

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO CONTROLE DO DNA
MITOCONDRIAL EM INDIVÍDUOS NASCIDOS E RESIDENTES NO
ESTADO DO ESPÍRITO SANTO PARA UTILIZAÇÃO NA
IDENTIFICAÇÃO HUMANA**

NAIARA MARTINS SANCHES

ARARAQUARA-SP

2013

NAIARA MARTINS SANCHES

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DA REGIÃO CONTROLE DO DNA
MITOCONDRIAL EM INDIVÍDUOS NASCIDOS E RESIDENTES NO
ESTADO DO ESPÍRITO SANTO PARA UTILIZAÇÃO NA
IDENTIFICAÇÃO HUMANA**

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

Co-orientadora: Profa. Dra. Greiciane Gaburro Paneto

ARARAQUARA-SP

2013

Ficha Catalográfica

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

S211a Sanches, Naiara Martins
Análise de polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos nascidos e residentes no estado do Espírito Santo para utilização na identificação humana / Naiara Martins Sanches. – Araraquara, 2013
81 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
Coorientador: Greiciane Gaburro Paneto

1. DNA Mitocondrial. 2. Região Hipervariável. 3. Haplogrupos. 4. Espírito Santo-Brasil. I. Cicarelli, Regina Maria Barretto, orient. II. Paneto, Greiciane Gaburro, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me acompanhado nessa jornada, que mesmo curta foi de grande importância na minha vida.

À professora Regina Maria Barretto Cicarelli pela orientação e confiança em mim depositadas. Por ter contribuído efetivamente no meu crescimento acadêmico profissional.

À professora Greiciane Gaburro Paneto pela co-orientação, pela confiança e pelo apoio técnico no desenvolvimento desse projeto.

Aos meus pais Décio Sanches e Milena Martins Sanches por sempre me apoiarem nas minhas escolhas e na busca e realização dos meus sonhos.

Ao meu irmão Otávio Martins Sanches por estar sempre ao meu lado e acompanhar meu crescimento, mesmo que seja à distância.

A toda minha família que sempre torceu pelo meu sucesso tanto pessoal quanto profissional e fazem parte desta minha conquista.

Aos meus amigos, da minha cidade, que sempre me apoiam e torceram por mim mesmo a distância.

À Raquel de Freitas Figueiredo, pela grande amizade, companheirismos e pelo apoio técnico no desenvolvimento desse projeto.

À Cristiane Garcia Paulino, Fernanda Polverari e Bianca Belon pela amizade e principalmente pelo apoio nesses últimos meses.

Ao grupo do laboratório pela amizade e ajuda que prestaram nesses anos.

Às companheiras de república pela amizade, pelo companheirismo e por estarem sempre comigo nos piores e melhores momentos que vivenciamos juntas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho pelo suporte para o desenvolvimento da minha pesquisa e núcleo profissional de excelência.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro concedido durante o mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. As mitocôndrias e o DNA mitocondrial	16
1.2. Região hipervariável do DNA mitocondrial	19
1.3. Utilização do DNA mitocondrial como marcador genético forense.....	22
1.4. Utilização do DNA mitocondrial em estudos da evolução humana	23
1.5. Exames Forenses e Análise Filogenética do DNA mitocondrial.....	26
1.6. Classificação em Haplogrupos.....	27
1.7. Banco de Dados.....	32
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO	34
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. Aspectos Éticos.....	37
4.2. Casuística	37
4.3. Sequenciamento da Região Hipervariável do DNA Mitocondrial	37
4.3.1. Extração do DNA em amostras de sangue	38

4.3.2. Reação de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)	38
4.3.3. Purificação do Produto de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)... 41	
4.3.4. Reação de Sequenciamento	41
4.3.5. Purificação e precipitação do produto da reação de sequenciamento .. 44	
4.3.6. Eletroforese das amostras em analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems by Life Technologies).....	44
4.3.7. Análise das sequências do DNA mitocondrial.....	44
4.3.8. Classificação em Haplogrupos.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Sequenciamento da Região Hipervariável do DNA Mitocondrial	46
5.2. Comparação dos parâmetros estatísticos com o de outras populações brasileiras.....	49
5.3. Comparação dos parâmetros estatísticos com outras populações mundiais.....	51
5.4. Classificação da origem dos haplogrupos.....	52
5.5. Comparação da origem dos haplogrupos com outras populações	55
5.6. Ancestralidade geográfica dos DNA mt de populações de cada uma das regiões do Brasil e do estado do Espírito Santo.	57
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
Anexo A.....	72
Anexo B.....	73
Apêndice A.....	74

RESUMO

A identificação humana por meio da análise de DNA utiliza o perfil genético de um indivíduo baseado na combinação de diversos marcadores que são herdados de seus progenitores. Esses marcadores são diferenças nas sequências de DNA nuclear entre os indivíduos (polimorfismos). Em alguns casos, entretanto, a análise do DNA nuclear não pode ser aplicada. Isso ocorre quando o DNA da amostra apresenta-se degradado, ou em casos onde o material biológico apresenta pouco ou nenhum DNA nuclear. Nestes casos, a análise do DNA mitocondrial (DNA mt) é o método de escolha.

Este trabalho teve como objetivo analisar os polimorfismos presentes no DNA mt em 100 indivíduos nascidos e residentes no estado do Espírito Santo-Brasil, para utilização na identificação humana. Para tanto, utilizou-se a técnica de reação de sequenciamento, e com os resultados obtidos foi possível realizar os cálculos dos parâmetros estatísticos forenses e classificar as amostras em seus respectivos haplogrupos, o que permitiu determinar a origem matrilinear das amostras analisadas.

De um total de 100 amostras, 94 haplótipos diferentes foram encontrados, e a probabilidade de encontrarmos dois indivíduos não relacionados com perfis idênticos nas amostras analisadas (probabilidade de semelhança) foi de 1,14% e a diversidade haplotípica calculada foi de 0,9986 $\pm$ 0,0017, para toda a região hipervariável do DNA mt (desconsiderando as regiões poli-C presentes nas posições 16193, 309 e 573). A população estudada foi classificada, conforme origem, em: 43% africana, 33% europeia e 23% nativo-americana e 1% asiática.

Os resultados obtidos neste trabalho poderão ser utilizados, posteriormente, para auxiliar na elucidação de casos forenses pela polícia científica, difundindo a análise do DNA mt no contexto brasileiro. A classificação filogenética poderá futuramente dar suporte para a criação de um banco de dados brasileiro, permitindo o estudo da composição genética matrilinear de nossa população e fortalecendo geneticamente os fatos históricos de colonização em nosso país.

Palavras-chave: DNA Mitocondrial. Região Hipervariável. Haplogrupos. Espírito Santo- Brasil.

ABSTRACT

Human identification through DNA analysis uses the genetic profile of an individual based on a combination of several markers that are inherited from ancestors. These markers are differences in the nuclear DNA sequences between individuals (polymorphisms). In some cases, however, nuclear DNA analysis cannot be applied. This occurs when DNA sample has been degraded, or in cases where the biological material presents little or no nuclear DNA. In these cases, mitochondrial DNA (mtDNA) analysis is the method of choice.

This study aimed to analyze DNA mt polymorphisms in 100 subjects born and residing in the state of Espirito Santo, Brazil, to be used in human identification. This study was based on analysis of polymorphisms in mtDNA hypervariable region using DNA sequencing technique. With the results of the analyzes it was possible to perform the calculation of statistical parameters forensic and classify the samples into their respective haplogroups. The classification allowed determining the matrilineal origin of the samples.

Among 100 samples, 94 different haplotypes were found, and the probability that two unrelated individuals found with identical profiles in the samples (random match probability) was 1.14% and haplotype diversity calculated was 0.9986 ± 0.0017 , for the entire hypervariable region of mtDNA (excluding the poly-C regions present at positions 16,193, 309 and 573). The population studied was classified, based on origin, in: 43% of African, 33% of European, 23% Native American and 1% Asian.

The results obtained in this study may be used later to assist in the elucidation of cases by the forensic science police, spreading the mtDNA analysis in the Brazilian context. The phylogenetic classification can support, in a future, to create a database allowing the study of matrilineal genetic composition of our population, strengthening genetically historical facts of colonization in our country.

