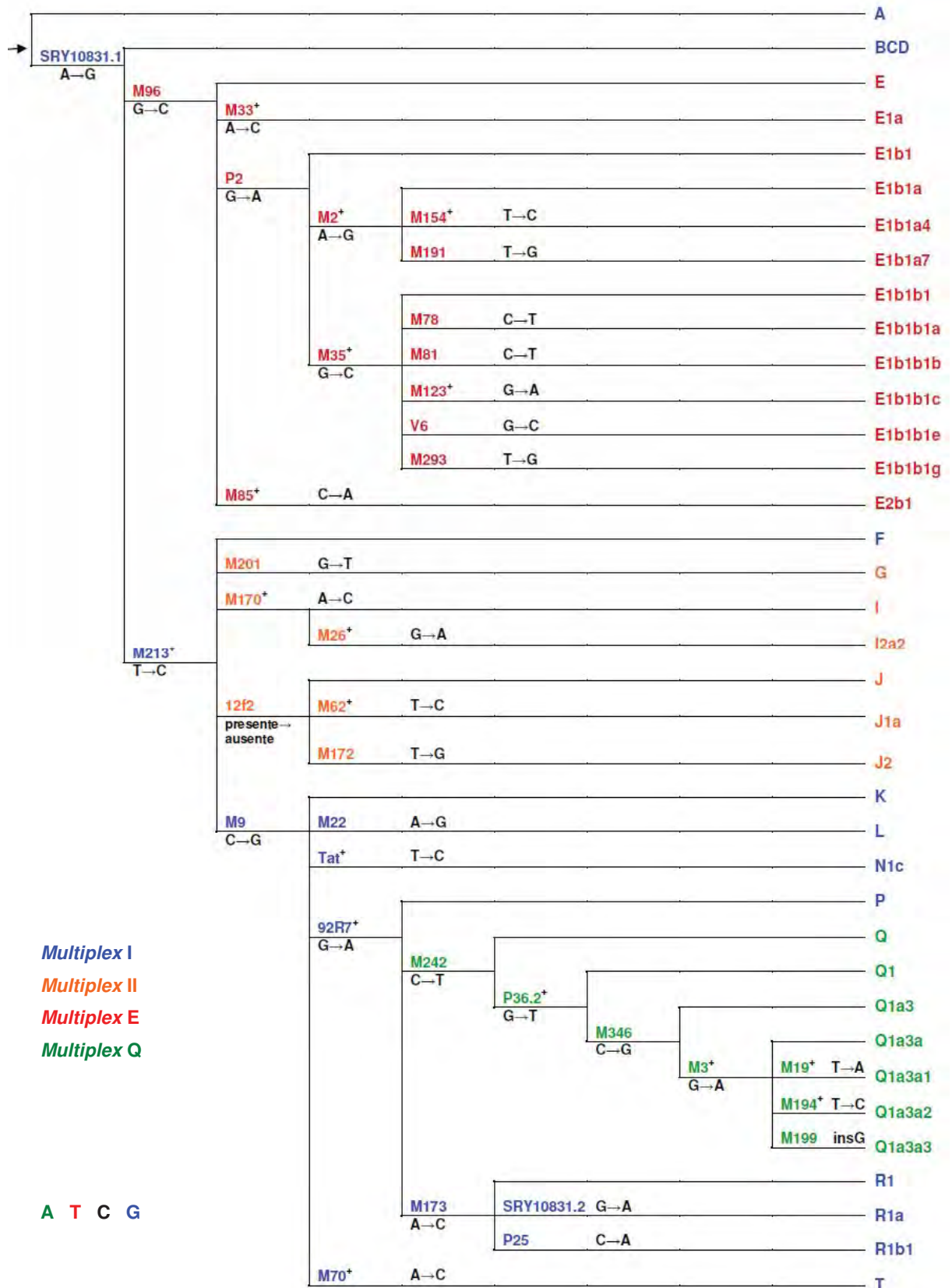
As amostras foram então colocadas em uma placa de 96 poços (Applied Biosystems by Life Technologies), desnaturadas a 95 °C por 3 minutos e colocadas imediatamente no gelo. Utilizou-se capilar de 50 cm (Applied Biosystems by Life Technologies) e polímero POP-7 (Applied Biosystems by Life Technologies) para eletroforese capilar.

3.4.6. Classificação em haplogrupos

Neste trabalho são analisados 35 SNPs (*Multiplex* I, II, E e Q) que permitem a distinção de 38 haplogrupos, segundo a árvore filogenética abaixo (Figura 3). A nomenclatura dos haplogrupos foi determinada segundo Karafet et al. (2008) e, como se pode observar, os *multiplexes* E e Q são utilizados na subdivisão dos haplogrupos E e Q, respectivamente.

Para classificação de uma amostra no respectivo haplogrupo, iniciou-se a análise pelo SNP SRY10831.1 e seguiu-se, baseado nos alelos de cada SNP na amostra até o haplogrupo correspondente. Na leitura do *multiplex* I, a análise iniciou-se no SNP SRY10831.1 sendo esta classificada no haplogrupo A se apresentasse o alelo ancestral (adenina). No entanto, se apresentasse o alelo derivado (guanina) neste SNP, seguia-se na chave sendo verificado o SNP seguinte, M213. Neste SNP, se a amostra apresentasse seu alelo ancestral (timina), seria classificada como pertencente ao macrohaplogrupo BCDE e, se apresentasse o alelo derivado (citosina) seguia-se na chave sendo verificado o próximo SNP, o M9. Se a amostra apresentasse o alelo ancestral (citosina) neste SNP, esta seria classificada no haplogrupo F e se apresentasse o alelo derivado (guanina), classificaria-se no haplogrupo K. Após, seguia-se na chave verificando os SNPs seguintes de acordo com o explicado anteriormente. Para todos os *multiplexes* deve ser utilizada a mesma técnica aqui apresentada para leitura da árvore filogenética (Figura 3).

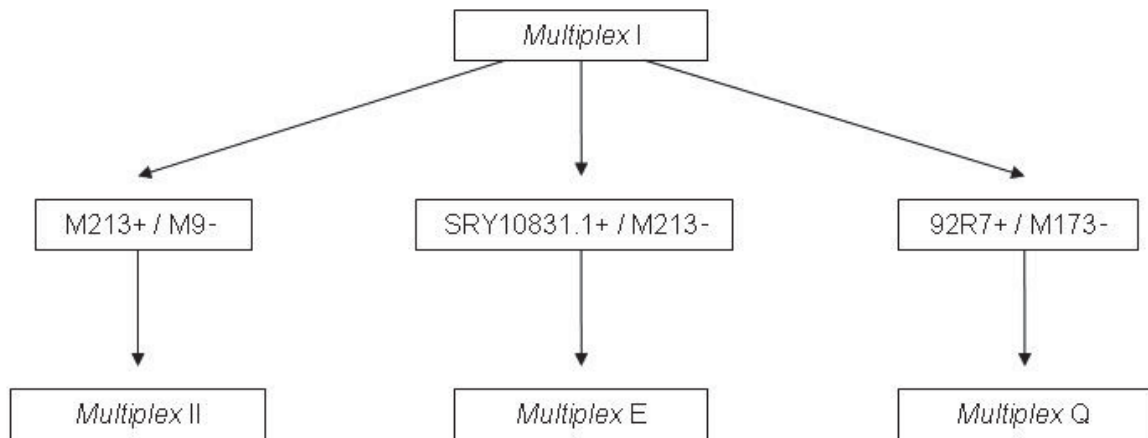
Figura 3 – Árvore filogenética do cromossomo Y gerada pelos SNPs analisados neste projeto. Em frente aos SNPs estão as possíveis bases apresentadas pelo marcador. (+) indica a utilização do *primer* reverso e, assim, deve-se ler a base complementar nessas posições.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para estudo destes SNPs foi, então, utilizada uma estratégia que consistia em: primeiramente, todas as amostras foram analisadas quanto ao *Multiplex I*, e quando apresentavam o alelo derivado (citosina) do SNP M213 e o alelo ancestral do SNP M9 (citosina), foi então realizado o *Multiplex II* para a classificação da amostra nos clados pertencentes a este segundo sistema (G, I ou J). Caso apresentassem, na análise do *Multiplex I*, o alelo derivado no SNP SRY10831.1 (guanina) e o alelo ancestral do SNP M213 (timina), estas amostras eram classificadas no macrohaplogrupo BCDE, sendo então utilizado o *Multiplex E* para verificar a possibilidade de classificação destas amostras em uma das subdivisões do haplogrupo E. Quando as amostras apresentavam o alelo derivado do SNP 92R7 (adenina) e o alelo ancestral do SNP M173 (adenina), na análise do *Multiplex I*, foi então utilizado o *Multiplex Q* para verificar se estas amostras poderiam ser classificadas em uma das subdivisões do haplogrupo Q (Figura 4).

Figura 4 – Estratégia utilizada no estudo dos 35 Y-SNPs. (+): presença do alelo derivado; (-): presença do alelo ancestral.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4.7. Verificação do SNP 12f2 em gel de agarose 0,8 %

O *Multiplex II* inclui o SNP 12f2, o qual pode estar presente (estado ancestral) ou ausente (estado derivado) no indivíduo analisado.