Keywords: Mitochondrial DNA. Hypervariable region. Haplogroups. Espirito Santo, Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – DNA mitocondrial.	17
Figura 2 – Esquema da Região Controle, Hipervariável ou <i>D-loop</i> do DNA mitocondrial.	21
Figura 3 – Árvore Filogenética Simplificada do DNA mitocondrial	30
Figura 4 – Migrações e variações dos haplogrupos classificados a partir do DNA mitocondrial.	31
Figura 5 - Esquema da localização dos iniciadores utilizados na PCR e sequenciamento indicados na Tabela 1.	43
Figura 6 – Distribuição dos haplogrupos das 100 amostras analisadas.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na reação de PCR e sequenciamento.....	40
Tabela 2 – Concentração das amostras utilizadas na Reação de Sequenciamento..	42
Tabela 3 – Haplótipos distintos encontrados em mais de um indivíduo na amostra populacional (16024-576).....	47
Tabela 4 – Parâmetros estatísticos calculados a partir da análise de toda a região hipervariável de cada uma das regiões hipervariáveis em separado e agrupadas nos 100 indivíduos.	48
Tabela 5 – Índices de diversidade das populações do Sudeste, Sul, Nordeste e Norte do Brasil para a região HV1.....	50
Tabela 6 - Parâmetros estatísticos das populações da região Sudeste do estado do Espírito Santo e São Paulo para a região HV1, HV2 e HV1+HV2.	51
Tabela 7 – Parâmetros estatísticos em nossa amostra populacional e em outras populações mundiais.....	52
Tabela 8 – Origem dos haplogrupos nas regiões Sudeste (ES/SP), Nordeste (AL) e Sul (SC) do Brasil.....	56

Tabela 9 – Ancestralidade geográfica dos DNA mt de populações de cada uma das regiões do Brasil e do estado do Espírito Santo.....	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Base nitrogenada adenina
ATP	Trifosfato de Adenosina
C	Base nitrogenada citosina
CRS	<i>Cambridge Reference Sequence</i>
rCRS	<i>Cambridge Reference Sequence revised</i>
D	Deleção
D-loop	<i>Displacement loop</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA mt	DNA mitocondrial
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i>
G	Base nitrogenada guanina
HV1	Região Hipervariável 1
HV2	Região Hipervariável 2
HV3	Região Hipervariável 3
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MRCA	<i>Matrilineal Recent Common Ancestor</i>
N	Número
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

qsp.	Quantidade suficiente para
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
G	Grama
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
M	Molar
μg	Micrograma
ng	Nanograma
mm	Milímetro
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
U	Unidade
pmol	Picomol
X	Vezes
∞	Infinito
~	Aproximadamente
V	Versão

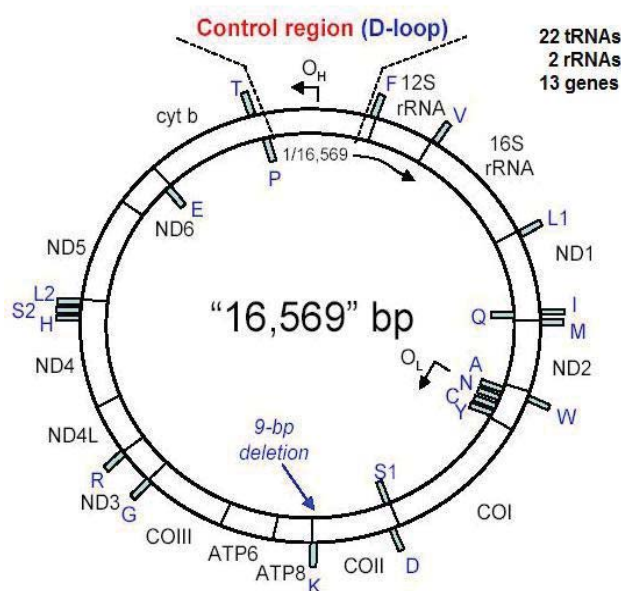
1. INTRODUÇÃO

1.1. As mitocôndrias e o DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas intracelulares de dupla membrana presentes em todas as células nucleadas de mamíferos (BANDELT *et al.*, 2006). Estas organelas, geralmente numerosas, são o centro de produção de energia nas células (HERMANN *et al.*, 1998; BUDOWLE *et al.*, 2003), possuindo um genoma extracromossômico separado e distinto do genoma nuclear, o DNA mitocondrial (DNA mt) (BUDOWLE *et al.*, 2003). Na maioria das células humanas, as mitocôndrias contêm 1.000–10.000 cópias deste genoma (Figura 1) apresentando-se como uma dupla fita circular (HOONG; LEK, 2005), sendo uma das fitas rica em purinas (denominada fita-pesada) e a outra rica em pirimidinas (denominada fita-leve) (BUDOWLE *et al.*, 2003). O DNA mt contém 37 genes, todos envolvidos na produção de energia e no estoque de ATP (Trifosfato de Adenosina) na célula. Treze desses genes codificam proteínas diretamente envolvidas na fosforilação oxidativa, o restante dos genes codificam RNAs transportadores (22 genes) e RNAs ribossomais (2 genes) (BUDOWLE *et al.*, 2003; PAKENDORF; STONEKING, 2005; LEE; JOHNSON, 2006) (Figura 1). O genoma mitocondrial é composto de duas regiões, classificadas como codificadora e a não-codificadora. A região codificadora, que contém os genes responsáveis pela expressão de proteínas, apresenta uma menor taxa de mutações quando comparada a não-codificadora. A região não-codificadora controla a replicação e transcrição do DNA mt possuindo uma alta taxa evolutiva

(substituições de base). Essas mutações ocorrem devido à baixa fidelidade da DNA polimerase mitocondrial e a ausência do mecanismo de reparo no DNA mt, o que permitiu calcular a fidelidade média completa de polimerização de um erro a cada 440.000 bases incorporadas (LEE; JOHNSON, 2006). O DNA mt evolui pelo acúmulo de mutações nas linhagens maternas (BROWN *et al.*, 1979), e acredita-se fixar novas mutações dez vezes mais rápido do que o DNA nuclear (WALLACE *et al.*, 1987). O DNA mt, além de ser considerado uma molécula com função vital na célula, está sujeito a processos biológicos que influenciam história evolutiva (BANDELT, 2006), e a rápida mudança evolutiva permite que antropólogos moleculares usem o DNA mt para estudos de divergência genética das populações humanas.

Figura 1 – DNA mitocondrial.



Fonte: BUTLER, J. M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Elsevier Academic Press, 2011.

A sequência completa do genoma mitocondrial humano, contendo 16.569 pares de base (pb), foi determinada em 1981 por Anderson e colaboradores. Por muitos anos, esta sequência (GenBank: M63933) conhecida como *Cambridge Reference Sequence* (CRS) foi utilizada como referência para comparação de novas sequências descobertas. Em 1999, a CRS foi revisada e reanalisada por Andrews e colaboradores, e constatou-se que ela continha onze erros, os quais incluíam um par de bases extra na posição 3107 (essa base extra era a adição de uma citosina (C) na posição 3106, que foi constatada como sendo um erro na fita revisada e com isso a nova sequência do DNA mt seria formada de 16568 pb) e atribuições incorretas de pares de bases individuais (BUTLER, 2011). A sequência original foi corrigida e modificada por Andrews e colaboradores, e denominada *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS), sendo mantida a numeração original de 16569 pb mas com uma deleção na sequência na posição 3107 para servir como suporte no lugar. Atualmente, a rCRS (GenBank: NC_012920) é aceita como referência para comparação de outras sequências (ANDREWS *et al.*, 1999; BUTLER, 2011).

O DNA mt representa de 1 a 2% do DNA nuclear na célula. Sua composição química não difere em nada da composição do DNA nuclear, entretanto, ele possui um código genético próprio. O genoma mitocondrial é haplóide devido sua herança estritamente materna, por isso, não é submetido a processos de recombinação. Uma das características de interesse é o seu caráter monoclonal, ou seja, todo o DNA mt de um indivíduo apresenta a mesma sequência. A natureza haplóide e monoclonal simplificam a interpretação dos resultados no sequenciamento do DNA mt (BUDOWLE *et al.*, 2003). A transmissão matrilinear

permite investigar relações de parentesco nesta linhagem, utilizando-se do conjunto de posições variáveis em relação a uma sequência de referência. Este conjunto de diferenças é denominado haplótipo (ALVES *et al.*, 2005). Embora a maioria dos indivíduos sejam homoplásmicos (apresentando um único tipo de DNA mt), uma condição chamada de heteroplasma pode existir; isso ocorre quando uma mesma pessoa apresenta mais de um tipo de DNA mt (COMAS *et al.*, 1995; BUDOWLE *et al.*, 2003). A heteroplasma pode apresentar-se de duas formas: (1) heteroplasma de sequência, quando os diferentes tipos de DNA mt diferem em apenas um nucleotídeo; (2) heteroplasma de comprimento, quando ocorre a deleção ou inserção de uma citosina em regiões contendo repetições mononucleotídicas (regiões homopoliméricas, conhecidas como regiões poli-C). A heteroplasma de sequência é a forma mais rara, podendo facilitar a identificação e diferenciação do indivíduo que a possui. A heteroplasma de comprimento é mais comum, possui uma menor especificidade populacional (PANETO, 2010). Em ambos os casos, uma análise cuidadosa e comparações diretas entre múltiplas amostras e uma amostra questionada deve, na maioria dos casos, diminuir a dificuldade de interpretação (CARRACEDO *et al.*, 2000; BUDOWLE *et al.*, 2003).

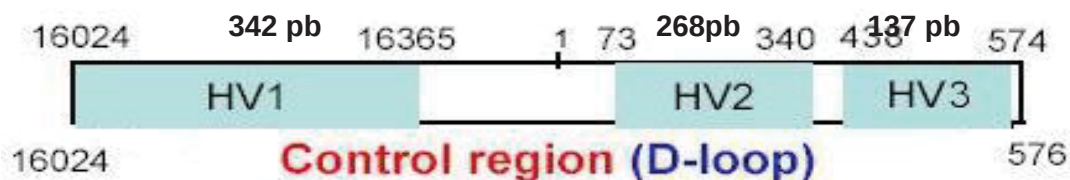
1.2. Região hipervariável do DNA mitocondrial

O DNA mt é dividido em duas regiões: codificadora e não-codificadora. A região não-codificadora, formada por aproximadamente 1200 pb de comprimento (VANECEK; VOREL; SIP, 2004), é altamente polimórfica sendo utilizada para o

propósito da genética forense. Esta região pode ser denominada de diferentes formas: Região Controle, *D-loop* e Hipervariável. A denominação de região Controle refere-se ao fato desta região conter o sinal que controla a síntese de RNA e DNA. *D-loop* refere-se ao fato de que na fase inicial de replicação, quando a nova fita recém-sintetizada se desprende da fita molde forma-se uma “bolha” ou “loop” (PANETO, 2006). Esta mesma sequência também é conhecida como região Hipervariável por acumular mutações pontuais aproximadamente dez vezes mais comuns do que o DNA nuclear (BUDOWLE *et al.*, 2003), e quando comparada com o genoma nuclear, possui uma alta taxa evolutiva. Sendo assim, o estudo do DNA mt com base na análise de seus polimorfismos tem sido muito utilizado em estudos evolutivos para a investigação de linhagens matrilineares antigas.

A região Controle do DNA mt inclui três sub-regiões denominadas: HV1 (posição 16.024 - 16.365, formada por 342 pb), HV2 (posição 73 -340, formada por 268 pb), e HV3 (posição 438 – 574, formada por 137 pb). Sendo a última região, HV3, um segmento que pode apresentar um tamanho variável de pares de base, pelo fato de conter repetições dinucleotídicas “CA” e o número de repetições podem variar de um indivíduo para outro (LUTZ *et al.*, 2000; VANECEK *et al.*, 2004). Entre essas regiões existem duas outras denominadas inter-regiões, sendo a primeira entre HV1 e HV2 (posição 16365 a 73), e a segunda entre HV2 e HV3 (posição 340 a 438) (Figura 2). Um estudo realizado LUTZ *et al.*, 2000 comprova que as inter-regiões apresentam um baixo número de polimorfismos quando comparada às regiões hipervariáveis.

Figura 2 – Esquema da Região Controle, Hipervariável ou *D-loop* do DNA mitocondrial;



Fonte: BUTLER, J. M. Forensic DNA Typing. London: Elsevier Academic Press, 2011.

As duas primeiras regiões (HV1 e HV2) são utilizadas na rotina forense, a terceira região, entretanto, vem sendo explorada nos últimos anos (BINI *et al.*, 2003; VANECEK; VOREL; SIP, 2004; HOONG; LEK, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006), além de ser importante para a correta classificação de algumas amostras em seus respectivos haplogrupos (PARSON; BANDELT, 2007). Essas características fazem com que o sequenciamento completo da região Controle (*D-loop* ou Hipervariável) do DNA mt seja mais adequado, tanto para testes de identidade forense como para estudos evolucionários (BAASNER *et al.*, 1998).

Com o objetivo de obter informações adicionais, ou seja, aumentar o grau de discriminação do DNA mt, estudos recentes sugerem a tipagem adicional de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em outras regiões do DNA mt nos casos em que não é possível diferenciar os indivíduos apenas pela região hipervariável (FINNILÄ *et al.*, 2000; COBLE *et al.*, 2004, PANETO, 2010). Para a finalidade de estudos da evolução humana, o estudo de SNPs na região codificadora também parece ser adequado, isso porque a taxa de mutação elevada no DNA mt na região não-codificadora pode apresentar substituições

complicadas, o que pode dificultar a análise filogenética. Recentemente, SNPs localizados na região codificadora do DNA mt tornou-se um ponto de acesso (“*hotspot*”) em diversos estudos (HUANG *et al.*, 2010). Muitas tecnologias de alta capacidade estão agora disponíveis para genotipagem de SNPs (SOBRINO; BRION; CARRACEDO, 2005), e um exemplo de uma técnica que está sendo muito utilizada é o SNaPshot (UMETSU; YUASA, 2005).

1.3. Utilização do DNA mitocondrial como marcador genético forense

O perfil genético de um indivíduo, utilizado na identificação humana, é baseado na combinação de diversos marcadores que são herdados de seus progenitores. Esses marcadores são geralmente diferenças nas sequências de DNA nuclear entre os indivíduos (polimorfismos) (PANETO, 2010).

A tecnologia mais recente, utilizada na área de identificação humana, consiste na amplificação de regiões *Short Tandem Repeats* (STRs), pela reação de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), um processo *in vitro* que aumenta a quantidade de um fragmento pequeno de DNA previamente selecionado (MULLIS; FALOONA, 1987). A análise de STRs do DNA nuclear é utilizada como método padrão na identificação humana devido a grande capacidade de discriminação entre os indivíduos. Em alguns casos, entretanto, a análise dos STRs nucleares pode não ser bem sucedida. Isso ocorre quando o DNA da amostra apresenta-se degradado, ou ainda em situações onde o material biológico apresenta pouco ou nenhum DNA nuclear (SALAS; LAREU; CARRACEDO, 2001; TSUTSUMI *et al.*, 2006). Nestes casos, uma das

alternativas, é a análise do DNA mitocondrial. Assim, o DNA mt é utilizado na rotina forense para analisar ossos, dentes, fios de cabelos e outras amostras biológicas nas quais o conteúdo de DNA nuclear é pequeno ou encontra-se degradado (BUDOWLE *et al.*, 2003). A utilidade, aplicação e validação da utilização do DNA mt na análise forense estão bem documentadas (GINTHER *et al.*, 1992; WILSON *et al.*, 1995; IMAIZUMI *et al.*, 2005). Alguns fatos importantes comprovam como a análise do DNA mt é de grande importância no contexto forense, sendo esta a primeira ferramenta utilizada na identificação de ossadas de soldados americanos que lutaram na Guerra do Vietnam (HOLLAND; FISHER; MITCHELL, 1993) e na identificação das vítimas da tragédia de 11 de setembro de 2001 no *World Trade Center* (EUA). Outro exemplo interessante da utilização do DNA mitocondrial foi realizado na década de 1990, em um estudo de parentesco, no qual cientistas americanos foram convidados a examinar ossos e dentes de oito esqueletos de uma cova na Sibéria, onde acreditava-se estar enterrada a família real russa Romanov, executados pelos bolcheviques. Neste caso, os resultados do sequenciamento do DNA mt elucidou que havia vínculo genético entre as ossadas (FARAH, 2007).