Para verificação de tal SNP, foi realizada a PCR *monoplex*, segundo protocolo já descrito com os *primers forward* e *reverse* a 2 μ M na reação. Posteriormente, 5 μ L do produto da PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 0,8 %, por 27 minutos a 100 V (volts) na Cuba *Horizon* 58, Modelo 200 (Gibco). A banda

obtida foi comparada às aquelas do marcador *O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus* - 75-20000 pb (Fermentas) após coloração com 1 µL de Brometo de Etídio (BrEt) (Gibco). O gel foi visualizado e fotografado no analisador de imagens Alphalmager® EP (Alpha Innotec).

3.5. Análise Estatística

Após obtenção dos perfis, as frequências dos haplogrupos e as proporções de Europeus, Africanos e Ameríndios na população estudada foram determinadas pelo método de contagem direta.

A diversidade de haplogrupos na população estudada, a análise da variância molecular (AMOVA - *Analysis of Molecular Variance*) e a distância genética (F_{ST}) entre a população do Espírito Santo - Brasil e outras populações com dados publicados na literatura foram determinadas com o auxílio do software Arlequin v. 3.11 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). Análise de escalonamento multidimensional (MDS) (KRUSKAL; WISH, 1978) foi realizada com os dados de distância genética através do software SPSS v.17.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

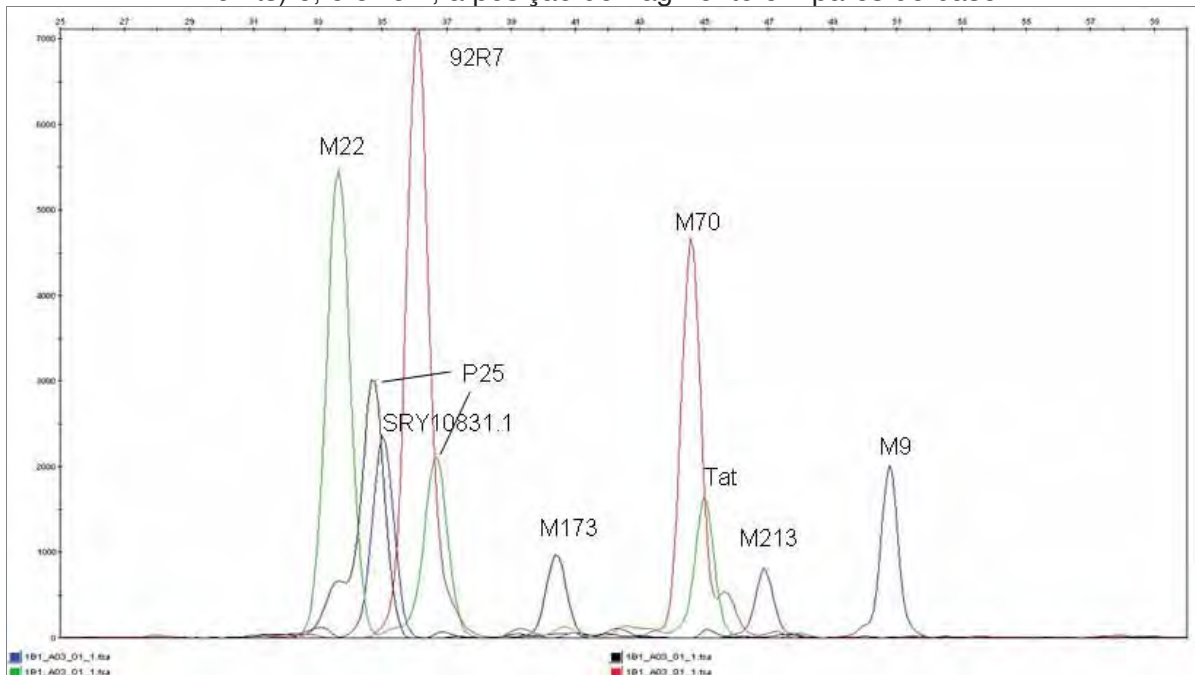
4.1. Avaliação e considerações da metodologia de tipagem

Das 255 amostras analisadas, 129 foram classificadas ao respectivo haplogrupo utilizando apenas o *Multiplex I*, 70 necessitaram também do *Multiplex II*, 49 do *Multiplex E* e 7 do *Multiplex Q*. Esta análise hierárquica evita a desnecessária extensa tipagem de SNPs, economizando tempo, custos e DNA alvo.

Os eletroferogramas dos *Multiplexes I, II, E e Q* obtidos no analisador genético ABI3500 estão apresentados nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente. O *Multiplex I* é uma combinação de 9 SNPs, no entanto, nos resultados do SNaPshot, podem ser encontrados 9 ou 10 picos (Figura 5) em algumas amostras, pois dois destes SNPs apresentam sequências parálogas variantes, P25 e 92R7 (SANCHEZ et al., 2004). Estas são definidas como mudanças genéticas que não ocorrem devido ao polimorfismo, mas a variações de sequências parálogas duplicadas no genoma (BECKMANN; ESTIVILL; ANTONARAKIS, 2007). Sequências parálogas são sequências que divergiram após a duplicação de um gene, podendo ser bem grandes (> 150 Kb) e exibir um grande grau de similaridade de sequência (> 98 %) (HORVATH; SCHWARTZ; EICHLER, 2000). Estas propriedades tornam tais segmentos particularmente problemáticos para o mapeamento e sequenciamento do genoma humano. A sequência paráloga variante é análoga ao polimorfismo de nucleotídeo único com exceção de que a variação da sequência ocorre depois do evento de duplicação em oposição a descendência de um alelo fundador comum no polimorfismo (HORVATH; SCHWARTZ; EICHLER, 2000).

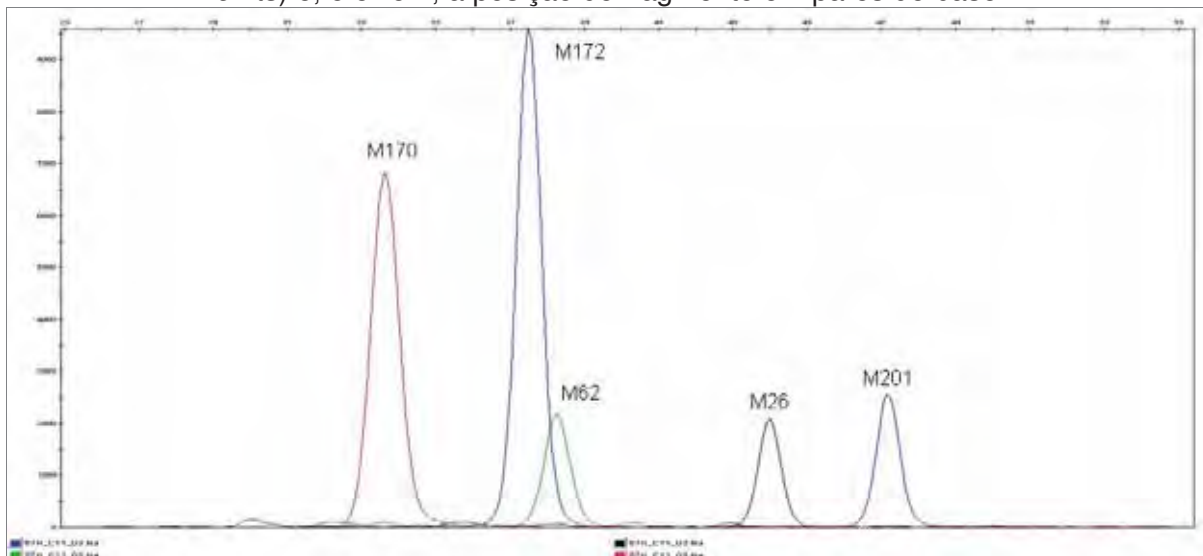
O SNP P25 apresenta a base citosina (cor preta) em seu estado ancestral e as bases citosina (cor preta) e adenina (cor verde) em seu estado derivado. Já o SNP 92R7, apresenta as bases guanina (*primer* reverso, detecção da citosina, cor preta) e adenina (*primer* reverso, detecção da timina, cor vermelha) em seu estado ancestral e somente a base adenina (*primer* reverso, detecção da timina, cor vermelha) em seu estado derivado (Figura 5).

Figura 5 – Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 9 SNPs do *Multiplex I*. O eixo-y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo-x, a posição do fragmento em pares de base.