1.4. Utilização do DNA mitocondrial em estudos da evolução humana

Além da sua utilização na rotina forense para identificação de um indivíduo, o DNA mt passou a ser utilizado, nos últimos anos, com outra finalidade: o estudo da evolução humana (SILVA; BORTOLINI; SCHNEIDER, 2006). O DNA mt possui várias propriedades que o torna uma molécula útil para inferir a estrutura genética

na história evolutiva das populações humanas (STONEKING *et al.*, 1989). Em primeiro lugar, o DNA mt é analisado por causa do elevado número de cópias por célula e também pela sua localização em uma organela citoplasmática. Em segundo lugar, o DNA mt é haplóide apresentando uma herança estritamente materna (HUTCHINSON *et al.*, 1974; GILES *et al.*, 1980; LUTZ *et al.*, 2000; PENA *et al.*, 2000) o que leva a importantes consequências: (1) as árvores genéticas que relacionam os diferentes tipos de DNA mt podem ser interpretadas como genealogias, refletindo a história materna de uma população ou espécie (WILSON *et al.*, 1985; AVISE, 1986; VAN OVEN; KAYSER, 2008); (2) o tamanho efetivo do genoma mitocondrial é cerca de um quarto do genoma nuclear (BIRKY; MARUYAMA; FUERST, 1983), levando a uma maior taxa de diferenciação local do DNA mt por deriva genética (STONEKING *et al.*, 1989); (3) o DNA mt evolui cinco a dez vezes mais rápido do que o DNA nuclear, com mutações acumulativas (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979; BROWN *et al.*, 1982; WILSON *et al.*, 1989). Esta rápida evolução das sequências do DNA mt significa que a diferenciação populacional será acelerada, aumentando ainda mais a utilidade do DNA mt em estudar populações estritamente relacionadas (STONEKING *et al.*, 1989); (4) a disponibilidade da sequência completa de um indivíduo (ANDERSON *et al.*, 1981) permite a comparação dos padrões de fragmentos observados com padrões de fragmentos esperados a partir da sequência completa (ANDERSON *et al.*, 1981) e assim, a localização da substituição de nucleotídeos responsáveis pelos sítios de restrição polimórficos podem ser na maioria das vezes precisamente deduzido (CANN; BROWN; WILSON, 1984; STONEKING; BHATIA; WILSON, 1986). Atualmente, é possível

mapear centenas de sítios polimórficos do DNA mt, permitindo que muitos tipos de DNA mt possam ser distinguidos (STONEKING *et al.*, 1989).

Desde o primeiro estudo aprofundado da variação da evolução humana pela análise do DNA mt, há aproximadamente 30 anos (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979), este tipo de análise tornou-se amplamente utilizada em estudos da evolução humana, migrações e na formação da história de diversas populações (PAKENDORF; STONEKING, 2005). A utilização do DNA mt como ferramenta para investigações desta natureza surgiu com os estudos pioneiros do grupo liderado por Allan Wilson nos anos 80 (WILSON *et al.*, 1985; CANN *et al.*, 1987; VIGILANT *et al.*, 1991). Estes e outros pesquisadores demonstraram que vários parâmetros de interesse para o resgate de nossa história evolutiva, demográfica e migratória poderiam ser obtidos de forma consistente através de marcadores de linhagens, neste caso em particular com o uso do DNA mitocondrial (GUERREIRO, 2007).

Não há dúvida de que análise do DNA mt é aceita como ferramenta tanto para análises forenses quanto para estudos genéticos evolutivos. No entanto, é preciso um conhecimento aprofundado das várias características do DNA mt, a fim de analisar e interpretar corretamente os resultados. Estes incluem questões como nomenclaturas, referências de bancos de dados de diversas populações, heteroplasmias e recombinações artificiais (BUDOWLE *et al.*, 2003). Os erros mais comuns são a recombinação artificial de haplótipos de HV1 e HV2, em que os haplótipos são construídos pelo sequenciamento das regiões dessas regiões hipervariáveis do DNA mt especificamente para o banco de dados ou através da coleta de sequências publicada na literatura, são erros inerentes à química do

sequenciamento de DNA (ALVES *et al.*, 2005). A forma correta de interpretar um resultado de DNA mt ainda não foi padronizada, existindo apenas recomendações, como por exemplo o adotado pelo *Federal Bureau of Investigation* - FBI (SWGDM, 2003) ou as publicadas pelo GHEP-ISFG, *Grupo de Habla Española y de la Portuguesa* (<http://www.gep-isfg.org>). Muitos laboratórios não adotam as regras sugeridas pelo FBI por considerarem regras simplistas, pois elas não levam em consideração a taxa de mutação de cada posição nucleotídica e de cada tecido (PRIETO *et al.*, 2008; PANETO, 2010).

1.5. Exames Forenses e Análise Filogenética do DNA mitocondrial

A maior parte da variação de sequência entre indivíduos é encontrada dentro de dois segmentos específicos da região controle: HV1 e HV2 (BUDOWLE *et al.*, 2003). Por esse motivo, o sequenciamento de nucleotídeos dessas duas regiões hipervariáveis na origem de replicação do DNA mt são amplamente utilizados na rotina forense para análise do DNA mt (HUANG *et al.*, 2010). Essa identificação baseia-se na identificação dos polimorfismos presentes nesses segmentos (SNPs, inserções e deleções/*indels*) (BUDOWLE *et al.*, 2003). No entanto, tais regiões fornecem um limitado poder de discriminação em um contexto forense (HUANG *et al.*, 2010). A adição de HV3 e das regiões intermediárias (análise de toda região hipervariável), apesar de não incrementarem tanto a diversidade haplotípica, adicionam informações complementares que podem ser importantes na solução de casos forenses, e principalmente em estudos de frequência populacional. Por esse motivo, atualmente recomenda-se sequenciar toda a

região controle do DNA mt. Um estudo realizado por LUTZ *et al.* (2000) mostrou que, em determinados casos, onde não se é possível determinar a origem matrilinear de um indivíduo apenas pela análise de HV1 e HV2, faz-se necessário a adição de HV3.

1.6. Classificação em Haplogrupos

As posições de nucleotídeos (sítios) do genoma mitocondrial humano são numeradas de 1 a 16.569, de acordo com a *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) (ANDERSON *et al.*, 1981; ANDREWS *et al.*, 1999). Detectados os polimorfismos, estes são então marcados como diferenças ("mutações") quando comparados com a rCRS. Alguns sítios individuais são considerados "hotspots" mutacionais, ocorrendo com uma maior frequência (por exemplo, as posições 146, 150, 152, 195, 16189 e 16311 e 16362 e 16519), enquanto outros parecem relativamente estáveis (por exemplo, posições 477, 493, 16108, 16219) (VAN OVEN; KAYSER, 2008). A maior taxa de mutação na região controle do DNA mt, relativamente rica em variação da sequência, é de grande interesse para pesquisadores na classificação em haplogrupos.

O termo "haplogrupo" refere-se ao conjunto de haplótipos derivados por descendência da mesma molécula ancestral, possuindo o mesmo padrão basal de mutações. Os haplogrupos são definidos por motivos, constituídos de nucleotídeos particulares presentes nas regiões não-codificadora e codificadora do DNA mt (UMETSU; YUASA, 2005). Determinar a relação entre haplótipos e

haplogrupos do DNA mt humano fornece informações mais detalhadas sobre a estrutura da variação genética humana (BUDOWLE *et al.*, 2003).

Com base nas tentativas de aproximação para desvendar a história da linhagem do DNA mt, a abordagem baseada nos haplogrupos tenta estudar a pré-história das populações individuais, de regiões geográficas, ou das migrações populacionais usando grupos populacionais humanos como unidade de estudo e a aplicação de métodos de genética populacional de dados (PAKENDORF; STONEKING, 2005).