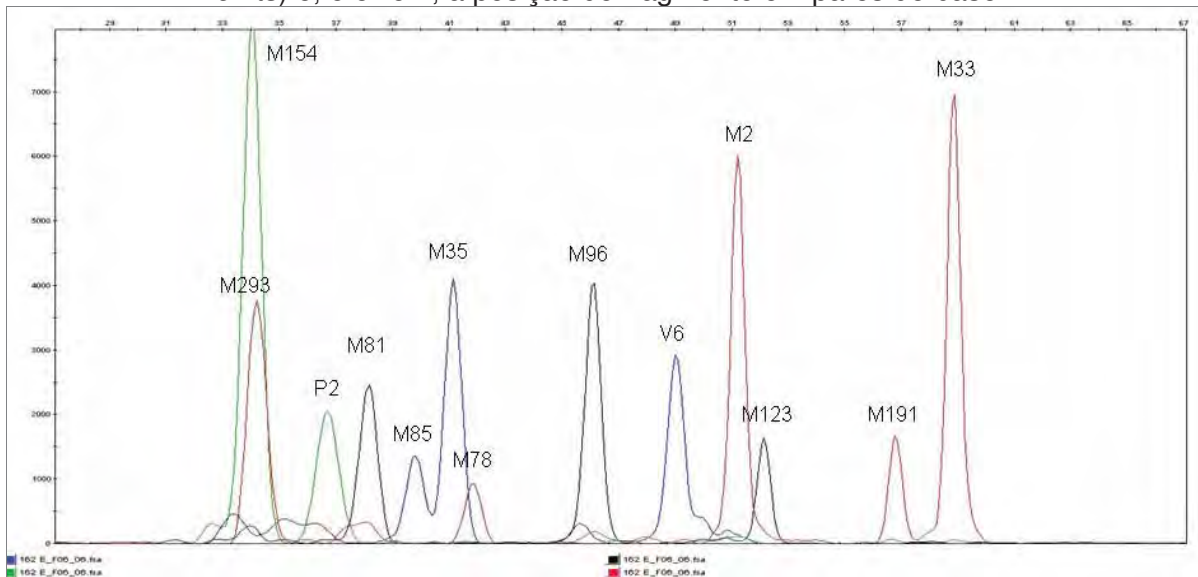
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 6 – Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 5 SNPs do *Multiplex II*. Eixo-y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo-x, a posição do fragmento em pares de base.



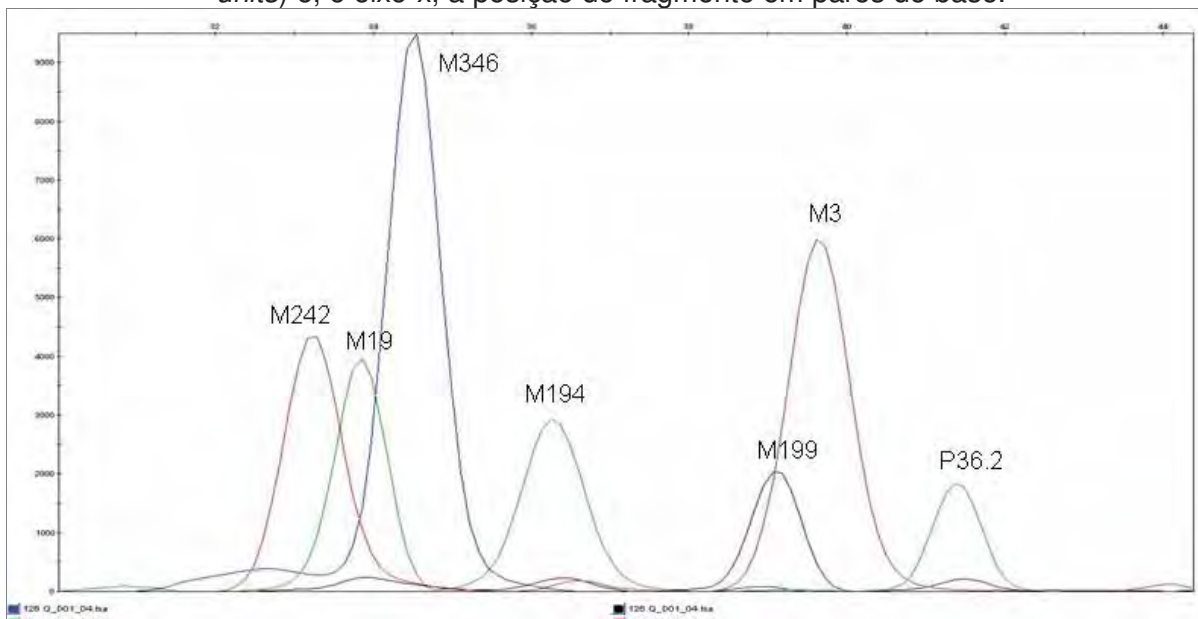
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7 – Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 13 SNPs do *Multiplex E*. Eixo-y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo-x, a posição do fragmento em pares de base.



Fonte: Dados da pesquisa.

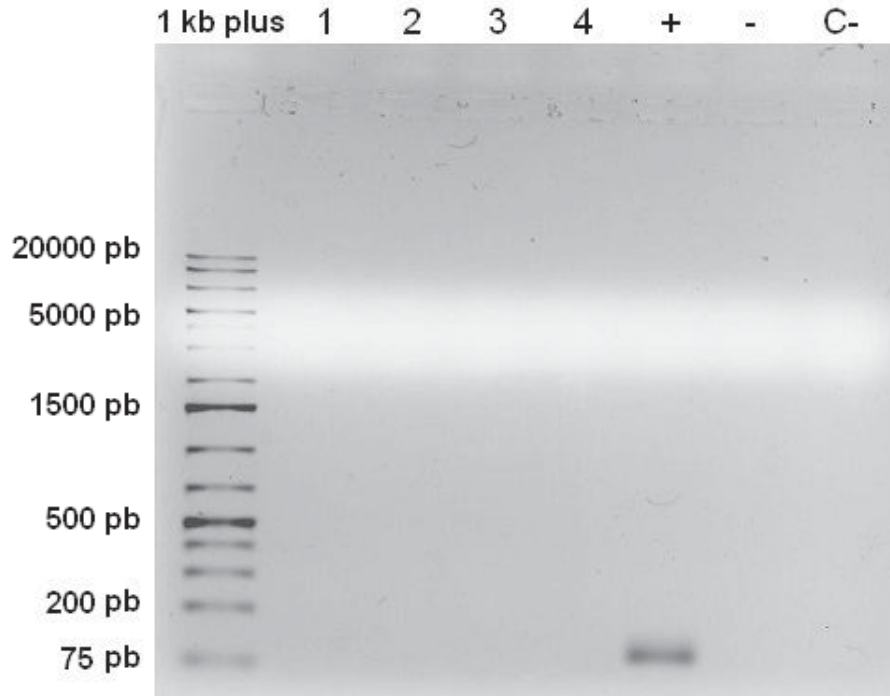
Figura 8 – Eletroferograma mostrando o perfil de análise de uma amostra para os 7 SNPs do *Multiplex Q*. Eixo-y indica a intensidade de fluorescência em RFU (*relative fluorescence units*) e, o eixo-x, a posição do fragmento em pares de base.



Fonte: Dados da pesquisa.

Para 6 amostras, o SNP 12f2 do *Multiplex II* foi verificado quanto à presença (alelo ancestral) ou ausência (alelo derivado) em gel de agarose 0,8 %. A figura 9 apresenta o resultado de 4 destas amostras, sendo o tamanho do fragmento amplificado esperado de 90 pb segundo Brión et al. (2005b).

Figura 9 – Gel de agarose 0,8 % em TAE [1x], corado com BrEt. Produto da reação de amplificação *Monoplex* do SNP 12f2 de 4 amostras, indicando ausência de banda nas canaletas de 1 a 4. (+) amostra com banda 12f2 presente. (-) amostra com banda 12f2 ausente. (C-) controle negativo da reação. 1 Kb plus: *O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder Plus*, 75-20000 pb.



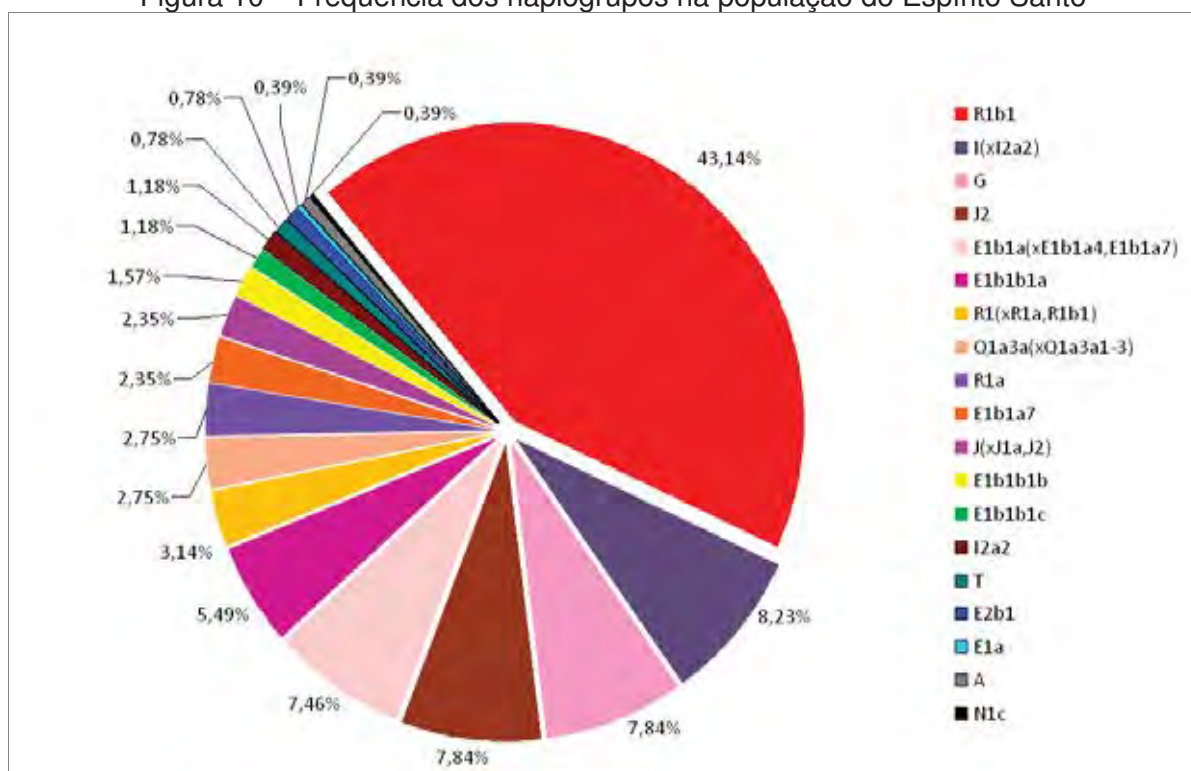
Fonte: Foto do autor.

Conforme apresentado, a metodologia utilizada foi eficaz, sendo que todos os SNPs presentes nas amostras foram bem amplificados, permitindo uma precisa determinação do haplogrupo de cada indivíduo.

4.2. Frequência dos haplogrupos encontrados

Dos 38 haplogrupos possíveis de serem classificados com os 35 SNPs estudados, somente 19 foram detectados nesta amostragem (n=255) e a frequência destes e diversidade de haplogrupos estão apresentadas na Figura 10. Em termos de frequência, o haplogrupo mais encontrado foi o R1b1 (43,14 %), seguido do I(xI2a2) (8,23 %), G (7,84 %), J2 (7,84 %) e E1b1a(xE1b1a4,E1b1a7) (7,46 %).

Figura 10 – Frequência dos haplogrupos na população do Espírito Santo



Fonte: Dados da pesquisa.

O haplogrupo R1b1, caracterizado pelo polimorfismo P25, foi o mais encontrado neste estudo, estando presente em 110 amostras (43,14 %). Este haplogrupo é altamente frequente na Europa (KARAFET et al., 2008), o que influenciou diretamente na formação da população brasileira como um todo.

O haplogrupo I é o segundo mais frequente e representa um dos dois maiores haplogrupos europeus, juntamente com o haplogrupo R (HAMMER et al., 2001; JOBLING; TYLER-SMITH, 2003, UNDERHILL; KIVISILD, 2007), sendo assim, também, de grande influência na nossa população.

O haplogrupo G não é amplamente distribuído no mundo, estando presente majoritariamente no Oriente Médio, Mediterrâneo e Cáucaso (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003; UNDERHILL; KIVISILD, 2007).

O haplogrupo J2 é a subdivisão mais comum do haplogrupo J na Europa (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003; UNDERHILL; KIVISILD, 2007). Já o haplogrupo J(xJ1a, J2) é pertencente ao haplogrupo J, mais possivelmente às subdivisões J1b ou J1c, excluindo o J1a. O haplogrupo J1 predomina no Oriente Médio e Norte da África (SEMINO et al., 2004).

O haplogrupo E1b1 possui duas subdivisões mais comuns, o E1b1a e o E1b1b1. Os haplogrupos E1a, E2b1 e E1b1a estão virtualmente ausentes nas populações europeias e parecem ser geograficamente restritos a África Subsaariana (SEMINO et al., 2004). A linhagem E1b1a apresenta sua maior frequência em Senegal e tem sido esporadicamente observada no norte da África e Iraque (SEMINO et al., 2004).

E1b1b1 tem sido encontrada na África, no Oriente e Europa, onde se acredita ter chegado na época Neolítica (HAMMER et al., 1998). A distribuição do E1b1b1a na Europa Ocidental foi descrita como resultante da expansão demográfica tardia dos Balcãs ao longo do Mar Mediterrâneo (CRUCIANI et al., 2004; SEMINO et al., 2004). E1b1b1b foi encontrado em populações espanholas (FLORES et al., 2003; BRIÓN et al., 2005a), apresentando altas frequências em Cantábria, Espanha (BRIÓN et al., 2004). A distribuição do E1b1b1b sugere que sua presença no continente foi mediada pela ocupação islâmica da Península Ibérica (CRUCIANI et al., 2004). E1b1b1c é distribuído no Oriente e é também encontrado no norte da África e Europa, mas não atinge as regiões da Europa Ocidental (SEMINO et al., 2004).

O haplogrupo R1(xR1a,R1b1) e R1a pertencem ao haplogrupo R, principal clado na Europa, como já dito anteriormente. O haplogrupo R1a está mais frequentemente presente na Europa Oriental e Ásia Ocidental (JOBILING; TYLER-SMITH, 2003).

O haplogrupo Q1a3a(xQ1a3a1-3) é a maior linhagem dentre os ameríndios (BRIÓN et al., 2005a; UNDERHILL; KIVISILD, 2007), sendo quase completamente restrito às Américas (ZEGURA et al., 2004). A presença de indivíduos classificados neste haplogrupo em nosso estudo demonstra a presença de ancestralidade ameríndia na população estudada.

O haplogrupo T é raro no mundo, sendo encontrado em baixas frequências em toda Europa e partes do Oriente Médio, Norte e Oeste da África (UNDERHILL et al., 2001; KING et al., 2007; UNDERHILL; KIVISILD, 2007).

O haplogrupo A é um dos mais basais clados de toda a árvore do cromossomo Y, é quase completamente restrito ao continente Africano (HAMMER et al., 2001; UNDERHILL et al., 2001; UNDERHILL; KIVISILD, 2007; GOMES et al., 2010).

O haplogrupo N1c é amplamente distribuído na Sibéria e no norte da Europa e da Ásia (KARAFET et al., 2001; ROOTSI et al., 2007; UNDERHILL; KIVISILD, 2007), sendo considerado de contribuição europeia segundo Brión et al. (2005b).

Todos os haplogrupos foram verificados quanto a sua maior ocorrência (Tabela 7) para posterior classificação das amostras quanto a sua ancestralidade.

Tabela 7 - Frequência relativa (%) dos haplogrupos em diferentes populações. ^aEste estudo; ^bSILVA et al. (2006); ^cDE AZEVEDO et al.(2009); ^dBELEZA et al. (2006); ^{e,g,h,i}BRIÓN et al. (2005a); ^fGOMES et al. (2010). (-) haplogrupo não analisado

Haplogrupos	Espírito Santo ^a (n=255)	Rio de Janeiro ^b (n=127)	Alagoas ^c (n=247)	Portugal ^d (n=663)	Espanha ^e (n=130)	Uganda ^f (n=118)	Moçambique ^g (n=130)	China ^h (n=55)	Japão ⁱ (n=40)
R1b1	43,14	51,18	55,47	59,90	56,20	0	2,30	0	0
BCD	0	0,79	0	0	0,80	32,20	17,70	7,30	42,50
I(xI2a2)	8,23	9,45	4,86	6,10	13,10	-	0	0	0
G	7,84	2,36	3,64	5,50	1,50	-	0	0	0
J2	7,84	3,94	7,29	7,00	-	-	-	-	-
E1b1a(xE1b1a4,E1b1a7)	7,46	7,87	4,45	0,20	0	6,78	71,50	0	0
E1b1b1a	5,49	3,94	5,67	4,10	-	0,85	-	-	-
R1(xR1a,R1b1)	3,14	0	0	0	0,80	0	0	0	0
Q1a3a(xQ1a3a1-3)	2,75	1,57	0,81	-	-	-	-	-	-
R1a	2,75	2,36	0,40	2,00	0,80	0	0	0	0
E1b1a7	2,35	-	-	-	-	5,08	-	-	-
J(xJ1a,J2)	2,35	3,15	6,07	3,40	14,60	-	0	0	0
E1b1b1b	1,57	4,72	4,05	5,60	4,60	0	0,80	0	0
E1b1b1c	1,18	0,79	0,40	1,20	0,80	0	0	0	0
I2a2	1,18	0,79	1,62	1,50	-	-	-	-	-
T	0,78	2,36	4,05	1,60	-	0,85	-	-	-
E2b1	0,78	-	-	-	0	2,54	6,90	0	0
E1a	0,39	-	-	-	0	0	0	0	0
A	0,39	0	0	0	0	33,05	0,80	0	0
N1c	0,39	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3. Diversidade de haplogrupos

Como esperado para uma população com grande índice de mistura, uma grande diversidade de haplogrupos do cromossomo Y foi observada na população do Estado do Espírito Santo: $0,7794 \pm 0,0229$.