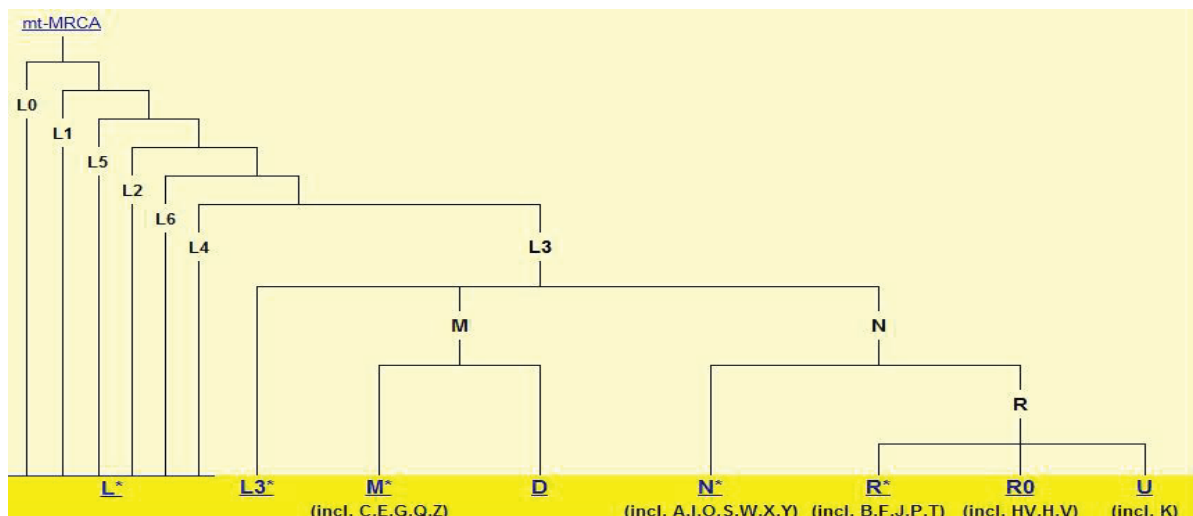
A classificação em haplogrupos do DNA mt pelo estudo de SNPs da região codificadora também é útil para a área forense. A classificação filogenética dá suporte ao banco de dados permitindo a detecção de incoerências nos resultados (BANDELT *et al.*; 2006; PEREIRA *et al.*, 2000). Além disso, essa classificação permite o estudo da composição genética matrilinea de nossa população, fortalecendo geneticamente os fatos históricos de colonização em nosso país (ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

A nomenclatura utilizada para haplogrupos é designada por letras do alfabeto e foi inicialmente utilizada por Torroni *et al.* (1993), o qual diferenciou uma amostra de nativo-americano em quatro grupos basais (A, B, C, D) baseados na análise de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Haplogrupos posteriormente detectados foram designados usando outras letras do alfabeto. Subgrupos dentro de um haplogrupo, sub-haplogrupos, são designados por números, como por exemplo L1 e L2, pertencentes ao haplogrupo L. A nomenclatura para os sub-agrupamentos adicionais segue a alternativa letra-número-letra, em ordem crescente alfabética e numérica a partir do último grupo

publicado, como por exemplo L1c. O símbolo “asterisco” é utilizado para denotar membros de um haplogrupo que não pertencem a nenhum dos sub-haplogrupos já denominados, por exemplo, HV* apresenta polimorfismos que não permitem classificá-lo nem como HV1, R0 ou qualquer um dos sub-haplogrupos de H (BANDELT *et al.*, 2006). Atualmente, essa nomenclatura é baseada na análise conjunta de polimorfismos da região controle (HV1, principalmente) e polimorfismos da região codificadora.

A fim de facilitar a utilização da variação global dos haplogrupos classificados por meio do DNA mt humano foi construída uma abrangente e atualizada árvore filogenética mitocondrial (Figura 3), com base em mutações presentes nas regiões não-codificadora e codificadora (as mutações 309.1C, 315.1C, AC *indels* em 515-522, 16182C, 16183C, 16193.1C e 16519C não foram consideradas para a construção filogenética e, portanto, são excluídas da árvore). Esta árvore completa inclui tanto haplogrupos publicados anteriormente, como recém-identificados, sendo facilmente navegável e atualizada regularmente (disponível online <http://www.phylotree.org>) (Figura 3) (VAN OVEN; KAYSER, 2008). A importância de uma filogenia global detalhada do DNA mt foi abordada por diversos autores (RICHARDS, 2004; BANDELT *et al.*, 2005, 2006; KIVISILD *et al.*, 2006; KONG *et al.*, 2006; TORRONI *et al.*, 2006; SALAS *et al.*, 2007; VAN OVEN; KAYSER, 2008).

Figura 3 – Árvore Filogenética Simplificada do DNA mitocondrial



Fonte: <http://www.phylotree.org/tree/main.htm>. Acesso em: dezembro 2012.

Supõe-se que todos os tipos de DNA mt da espécie humana possuem um único ancestral matrilinear comum que viveu a cerca de 200.000 anos atrás na África (na figura 3 é representado por mt-MRCA) (MACAULAY, *et al.*, 2005; MISHMAR, *et al.*, 2003; BEHAR, *et al.*, 2008). Assim, as variações da sequência do DNA mt evoluíram como um resultado da acumulação sequencial de mutações ao longo de linhagens herdadas maternalmente, que podem ser representadas em uma árvore, refletindo as relações filogenéticas de variantes de DNA mt conhecidas (VAN OVEN; KAYSER, 2008). Os haplogrupos L são específicos, indicando a origem africana dos seres humanos, classificados com base em dados genéticos em estudos de fósseis. O haplogrupo L3 deu origem aos macrohaplogrupos M, N e R (o último é um subclado de N) (PAKENDORF; STONEKING, 2005; VAN OVEN; KAYSER, 2008), que abrangem toda a variação observada fora da África. A nomenclatura evoluiu de tal modo que, os haplogrupos representados pelas letras C, E, G, Q e Z designam linhagens

pertencentes a M*; os haplogrupos A, I, O, S, W, X e Y são de linhagens dentro do haplogrupo N*; B, F, J, P e T designam linhagens dentro do haplogrupo R; HV, H e V designam linhagens pertencentes a R0 e K designa de uma linhagem pertencente a U (Figura 3).

Os haplogrupos são continental ou etnicamente específicos (RICHARDS *et al.*, 2000). Sete deles (L0, L1, L2, L3, L4, L5, L6) formam as linhagens africanas (VAN OVEN; KAYSER, 2008; SCHLEBUSCH *et al.*, 2009), dez (H, HV, I, J, K, T, U, V, W e X) englobam quase todas as linhagens de europeus, norte-africanos e caucasianos do leste-asiático (MACAULAY *et al.*, 1999; TORRONI *et al.*, 1994; FINNILA *et al.*, 2001). Os haplogrupos A, B, C, D, E, F, G e M englobam a maioria das linhagens descritas para a Ásia, Oceania e nativo-americanos (KIVISILD *et al.*, 2002; TORRONI *et al.*, 1993; KONG *et al.*, 2003) (Figura 4).

Figura 4 – Migrações e variações dos haplogrupos classificados a partir do DNA mitocondrial.



Fonte: www.dnaroottester.com. Acesso em: agosto de 2012.

1.7. Banco de Dados

A criação de banco de dados de DNA mt para estimar a frequência dos haplótipos em determinada população é indispensável para permitir sua utilização. Entretanto, por estar sujeito a vários tipos de erros, principalmente humanos (na leitura e digitação de dados, por exemplo), existe a necessidade de estabelecer regras de controle de qualidade tanto na geração de resultados como na compilação dos mesmos (PANETO, 2010). Atualmente, existem algumas ferramentas que podem ser utilizados para evitar que esses erros humanos sejam cometidos – ex. MITOMAP (*mtDNA Control Region Sequence Polimorphisms* - <http://mitomap.org/MITOMAP>) e IAN LOGAN (<http://www.ianlogan.co.uk/mtDNA.htm>) , os quais permitem comparar se todos os polimorfismo encontrados já foram descritos na literatura.

Diversos pesquisadores geraram milhares de bases de dados de genomas mitocondriais completos de seres humanos de todos os continentes, bem como uma nomenclatura detalhada dos tipos de DNA mt ou haplogrupos em todo o mundo, e uma enorme árvore filogenética dos haplogrupos observados, sub-haplogrupos e macrohaplogroups (BANDELT, 2006). No campo da identificação humana, as revistas científicas de maior impacto já exigem que os dados de trabalhos, envolvendo análises de DNA mt e outros tipos de análises gerado por pesquisadores, sejam adicionadas à bancos de dados para que se possam publicados. Um exemplo de banco de dados que está sendo desenvolvido com rigorosos parâmetros de qualidade é o banco de dados mundial EMPOP (PARSON; DUR, 2007). A padronização da geração, análise e transferência de

dados, além do uso de softwares que permitem a visualização de dados, interpretação e detecção de erros, garantem a qualidade dos resultados (PARSON; BANDELT, 2007).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO

Poucos laboratórios dispõem do *know-how* necessário para análise e interpretação dos resultados do DNA mt, por esse motivo a sua utilização em casos forenses no Brasil é restrita. Por essa razão e visto que existem poucos dados sobre a frequência dos haplótipos do DNA mt na população brasileira, faz-se necessário um estudo dessa natureza com a geração de resultados de alta qualidade para que sejam organizados bancos de dados com frequências da nossa população, o que viabilizará sua aplicação no contexto forense brasileiro, assemelhando-se ao que vem sendo feito internacionalmente. Existem, atualmente, algumas publicações e trabalhos com DNA mt em algumas regiões do Brasil: na região Nordeste (estado de Alagoas) (BARBOSA *et al*, 2008), no Norte do país (estado do Pará) (FEIO-DOS-SANTOS *et al*, 2006), no Sul (estado de Santa Catarina) (PALENCIA *et al*, 2010) e na região Sudeste (estado de São Paulo) (PANETO, 2010). A maioria dos trabalhos relacionados com a análise da região controle do DNA mt, realizam o sequenciamento somente da região HV1, pelo fato desta ser a mais polimórfica e apresentar uma maior diversidade haplotípica quando compara as demais regiões.