O valor obtido foi elevado, sendo superior aos valores descritos nas populações marcadas em azul e inferior aos relatados pelas populações marcadas em vermelho (Tabela 8).

Tabela 8 – Diversidade de haplogrupos em várias populações

População	Diversidade	Referência
Espírito Santo	$0,7576 \pm 0,0213$	Este estudo
Alagoas	$0,6735 \pm 0,0321$	DE AZEVEDO et al., 2009
Rio de Janeiro	$0,7194 \pm 0,0413$	SILVA et al., 2006
Tailândia	0,744	BRIÓN et al., 2005a
China	0,654	BRIÓN et al., 2005a
Moçambique	0,455	BRIÓN et al., 2005a
Somália	0,757	BRIÓN et al., 2005a
Dinamarca	0,704	BRIÓN et al., 2005a
Espanha	0,646	BRIÓN et al., 2005a
Portugal	0,652	BELEZA et al., 2006
Turquia	0,826	BRIÓN et al., 2005a
Hungria	0,86348	PAMJAV et al., 2011
Malásia	0,86848	PAMJAV et al., 2011
Uganda	$0,8312 \pm 0,0218$	GOMES et al., 2010

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4. Comparação entre populações

A partir das frequências dos haplogrupos, com auxílio do software Arlequin v.3.11, foi determinada a distância genética (F_{ST}) entre a população do Espírito Santo - Brasil e outras 15 populações com dados publicados na literatura: Rio de Janeiro - Brasil (SILVA et al., 2006), Alagoas - Brasil (DE AZEVEDO et al., 2009), Colômbia (BRIÓN et al., 2005a), Portugal (BELEZA et al., 2006), Espanha (BRIÓN et al., 2005a), Alemanha (BRIÓN et al., 2005a), Dinamarca (BRIÓN et al., 2005a),

Turquia (BRIÓN et al., 2005a), Argentina (BRIÓN et al., 2005a), Groenlândia (BRIÓN et al., 2005a), Moçambique (BRIÓN et al., 2005a), Somália (BRIÓN et al., 2005a), Japão (BRIÓN et al., 2005a), Tailândia (BRIÓN et al., 2005a) e China (BRIÓN et al., 2005a). Para a realização desta análise, todas as populações foram uniformizadas quanto à classificação dos haplogrupos, sendo utilizada a seguinte classificação: haplogrupos A, BCD, E(xE1b1a, E1b1b), E1b1a, E1b1b1, E1b1b1b, E1b1b1c, F(xG,I,J,K), G, I, J, K(xN1c,P), N1c, P(xR1), R1, R1a e R1b1.

A matriz da distância genética (F_{ST}) obtida das comparações feitas aos pares para estas 16 populações está representada na Tabela 9.

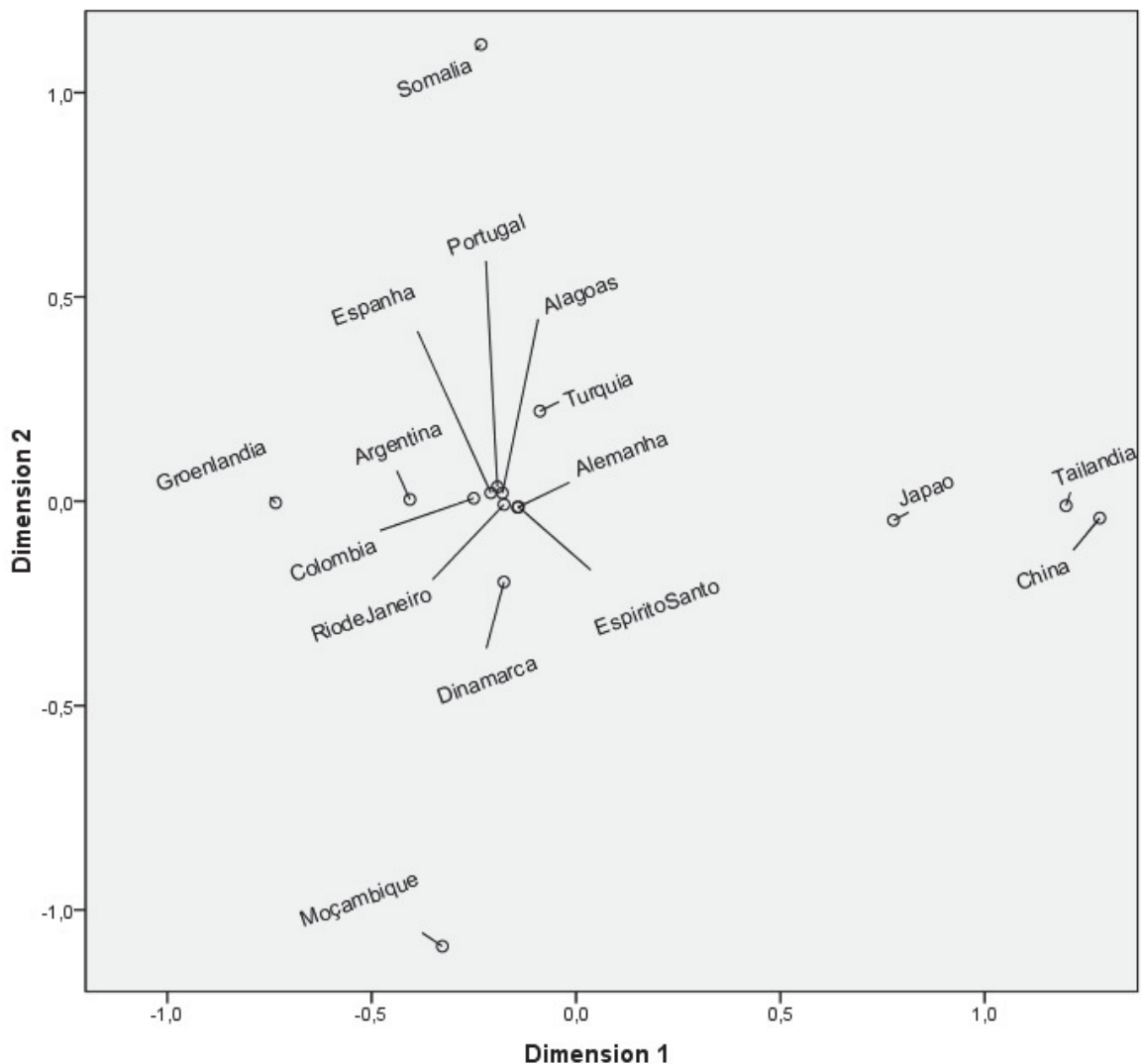
Tabela 9 - Comparação entre 16 populações. Distância genética F_{ST} (abaixo da diagonal) e correspondente valor de "p" (acima da diagonal) entre as populações. ES, Espírito Santo; COL, Colômbia; ARG, Argentina; GRO, Groenlândia; TAI, Tailândia; CHI, China; JAP, Japão; MOÇ, Moçambique; SOM, Somália; ALE, Alemanha; DIN, Dinamarca; ESP, Espanha; TUR, Turquia; RJ, Rio de Janeiro; AL, Alagoas; POR, Portugal.
*Significante "p" valor para nível de 0,05.

	ES	COL	ARG	GRO	TAI	CHI	JAP	MOÇ	SOM	ALE	DIN	ESP	TUR	RJ	AL	POR
ES		0,10712	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00218*	0,00000*	0,00317*	0,00000*	0,10732	0,00149*	0,00000*
COL	0,00732		0,00188*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00723*	0,00000*	0,06059	0,00000*	0,44897	0,22829	0,04930*
ARG	0,06559	0,05374		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
GRO	0,19941	0,21805	0,07868		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
TAI	0,42218	0,53665	0,50662	0,54251		0,30542	0,00010*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
CHI	0,44466	0,56883	0,53312	0,57016	0,00122		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
JAP	0,32382	0,38666	0,36816	0,40982	0,20166	0,28894		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
MOÇ	0,31208	0,39922	0,41921	0,45351	0,62368	0,65612	0,48979		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
SOM	0,34171	0,42112	0,42982	0,46001	0,60085	0,63799	0,49348	0,55108		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
ALE	0,01618	0,03010	0,08483	0,19363	0,45503	0,47839	0,34128	0,37388	0,36213		0,00485*	0,00178*	0,00000*	0,01119*	0,00000*	0,00000*
DIN	0,07351	0,11063	0,14212	0,20024	0,48612	0,51014	0,37407	0,41191	0,41323	0,02286		0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*	0,00000*
ESP	0,01890	0,01409	0,10174	0,26898	0,51882	0,54357	0,40267	0,44093	0,43402	0,02623	0,09067		0,00000*	0,13385	0,32789	0,18939
TUR	0,07040	0,11465	0,10689	0,20350	0,47231	0,50783	0,31445	0,39044	0,38309	0,07743	0,12173	0,11655		0,00000*	0,00000*	0,00000*
RJ	0,00442	-0,00109	0,08241	0,23452	0,46637	0,49026	0,34913	0,37179	0,39841	0,01730	0,08013	0,00505	0,10758		0,27433	0,01832*
AL	0,01370	0,00321	0,09589	0,26852	0,47145	0,49439	0,37912	0,40109	0,40151	0,03542	0,11404	0,00045	0,11723	0,00124		0,10256
POR	0,02844	0,01248	0,11617	0,29634	0,48614	0,50958	0,41343	0,43251	0,42327	0,04373	0,12323	0,00204	0,15226	0,00973	0,00247	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na maioria das comparações (Tabela 9), foram obtidos valores de p significativos e estes resultados revelaram que os haplogrupos encontrados na população do estado do Espírito Santo foram mais similares às populações Europeias e Latinas, estando mais distante das populações Africanas e Asiáticas. Esta relação entre as populações, inferida pela distância genética F_{ST} , foi visualizada, também, em gráfico bidimensional obtido pelo método MDS (Figura 11), confirmando estes dados obtidos.

Figura 11 - Análise multidimensional (MDS) da distância genética entre populações brasileiras, latinas, europeias, africanas e asiáticas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A variabilidade genética dentro e entre as populações foi avaliada utilizando o teste AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*). Observou-se que 23,22 % ($p < 0,05$) da variação ocorre entre as 16 populações estudadas. Esta porcentagem é

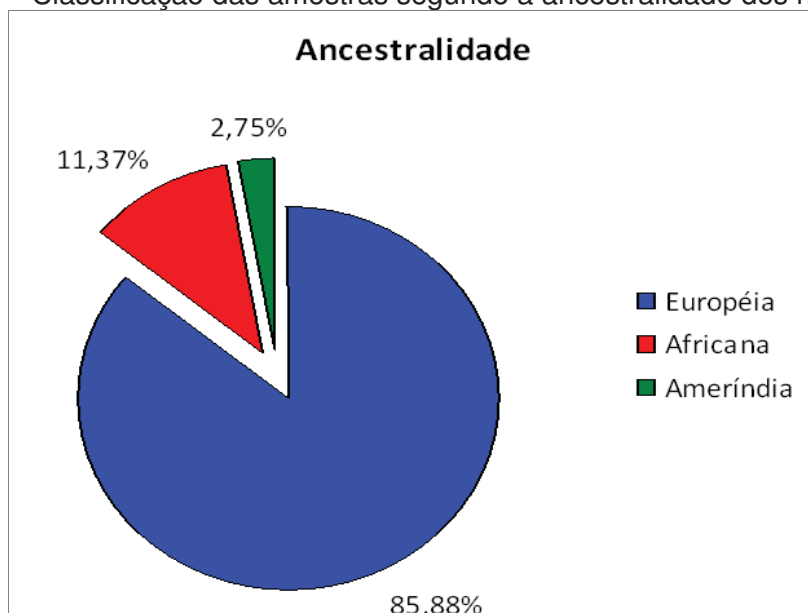
considerada alta, mas já era esperada visto que as populações comparadas apresentam ancestralidades muito distintas. Quando foi realizada tal análise apenas entre as populações brasileiras, obteve-se um F_{ST} de 0,0083 ($p < 0,05$), demonstrando a maior proximidade genética entre tais populações.

A proximidade da população estudada com as populações européias deve-se a presença em nossa população de haplogrupos bastante presentes em populações como Portugal, Espanha, Itália, Alemanha e Polônia que tiveram grande influência na formação da população do Espírito Santo (ARQUIVO PÚBLICO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2010).

4.5. Ancestralidade dos haplogrupos

A partir dos dados referentes à principal ocorrência de cada haplogrupo e a classificação de outros estudos que também realizaram a distinção dos haplogrupos por ancestralidade (BRIÓN et al., 2005a; SILVA et al., 2006; DE AZEVEDO et al., 2009; SÃO BENTO et al., 2009), foi realizada uma estimativa da contribuição continental paterna na população do Espírito Santo, visto que os principais haplogrupos dos Y-SNPs são geograficamente específicos. Assim, as linhagens paternas obtidas neste estudo foram consideradas: 85,88 % européias (haplogrupos R1b1, I(xI2a2), G, J2, E1b1b1a, R1(xR1a,R1b1), R1a, J(xJ1a,J2), E1b1b1b, E1b1b1c, I2a2, T e N1c), 11,37 % africanas (haplogrupos E1b1a(xE1b1a4, E1b1a7), E1b1a7, E2b1, E1a e A) e 2,75 % ameríndias (haplogrupo Q1a3a(xQ1a3a1-3)) (Figura 12). Esta distinção confirmou a proximidade da nossa população com as populações européias, observada no cálculo de distância genética.

Figura 12 – Classificação das amostras segundo a ancestralidade dos haplogrupos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Outros estudos no Brasil também determinaram tal proporção como na população de Alagoas, que considerou 94,74 % de contribuição européia, 4,45 % de africana e 0,81 % de ameríndia (DE AZEVEDO et al., 2009); do Rio de Janeiro, com 88,1 % européias, 8,7 % africanas e 1,6 % ameríndias e outros 1,6 % não foram atribuídos a nenhuma destas ancestralidades (SILVA et al., 2006) e de Ribeirão Preto-SP, com 87,66 % européias, 11,11 % africanas e 1,23 % ameríndias (SÃO-BENTO et al., 2009). Este trabalho apresentou ancestralidade similar às encontradas em outros estudos realizados na região sudeste do Brasil.

Os dados referentes à ancestralidade dos haplogrupos encontrados em nossa população, juntamente com a comparação realizada entre diversas populações, estão de acordo com a formação da população brasileira resultante de cinco séculos de misturas interétnica entre, principalmente, ameríndios, europeus e africanos (PENA et al., 2009). Este processo pode ser dividido em três períodos: inicialmente, o maior componente da população consistia de ameríndios, que assim contribuíram fortemente para a formação inicial do Brasil. A diminuição subsequente no número de ameríndios e o grande influxo de africanos levaram à segunda fase que durou até 1850. O terceiro período ocorreu desde o início com a presença de colonizadores europeus e principalmente após 1850 (SANTOS, 2002). No século XIX, aproximadamente 6 milhões de imigrantes chegaram oficialmente ao Brasil (IBGE,

2000), dentre eles: portugueses e italianos (quase 70 % do total), espanhóis, alemães, sírios, libaneses e japoneses (CARVALHO-SILVA et al., 2001).

A história do Espírito Santo se iniciou em 1535, quando os colonizadores portugueses desembarcaram na Capitania do Espírito Santo, fundando Vila Velha, primeiro núcleo populacional da capitania. Inicialmente, a região do atual Estado do Espírito Santo era habitada por índios do grupo tupinambá (os temiminós) e do grupo jê (os aimorés e os goitacás). Há também a presença constante do negro desde o século XVI, tendo como áreas de concentração no norte: São Mateus, no centro: Vitória e no sul: Cachoeiro do Itapemirim; entretanto, existe a grande dificuldade de fontes que relatem a presença do negro nos primeiros séculos da colonização (SALETTI, 1996). O fluxo imigratório inicia-se em 1812 com a chegada de açorianos e espanhóis. A partir de 1847 inicia-se a colonização maciça por imigrantes europeus, principalmente italianos, seguidos por alemães, espanhóis, portugueses e poloneses (ARQUIVO PÚBLICO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, 2010), intensificados após a abolição da escravidão em 1888. Portanto, o Espírito Santo teve imigrações semelhantes ao Brasil como um todo ao longo da sua história.

Este trabalho com Y-SNPs é pioneiro no Estado do Espírito Santo e os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores realizados na população brasileira e estão condizentes com o padrão de mistura genética no Brasil, caracterizado pela miscigenação entre homens de origem européia, constatado pelos estudos do cromossomo Y (CARVALHO-SILVA et al., 2001; ABE-SANDES; SILVA; ZAGO, 2004; GONÇALVES et al., 2008; GUERREIRO-JUNIOR et al., 2009; PENA et al., 2009) e mulheres de origem africana e ameríndia, constatado por estudos do DNA mitocondrial (ALVES-SILVA et al., 2000; GONÇALVES et al., 2008; GUERREIRO-JUNIOR et al., 2009; PENA et al., 2009).

Além disso, pode-se dizer que se ampliaram os dados genéticos da população brasileira em relação aos marcadores Y-SNPs; dados estes que, posteriormente, poderão alimentar um banco de dados da população brasileira, paralelamente ao internacional, viabilizando sua aplicação no contexto forense nacional.

5. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste estudo nos permitiram concluir que:

- Das 255 amostras analisadas, 129 foram classificadas ao respectivo haplogrupo utilizando apenas o *Multiplex I*, 70 necessitaram também do *Multiplex II*, 49 do *Multiplex E* e 7 do *Multiplex Q*.
- Dos 38 haplogrupos possíveis de serem classificados com os 35 SNPs estudados, somente 19 foram detectados nesta amostragem.
- Os principais haplogrupos foram determinados na população do Espírito Santo, sendo o mais frequente o R1b1 seguido pelo I(xI2a2), G, J2 e E1b1a(xE1b1a4,E1b1a7).
- Na análise de distância genética, observou-se que a população do estado do Espírito Santo está mais próxima de populações Europeias e Latinas, estando mais distante das populações Africanas e das Asiáticas.
- Na classificação das linhagens paternas segundo a ancestralidade, observou-se uma maior contribuição europeia (85,88 %), seguida de africana (11,37 %) e ameríndia (2,75 %).
- Ampliaram-se os dados genéticos da população brasileira em relação a tais marcadores, os quais, posteriormente, poderão alimentar um banco de dados da população brasileira, paralelamente ao internacional, viabilizando sua aplicação no contexto forense nacional.