A escolha do projeto de análise de polimorfismos da região controle do DNA mt em indivíduos nascidos e residentes no Espírito Santo - Brasil, ocorreu pela ausência de dados relatados na literatura sobre as frequências haplotípicas do DNA mt nesta população. Assim, uma parceria com a Dra. Greiciane Gaburro Paneto (CCA-UFES), para a aquisição das amostras e também pelo fato de sua

experiência na área por já ter realizado um projeto muito semelhante com amostras de São Paulo, foram decisivos para a execução deste projeto.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Realizar o sequenciamento de toda a região hipervariável do DNA mt (aproximadamente 1200 nucleotídeos) de 100 indivíduos nascidos e residentes no estado do Espírito Santo, Brasil;
- Calcular os índices de diversidade (diversidade haplotípica, probabilidade de semelhança, número de haplótipos e sítios polimórficos) da região hipervariável do DNA mt a partir dos dados obtidos das análises com o sequenciamento;
- Classificar as amostras em seus respectivos haplogrupos através dos polimorfismos (haplótipos) obtidos na reação de sequenciamento;
- Comparar os resultados obtidos da população estudada com os resultados de populações descritas na literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP/Araraquara (FCFAR-UNESP) (CEP/FCF/CAr n. 13 /2011) (Anexo A).

4.2. Casuística

Foram utilizadas neste trabalho amostras de sangue de 100 indivíduos e os critérios de inclusão foram que fossem nascidos e residentes no estado do Espírito Santo e que não fossem aparentados. A coleta do material biológico foi realizada no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo – HEMOES, no momento da triagem dos doadores. Antes da coleta, cada doador (voluntário) assinou um termo de consentimento livre e esclarecido referente ao projeto de pesquisa (Anexo B). As demais etapas desse projeto foram realizadas no Laboratório de Investigação de Paternidade do Núcleo de Atendimento à Comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara – SP.

4.3. Sequenciamento da Região Hipervariável do DNA Mitocondrial

4.3.1. Extração do DNA em amostras de sangue

A amostra sanguínea de cada indivíduo 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 3 mm de papel FTA foram cortados utilizando *Harris Micro Punche e Cutting Mat* (Whatman) e o DNA foi extraído utilizando a resina *Chelex* (SINGER-AS; TANGUAY; RIGGS, 1989).

O protocolo da Extração por *Chelex* (por amostra) está descrito a seguir: em tubo de 1,5 mL, foram colocados 2 discos de papel contendo a amostra (sangue), adicionou-se 50 µL de água ultrapura Mili-Q submetendo-se ao vortex e a água foi descartada. Adicionou-se mais 50 µL de água ultrapura Mili-Q e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos. Após isso, a amostra foi centrifugada por 1 minuto (14.000 rpm) e em seguida, descartou-se a água. Adicionou-se, então, 100 µL de *Chelex* 5% incubando-se por uma hora a 56 °C. A amostra foi então vortexada e incubada por 8 minutos a 100 °C. Para finalizar, centrifugou-se 14.000 rpm as amostras por 3 minutos e a parte do sobrenadante foi transferida cuidadosamente para um novo microtubo para que a resina precipitada não fosse aspirada. Ao fim da extração, cada uma das amostras foi quantificada (ng/µL) no quantificador *NanoVue Plus* (GE healthcare) e armazenadas a -20 °C.

4.3.2. Reação de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

Toda a região hipervariável do DNA mitocondrial (aproximadamente 1.200 nucleotídeos) foi amplificada em tubos de 0,2 mL conforme o protocolo abaixo:

2,5 µl de *GoldStar Buffer* (Promega);

0,2 µl (1U) de *AmpliTaqGold DNA polymerase* (Applied Biosystems by Life Technologies);

0,2 µM de cada iniciador (HV1-L15997 e HV3-R639) (Tabela 1);

1 a 5 ng de DNA;

Água ultrapura (Milli-Q) autoclavada qsp. 25 µl.

Os fragmentos foram amplificados em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer) conforme a ciclagem abaixo:

95 °C por 11 minutos¹

96 °C por 1 minuto

94 °C por 30 segundos

56 °C por 30 segundos²

72 °C por 90 segundos

} 40 ciclos

60 °C por 11 minutos

4 °C ∞

¹ Etapa necessária para ativação da enzima *AmpliTaqGold DNA polimerase*.

² Na fase de anelamento dos iniciadores a 56 °C foi utilizado uma rampagem de 60%.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na reação de PCR e sequenciamento.

	<i>Iniciador</i>	<i>Orientação</i>	<i>Sequência</i>
HV1	L15997	Forward	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'
	H16401	Reverse	5'-TGATTTACACGGAGGATGGTG-3'
	L16209 ⁽¹⁾	Forward	5'-CCCATGCTTACAAGCAAGT-3'
	R16164 ⁽¹⁾	Reverse	5'-TTGATGTGGATTGGGT-3'
HV2	L29	Forward	5'-GGTCTATCACCTATTAACCAC-3'
	H159	Reverso	5'-AAATAATAGGATGAGGCAGGAATC-3'
	H285 ⁽¹⁾	Reverse	5'-GGGGTTTGGTGGAAATTTTTTG-3'
	H408	Reverso	5'-CTGTAAAAGTGCATACCGCCA-3'
HV3	F314	Forward	5'-CCGCTTCTGGCCACAGCACT-3'
	639R	Reverso	5'-GGGTGATGTGAGCCCGTCTA-3'
	599R ⁽¹⁾	Reverse	5'-TTGAGGAGGTAAGCTACATA-3'

Nota: (1) Iniciadores internos à sequência de interesse foram utilizados, em substituição aos iniciadores diretos originais, quando não for possível obter a leitura da sequência devido à presença de heteroplasmia de comprimento.

Após a amplificação dos fragmentos, a avaliação dos produtos da reação de PCR e sua quantificação foram realizadas visualmente por eletroforese em gel de agarose 1 % (Cuba *Horizon* 58, Model 200 - Gibco) por 15 minutos a 100 volts, utilizando 3 µl do produto da PCR. A intensidade das bandas foi comparada com as do marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen), após coloração com Brometo de Etídio (BrEt).

4.3.3. Purificação do Produto de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

Os produtos de PCR (~1200 nt) foram purificados previamente à realização da reação de sequenciamento para retirada dos nucleotídeos não incorporados e excesso de iniciadores, utilizando *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Após a purificação do produto de PCR, as amostras purificadas foram quantificadas (ng/ μ L) em quantificador *NanoVue Plus* (GE healthcare) e armazenados sob-refrigeração de acordo com as instruções do fabricante até o momento do uso.

4.3.4. Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em ambas as fitas do DNA, utilizando os iniciadores (Tabela 1) em tubos de 0,2 mL conforme o protocolo abaixo:

2 μ L de *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems by Life Technologies);
1 μ L de tampão do kit *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems by Life Technologies);
1 μ L do iniciador direto ou reverso (3,2 picomolar);
Produto de PCR purificado (Tabela 2);
Água ultrapura (Mili-Q) autoclavada qsq. 10 μ L.