ABE-SANDES, K.; SILVA JR., W.A.; ZAGO, M.A. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian Population. **Hum. Biol.**, v.76, p.77-86, 2004.

ALVES, E.S. **Medicina legal e deontologia**. Curitiba: Catarinense, 1965.

ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS, M.; GUIMARAES, P.E.; FERREIRA, A.C.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.; PRADO, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, v.67, p.444-461, 2000.

ARQUIVO PÚBLICO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. Disponível em: <<http://www.ape.es.gov.br/imigrantes/html/estatisticas.html>> Acesso em: 28 jul. 2010.

BECKMANN, J.S.; ESTIVILL, X.; ANTONARAKIS, S.E. Copy number variants and genetic traits to the resolution of phenotypic to genotypic variability. **Nat. Rev. Genet.**, v.8, p.639-646, 2007.

BELEZA, S.; GUSMÃO, L.; LOPES, A.; ALVES, C.; GOMES, I.; GIOUZELI, M.; CALAFELL, F.; CARRACEDO, A.; AMORIM, A. Micro-phylogeographic and demographic history of Portuguese male lineages. **Ann. Hum. Genet.**, v.70, p.181-194, 2006.

BOUAKAZE, C.; KEYSER, C.; AMORY, S.; CRUBÉZY, E.; LUDES, B. First successful assay of Y-SNP typing by SNaPshot minisequencing on ancient DNA. **Int. J. Legal Med.**, v.121, p.493-499, 2007.

BRADMAN, N.; THOMAS, M. Why Y? The Y chromosome in the study of human evolution, migration and prehistory. **Science Spectra**, n. 14, 1998.

BRIÓN, M.; QUINTANS, B.; ZARRABEITIA, M.; GONZALEZ-NEIRA, A.; SALAS, A.; LAREU, V.; TYLER-SMITH, C.; CARRACEDO, A. Micro-geographical differentiation in northern Iberia revealed by Y-chromosomal DNA analysis. **Gene**, v.329, p.17-25, 2004.

BRIÓN, M.; SANCHEZ, J.J.; BALOGH, K.; THACKER, C.; BLANCO-VEREA, A.; BORSTING, C.; STRADMANN-BELLINGHAUSEN, B.; BOGUS, M.; SYNDERCOMBE-COURT, D.; SCHNEIDER, P.M.; CARRACEDO, A.; MORLING, N. Introduction of a single nucleotide polymorphism-based "Major Y-chromosome haplogroup typing kit" suitable for predicting the geographical origin of male lineages. **Electrophoresis**, v.26, p.4411-4420, 2005a.

BRIÓN, M.; SOBRINO, B.; BLANCO-VEREA, A.; LAREU, M.V.; CARRACEDO, A. Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. **Int. J. Legal Med.**, v.119, p.10-15, 2005b.

BUDOWLE, B.; ALLARD, M.W.; WILSON, M.R.; CHAKRABORTY, R. Forensics and mitochondrial DNA: Applications, debates, and foundations. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v.4, p.119-141, 2003.

BUDOWLE, B.; VAN DAAL, A. Forensically relevant SNP classes. **Biotechniques**, v.44, p.603-608, 2008.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA typing**. 2nd ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.

BUTLER, J.M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology**. 1st ed. London: Elsevier Academic Press, 2011.

CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D.J. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, v.68, p.281-286, 2001.

CHARLESWORTH, B. The organization and evolution of the human Y chromosome. **Genome Biol.**, v.4, p.226, 2003.

CHEN, X.; SULLIVAN, P.F. Single nucleotide polymorphisms genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. **Pharmacogenomics. J.**, v.3, p.77-96, 2003.

CRUCIANI, F.; LA FRATTA, R.; SANTOLAMAZZA, P.; SELBITTO, D.; PASCONE, R.; MORAL, P.; WATSON, E.; GUIDA, V.; COLOMB, E.B.; ZAHAROVA, B.; LAVINHA, J.; VONA, G.; AMAN, R.; CALI, F.; AKAR, N.; RICHARDS, M.; TORRONI, A.; NOVELLETTO, A.; SCOZZARI, R. Phylogeographic analysis of haplogroup E3b (E-M215) y chromosomes reveals multiple migratory events within and out of Africa. **Am. J. Hum. Genet.**, v.74, p.1014-1022, 2004.

DE AZEVEDO, D.A.; DA SILVA, L.A.F.; GUSMÃO, L.; DE CARVALHO, E.F. Analysis of Y chromosome SNPs in Alagoas, Northeastern Brazil. **Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.**, v.2, p.421-422, 2009.

DE KNIJFF, P. Messages through bottlenecks: On the combined use of slow and fast evolving polymorphic markers on the human Y chromosome. **Am. J. Hum. Genet.**, v.67, p.1055-1061, 2000.

EDELMANN, J.; LESSIG, R.; KLINTSCHAR, M.; SZIBOR, R. Advantages of X-chromosomal microsatellites in deficiency paternity testing: Presentation of cases. **Int. Congr. Ser.**, v.10, p.257-259, 2004.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin v.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinform. Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FLORES, C.; MACA-MEYER, N.; PÉREZ, J.A.; GONZÁLEZ, A.M.; LARRUGA, J.M.; CABRERA, V.M. A predominant european ancestry of paternal lineages from Canary Islanders. **Ann. Hum. Genet.**, v.67, p.138-152, 2003.

GOMES, V.; SÁNCHEZ-DIZ, P.; AMORIM, A.; CARRACEDO, A.; GUSMÃO, L. Digging deeper into East African human Y chromosome lineages. **Hum. Genet.**, v.127, p.603-613, 2010.

GONÇALVES, V.F.; CARVALHO, C.M.B.; BORTOLINI, M.C.; BYDLOWSKI, S.P.; PENA, S.D.J. The Phylogeography of African Brazilians. **Hum. Hered.**, v.65, p.23-32, 2008.

GRAVES, J.A.; WAKEFIELD, M.J.; TODER, R. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. **Hum. Mol. Genet.**, v.7, p.1991-1996, 1998.

GRAVES, J.A.M. The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.350, p.305-312, 1995.

GUERREIRO-JUNIOR, V.; BISSO-MACHADO, R.; MARRERO, A.; HÜNEMEIER, T.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. Genetic signatures of parental contribution in black and white populations in Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v.32, p.1-11, 2009.

HAMMER, M.F. A recent common ancestry for human Y chromosome. **Nature**, v.378, p.376-378, 1995.

HAMMER, M.F.; KARAFET, T.; RASANAYAGAM, A.; WOOD, E.T.; ALTHEIDE, T.K.; JENKINS, T.; GRIFFITHS, R.C.; TEMPLETON, A.R.; ZEGURA, S.L. Out of Africa and back again: nested cladistic analysis of human Y chromosome variation. **Mol. Biol. Evol.**, v.15, p.427-441, 1998.

HAMMER, M.F.; KARAFET, T.M.; REDD, A.J.; JARJANAZI, H.; SANTACHIARA-BENERECETTI, S.; SOODYALL, H.; ZEGURA, S.L. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. **Mol. Biol. Evol.**, v.18, p.1189-1203, 2001.

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

HOLLAND, M.M.; PARSONS, T.J. Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. **Forensic Sci. Rev.**, v.11, p.21-50, 1999.

HORVATH, J.E.; SCHWARTZ, S.; EICHLER, E.E. The mosaic structure of human pericentromeric DNA: a strategy for characterizing complex regions of the human genome. **Genome Res.**, v.10, p.839-852, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro, 2000.

JOBLING, M.A. In the name of the father: Surnames and genetics. **Trends Genet.**, v.17, p.353-357, 2001.

JOBLING, M.A.; PANDYA, A.; TYLER-SMITH, C. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. **Int. J. Legal Med.**, v.110, p.118-124, 1997.

JOBLING, M. A.; TYLER-SMITH, C. New uses for new haplotypes: the human Y chromosome, disease, and selection. **Trends Genet.**, v.16, p.356-362, 2000.

JOBLING, M.A.; TYLER-SMITH, C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. **Nat. Rev. Genet.**, v.4, p.598-612, 2003.

KARAFET, T.; XU, L.; DU, R.; WANG, W.; FENG, S.; WELLS, R.S.; REDD, A.J.; ZEGURA, S.L.; HAMMER, M.F. Paternal population history of East Asia: Sources, patterns, and microevolutionary processes. **Am. J. Hum. Genet.**, v.69, p.615-628, 2001.