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer) conforme a ciclagem abaixo:

96 °C por 1 minuto

96 °C por 10 segundos

56 °C por 10 segundos

60 °C por 4 minutos

4 °C ∞

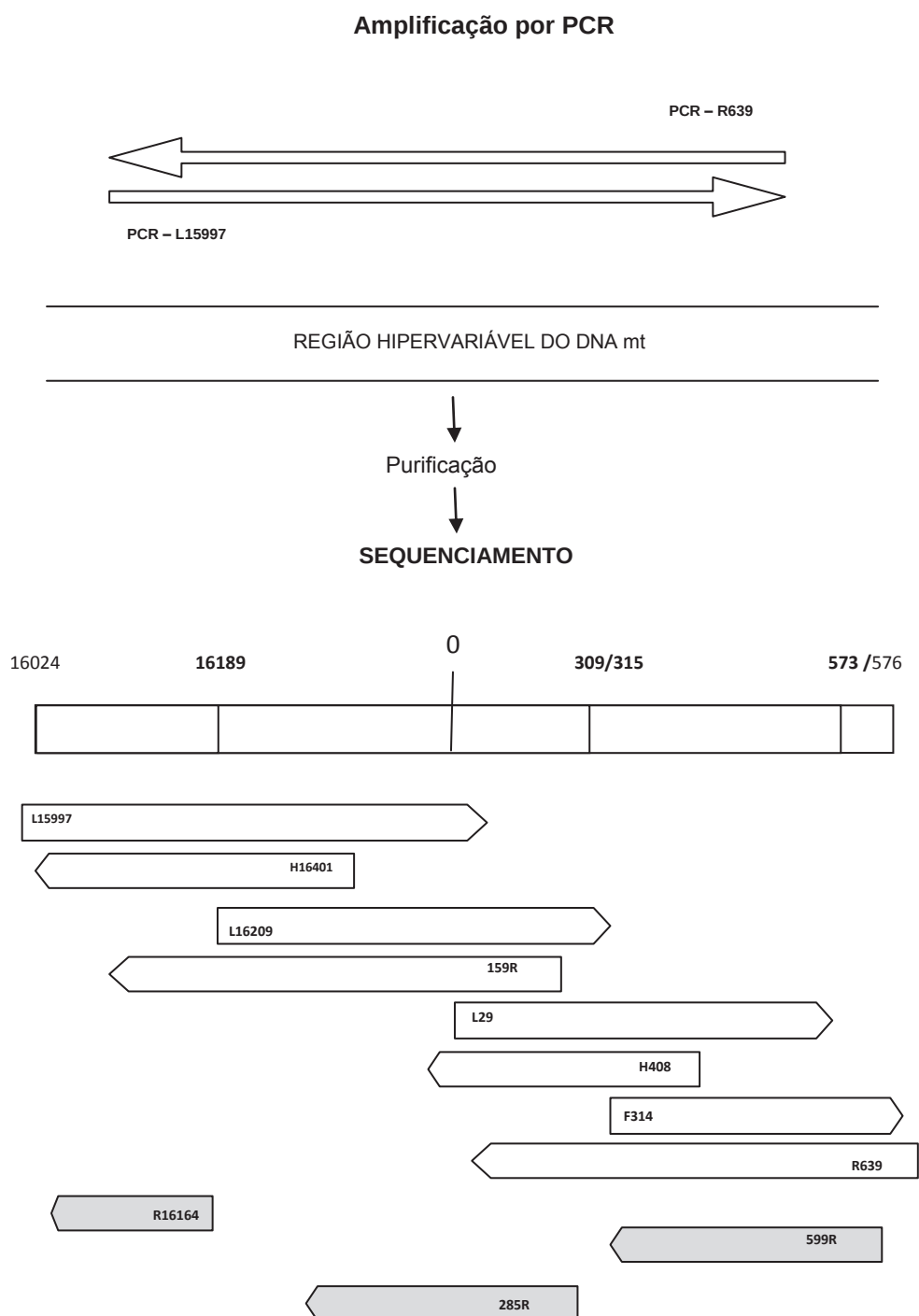
25 ciclos

Tabela 2 – Concentração das amostras utilizadas na Reação de Sequenciamento.

<i>Fragmento (pb)</i>	<i>Concentração (ng/μL)</i>
100 – 200	1 a 3
200 – 500	3 a 10
500 – 1000	5 a 20
1000 – 2000	10 a 40
> 2000	40 a 100

Um esquema dos iniciadores utilizados na amplificação por PCR e sequenciamento pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema da localização dos iniciadores utilizados na PCR e sequenciamento indicados na Tabela 1.



Nota: iniciadores extras destacados na parte inferior da figura. As posições 16189 e 309/315 são regiões poli-C, a posição 573 apresentam repetições variáveis dinucleotídicas CA.

Fonte: (Figura modificada de Parson; Bandelt, 2007, por PANETO, 2010).

4.3.5. Purificação e precipitação do produto da reação de sequenciamento

Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados para retirada de nucleotídeos não incorporados através da técnica de purificação e precipitação com etanol/EDTA.

4.3.6. Eletroforese das amostras em analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems by Life Technologies)

As amostras foram ressuspensas em placa utilizando Formamida HI-DI conforme o protocolo descrito a seguir: Foram adicionados diretamente na placa 10 µL de Formamida HI-DI (Applied Biosystems by Life Technologies). A placa foi agitada em agitador de tubos *FINEMIXER SH2000*, durante 1 minuto. Após ser agitada, deu-se um “spin” (centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos) (Eppendorf Centrifugal 5417R). A placa onde a amostra foi aplicada foi submetida a um “spin” e aquecida a 95 °C em termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Perkin Elmer) com a tampa aberta por 3 minutos. Em seguida, a placa foi colocada em gelo por aproximadamente 3 minutos e submetida à eletroforese capilar, e submetida à eletroforese capilar no analisador genético *ABI 3500* (Applied Biosystems by Life Technologies).

Na eletroforese, utilizou-se o polímero POP-7 (Applied Biosystems by Life Technologies) e capilar de 50 cm (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.3.7. Análise das sequências do DNA mitocondrial

As análises dos resultados obtidos foram realizadas com programa *BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) conforme proposto no projeto, e revisadas com o programa *SeqScape* v. 2.7 (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.3.8. Classificação em Haplogrupos

A classificação em haplogrupos foi gerada a partir dos resultados do sequenciamento da região controle do DNA mt, pelo Phylotree.org (VAN OVEN; KAYSER, 2009), sendo que para a predição dos haplogrupos utilizou-se o banco de dados *mtDNAManager* (LEE *et al.*, 2008). Para a verificação das análises foram utilizados os sites MITOMAP: *mtDNA Control Region Sequence Polymorphisms* (<http://mitomap.org/MITOMAP>) e IANLOGAN (<http://www.ianlogan.co.uk/checker/genbank.htm>), que são bancos de dados que contêm um grande número de polimorfismos. Os cálculos dos índices de diversidade das amostras foram realizados utilizando o software Arlequin v 3.5.1.2. Heteroplasmias de comprimento (inserções de C) nas posições 16193, 309 e 573 foram desprezadas (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Sequenciamento da Região Hipervariável do DNA Mitocondrial

De um total de 100 amostras, 94 haplótipos diferentes foram encontrados quando analisada toda a região hipervariável do DNA mt (desconsiderando as regiões poli-C presentes nas posições 16193, 309 e 573). Dentre eles 4 haplótipos foram compartilhados por 2 indivíduos e um único haplótipo foi compartilhado por 3 indivíduos (Tabela 3), e 89 haplótipos foram únicos.

Dentre os 1.124 nucleotídeos presentes na região hipervariável (posição 16024 a 576), 190 (16,9%) posições nucleotídicas apresentaram-se polimórficas. Analisando apenas a região HV1 e HV2 encontraram-se 135 sítios polimórficos (desconsiderando as inter-regiões). Incluindo-se a região HV3, esse valor aumentou para mais 15 sítios polimórficos. Isso nos permitiu confirmar que, HV3 é também uma região polimórfica assim como HV1 e HV2, podendo ser utilizada para identificação humana, principalmente nos casos em que as regiões HV1 e HV2 não forem suficientemente discriminatórias (LUTZ *et al.*, 2000). Os haplótipos obtidos neste trabalho podem ser visualizados no Apêndice A.

Tabela 3 – Haplótipos distintos encontrados em mais de um indivíduo na amostra populacional (16024-576).