KARAFET, T. M.; MENDEZ, F. L.; MEILERMAN, M. B.; UNDERHILL, P. A.; ZEGURA, S. L.; HAMMER, M. F. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. **Genome Res.**, v.18, p.830-838, 2008.

KAYSER, M.; KITTLER, R.; ERLER, A.; HEDMAN, M.; LEE, A.C.; MOHYUDDIN, A.; MEHDI, S.Q.; ROSSER, Z.; STONEKING, M.; JOBLING, M.A.; SAJANTILA, A.; TYLER-SMITH, C. A Comprehensive Survey of Human Y-Chromosomal Microsatellites. **Am. J. Hum. Genet.**, v.74, p.1183-1197, 2004.

KAYSER, M.; ROEWER, L.; HEDMAN, M.; HENKE, J.; BRAUER, S.; KRÜGER, C.; KRAWCZAK, M.; NAGY, M.; DOBOSZ, T.; SZIBOR, R.; DE KNIJFF, P.; STONEKING, M.; SAJANTILA, A. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. **Am. J. Hum. Genet.**, v.66, p.1580-1588, 2000.

KING, T.E.; BOWDEN, G.R.; BELARESQUE, P.L.; ADAMS, S.M.; SHANKS, M.E.; JOBLING, M.A. Thomas Jefferson's Y chromosome belongs to a rare European lineage. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v.132, p.583-589, 2007.

KRUSKAL, J.B.; WISH, M. **Multidimensional scaling**. Beverly Hills and London: Sage Publications, 1978.

MARTINS, J.A.; COSTA, J.C.; PANETO, G.G.; FIGUEIREDO, R.F.; GUSMÃO, L.; SÁNCHEZ-DIZ, P.; CARRACEDO, A.; CICARELLI, R.M. Genetic profile characterization of 10 X-STRs in four populations of the southeastern region of Brazil. **Int. J. Legal Med.**, v.124, p.427-432, 2010.

NASCIMENTO, E.; CERQUEIRA, E.; AZEVEDO, E.; FREITAS, V.; AZEVEDO, D. The Africa male lineages of Bahia's people – Northeast Brazil: A preliminary study. **Forensic Sci. Int. Genet.**, v.2, p.349-350, 2009.

OLIVEIRA, A.M.; GUSMÃO, L.; DOMINGUES, P.; CARVALHO, E.F. Analysis of y chromosome lineages in a sample from Sub-Saharan Africa descendents in Rio de Janeiro. **Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.**, v. 2, p.442-443, 2009.

ONOFRI, V.; ALESSANDRINI, F.; TURCHI, C.; PESARESI, M.; BUSCEMI, L.; TAGLIABRACCI, A. Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. **Forensic Sci. Int.**, v.157, p.23-35, 2006.

PANETO, G.G.; LONGO, L.V.; MARTINS, J.A.; DE CAMARGO, M.A.; COSTA, J.C.; DE MELLO, A.C.; CHEN, B.; OLIVEIRA, R.N.; HIRATA, M.H.; CICARELLI, R.M. Heteroplasmy in hair: study of mitochondrial DNA third hypervariable region in hair and blood samples. **J. Forensic Sci.**, v.55, p.715-718, 2010.

PAMJAV, H.; ZALÁN, A.; BÉRES, J.; NAGY, M.; CHANG, Y.M. Genetic structure of the paternal lineage of the Roma People. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v.145, p.21-29, 2011.

PENA, S.D.J.; BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J.R.; BYDLOWSKI, S.P. DNA tests probe the genomic ancestry of brazilians. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.42, p.870-876, 2009.

PINHEIRO, M.F. Genética e biologia forense, e criminalística. In: **Noções Gerais Sobre Outras Ciências Forenses Medicina Legal**. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2004. Cap. 02, p.19-41.

PRINZ, M. Advantages and disadvantages of Y-short tandem repeat testing in forensic casework. **Forensic Sci. Rev.**, v.15, p.189-196, 2003.

ROOTSI, S.; ZHIVOTOVSKY, L.A.; BALDOVIC, M.; KAYSER, M.; KUTUEV, I.A.; KHUSAINOVA, R.; BERMISHEVA, M.A.; GUBINA, M.; FEDOROVA, S.A.; ILUMAE, A.M.; KHUSNUTDINOVA, E.K.; VOEVODA, M.I.; OSIPOVA, L.P.; STONEKING, M.; LIN, A.A.; FERA, V.; PARIK, J.; KIVISILD, T.; UNDERHILL, P.A.; VILLEMS, R. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. **Eur. J. Hum. Genet.**, v.15, p.204-211, 2007.

SALETTI, N. Transição para o trabalho livre e pequena propriedade no Espírito Santo. Vitória: EDUFES, 1996.

SANCHEZ, J.J.; BRIÓN, M.; PARSON, W.; BLANCO-VEREA, A.J.; BØRSTING, C.; LAREU, M.; NIEDERSTÄTTER, H.; OBERACHER, H.; MORLING, N.; CARRACEDO, A. Duplications of the Y-chromosome specific loci P25 and 92R7 and forensic implications. **Forensic Sci. Int.**, v.140, p.241-250, 2004.

SANTOS, A.S. Historical roots of the "whitening" of Brazil. **Lat. Am. Perspect.**, v.28, p.61-82, 2002.

SÃO-BENTO, M.; CARVALHO, M.; BENTO, A.M.; ANDRADE, L.; LOPES, V., SERRA, A.; BALSÀ, F.; ANJOS, M.J.; CORTE-REAL, F. Y-chromosome SNP analysis in the Brazilian population of São Paulo state (Ribeirão Preto). **Forensic Sci. Int. Genet.**, v.2, p.427-428, 2009.

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. **Am. J. Hum. Genet.**, v.74, p.1023-1034, 2004.

SILVA, D.A.; CARVALHO, E.; COSTA, G.; TAVARES, L.; AMORIM, A.; GUSMÃO, L. Y-Chromosome Genetic Variation in Rio de Janeiro Population. **Am. J. Hum. Biol.**, v.18, p.829-837, 2006.

SINGER-SAM, J.; TANGUAY, R.; RIGGS, A.D. Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications: a forum for PCR Users*. **Amplifications**, v.3, p.11, 1989.

SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P.J.; CORDUM, H.S.; HILLIER, L.; BROWN, L.G.; REPPING, S.; PYNTIKOVA, T.; ALI, J.; BIERI, T.; CHINWALLA, A.; DELEHAUNTY, A.; DELEHAUNTY, K.; DU, H.; FEWELL, G.; FULTON, L.; FULTON, R.; GRAVES, T.; HOU, S.; LATRIELLE, P.; LEONARD, S.; MARDIS, E.; MAUPIN, R.; MCPHERSON, J.; MINER, T.; NASH, W.; NGUYEN, C.; OZERSKY, P.; PEPIN, K.; ROCK, S.; ROHLFING, T.; SCOTT, K.; SCHULTZ, B.; STRONG, C.; TINWOLLAM, A.; YANG, S.; WATERSTON, R.H.; WILSON, R.K.; ROZEN, S.; PAGE, D.C. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v.423, p.825-837, 2003.

SOBRINO, B.; BRIÓN, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic. Sci. Int.**, v.154, p.181-194, 2005.

SZIBOR, R.; KRAWCZAK, M.;HERING, S.; EDELMANN, J.; KUHLISCH, E.; KRAUSE, D. Use of X-linked markers for forensic purposes. **Int. J. Legal Med.**, v.117, p.67-74, 2003.

THE Y CHROMOSOME CONSORTIUM, A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. **Genome Res.**, v.12 p.339-348, 2002.

THOMSON, R.; PRITCHARD, J.K.; SHEN, P.; OEFNER, P.J.; FIELDMAN, M.W. Recent common ancestry of human Y-chromosomes: evidence from DNA sequence data. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p.7360-7365, 2000.

UNDERHILL, P.A.; KIVISILD, T. Use of Y Chromosome and Mitochondrial DNA Population Structure in Tracing Human Migrations. **Annu. Rev. Genet.**, v.41, p.539-564, 2007.

UNDERHILL, P.A.; PASSARINO, G.; LIN, A.A.; SHEN, P.; MIRAZON LAHR, M.; FOLEY, R.A.; OEFNER, P.J.; CAVALLI-SFORZA, L.L. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. **Ann. Hum. Genet.**, v.65, p.43-62, 2001.

WALSH, B.; REDD, A.J.; HAMMER M.F. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers. **Forensic Sci. Int.**, v.174, p.234-238, 2008.

ZEGURA, S.L.; KARAFET, T.M.; ZHIVOTOVSKY, L.A.; HAMMER, M.F. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. **Mol. Biol. Evol.**, v.21, p.164-175, 2004.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO*
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 12/2010

Interessada: RAQUEL DE FREITAS FIGUEIREDO

Orientadora: Profa. Dra. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI

Projeto: Estudo de Polimorfismos do Cromossomo Y na População do Estado do Espírito Santo

Parecer nº 05/2011 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa "Estudo de Polimorfismos do Cromossomo Y na População do Estado do Espírito Santo", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa deverá ser entregue em julho de 2012 no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 25 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Coordenador do CEP