<i>Haplogrupo</i> [*]	<i>Haplótipo</i>							<i>N</i>
C1aC1c	73G	193G	249DEL	263G	290DEL	291DEL	489C	2
	16166G	16223T	16224C	16260T	16298C	16325C	16327T	
			16356C	16519C				
L1b1*	73G	152C	182T	185T	195C	247A	263G	2
	357G	523DEL	524DEL	16126C	16187T	16189C	16223T	
		16264T	16270T	16278T	16311C	16519C		
L2b1	73G	150T	152C	182T	195C	198T	204C	2
	263G	418T	523DEL	524DEL	16114A	16129A	16213A	
	16223T	16278T	16284G	16355T	16362C	16390A		
L3e2b	73G	150T	195C	263G	16172C	16183C	16189C	2
		16194C	16223T	16320T	16519C			
I2	73G	152C	199C	204C	207 ^a	250C	263G	3
		16129A	16223T	16390A	16391A	16519C		

Nota: "N" corresponde ao número de amostras. (*) lista de atualizações recentes na <http://mtmanager.yonsei.ac.kr>

A probabilidade de encontrarmos dois indivíduos não relacionados com perfis idênticos nas amostras analisadas (probabilidade de semelhança) foi de 1,14% e a diversidade haplotípica calculada foi de 0,9986 +/- 0,0017, para toda a região hipervariável do DNA mt, desconsiderando as inserções e deleções presentes nas regiões poli-C. As análises estatísticas de toda região hipervariável (16024-576) e de cada uma das regiões hipervariáveis HV1, HV2 e HV3 em separado e agrupadas podem ser visualizadas na tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros estatísticos calculados a partir da análise de toda a região hipervariável de cada uma das regiões hipervariáveis em separado e agrupadas nos 100 indivíduos.

Parâmetros Estatísticos	HV1	HV2	HV3	HV1+2	HV1+2+3	16024-576
Número de haplótipos	82	56	19	91	92	94
Diversidade haplotípica	0,9947+/- 0,0025	0,9745+/- 0,0069	0,7766+/- 0,0314	0,9976+/- 0,0020	0,9982+/- 0,0018	0,9986+/- 0,0017
Probabilidade de semelhança	1,52%	3,52%	23,12%	1,24%	1,18%	1,14%
Transições observadas	82	39	11	121	132	154
Transversões observadas	14	5	0	19	19	39
Substituições observadas	91	41	11	132	143	183
Deleções observadas	0	3	4	3	7	7
Comparação pareada entre haplótipos	8,044444 +/- 3,767310	5,486667 +/- 2,661912	1,873333 +/- 1,080754	13,531111 +/- 6,131603	15,404444 +/- 6,938026	1,373939 +/- 7,785625
Diversidade nucleotídica	0,023522 +/- 0,012201	0,020473 +/- 0,011001	0,013381 +/- 0,008550	0,022182 +/- 0,011133	0,020539 +/- 0,010246	0,015457 +/- 0,007672
Sítios polimórficos	91	44	15	135	150	190
Nucleotídeos editados	342	268	137	610	747	1124

Nota: Os cálculos dos resultados dos parâmetros estatísticos foram realizados pelo software Arlequin v 3.5.1.2.

Dentre as três regiões hipervariáveis, confirmou-se que a região HV1 apresentou maior diversidade haplotípica, seguida de HV2 e HV3 (Tabela 4). A

análise conjunta de HV1 e HV2, que comumente é utilizada na prática forense, resultou em um incremento significativo da diversidade. A adição de HV3 e das outras regiões intermediárias (inter-regiões), totalizando assim toda a região hipervariável, mostrou que, apesar de não incrementar tanto na diversidade haplotípica, adicionou informações complementares por serem também regiões polimórficas, demonstrando que podem ser importantes na solução de casos forenses (LUTZ *et al.*, 2000).

5.2. Comparação dos parâmetros estatísticos com o de outras populações brasileiras

Quando comparamos os resultados deste trabalho com o de outras regiões do Brasil, utilizamos apenas a região HV1, visto que nem todos os autores analisam todas as regiões hipervariáveis. Na tabela 5, podemos verificar que os resultados deste trabalho são semelhantes aos obtidos por PANETO *et al.*, 2010 para o estado de São Paulo. Isso pode ser explicado pelo fato de ambos os estados serem pertencentes à região Sudeste. Além disso, estão bem próximos dos resultados publicados para a região Nordeste do país (estado do Alagoas) (Tabela 5). Os resultados da região Norte do país (estado do Pará) apresentaram uma diversidade inferior à região Sudeste e Nordeste, por possuir uma maior proporção de haplogrupos nativo-americanos em sua constituição. Os resultados da região Sul (Santa Catarina) foram os que apresentaram a menor diversidade. Isso se deve, provavelmente, a grande proporção de indivíduos de origem

européia, os quais apresentam menor diversidade haplotípica (SALAS *et al.*, 1998).

Tabela 5 – Índices de diversidade das populações do Sudeste, Sul, Nordeste e Norte do Brasil para a região HV1.

Estatística Populacional	Sudeste (ES)	Sudeste (SP)	Sul (SC)	Nordeste (AL)	Norte (PA)
N	100	160	80	167	158
Número de Haplótipos	94	121	ND	124	49
Diversidade Haplotípica	0,9947+/- 0,0025	0,9939+/- 0,0021	0,9684+/- 0,0124	0,9934+/- 0,0020	0,989+/- 0,0067
Probabilidade De Semelhança	1,52%	1,23%	4,37%	1,25%	2,8%
Referência	Este Trabalho	Paneto <i>et al.</i> , 2010.	Palencia <i>et al.</i> , 2010.	Barbosa <i>et al.</i> , 2008.	Feio-dos-Santos <i>et al.</i> , 2006.

Nota: “N” corresponde ao número de indivíduos analisados. ND: Não Declarados. (ES) Espírito Santo, (SP) São Paulo, (SC) Santa Catarina, (AL) Alagoas e (PA) Pará.

Uma comparação mais detalhada foi feita utilizando outros dados estatísticos (número de haplótipos, diversidade haplotípica, probabilidade de semelhança, transições observadas, tranversões observadas, substituições observadas, deleções observadas, comparação entre haplótipos, diversidade nucleotídica, sítios polimórficos), além dos já descritos na tabela anterior (Tabela 5), entre a população estudada com a do estado de São Paulo. Neste caso, utilizando as regiões HV1, HV2 e HV1+HV2, o que confirmou a semelhança entre parâmetros estatísticos dos dois estados pertencentes à região Sudeste (Tabela 6). Sendo

importante resaltar que o número de indivíduos estudados é diferente nas duas populações (Espírito Santo, 100 indivíduos e São Paulo, 160 indivíduos).

Tabela 6 - Parâmetros estatísticos das populações da região Sudeste do estado do Espírito Santo e São Paulo para a região HV1, HV2 e HV1+HV2.

Parâmetros Estatísticos	HV1(ES)	HV2(ES)	HV1+2(ES)	HV1(SP)	HV2(SP)	HV1+2(SP)
Número de haplótipos	82	56	91	121	75	136
Diversidade haplotípica	0,9947+/- 0,0025	0,9745+/- 0,0069	0,9976+/- 0,0020	0,9939+/- 0,0021	0,9642+/- 0,0078	0,9972+/- 0,0012
Probabilidade semelhança	1,52%	3,52%	1,24%	1,23%	4,19%	0,9%
Transições	82	39	121	95	43	138
Transversões	14	5	19	11	4	15
Substituições	91	41	182	106	47	153
Deleções	0	3	3	1	7	8
Comparação pareada entre haplótipos	8,044444 +/- 3,767310	5,486667 +/- 2,661912	13,531111 +/- 6,131603	8,050550 +/- 3,758206	4,979245 +/- 2,434421	13,312107 +/- 6,018481
Diversidade nucleotídica	0,023522 +/- 0,012201	0,020473 +/- 0,011001	0,022182 +/- 0,011133	0,023540 +/- 0,012163	0,018649 +/- 0,010092	0,021823 +/- 0,010920
Sítios polimórficos	91	44	135	94	52	146
Referência	Este trabalho			Paneto <i>et al.</i> , 2010.		

Nota: (ES) Espírito Santo e (SP) São Paulo.

5.3. Comparação dos parâmetros estatísticos com outras populações mundiais

Quando os resultados estatísticos de nossa amostra populacional foram comparados com os resultados de outras populações mundiais observou-se que, mesmo não possuindo um número tão grande de amostras genotipadas como a Suécia, o Egito e os EUA (Afri), os mesmos apresentaram uma altíssima diversidade haplotípica, resultante da grande miscigenação da população brasileira (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros estatísticos em nossa amostra populacional e em outras populações mundiais

<i>Estatística Populacional</i>	<i>Brasil</i>	<i>Argentina (Cent)</i>	<i>EUA(Afri)</i>	<i>EUA(Hisp)</i>	<i>Suécia</i>	<i>Egito</i>
N	100	193	248	128	335	277
Número de haplótipos	94	176	219	115	224	238
Diversidade haplotípica	0,9986	0,937	0,9985	0,9980	0,996	0,9986
Probabilidade de semelhança	1,14%	6,3%	0,14%	0,23%	0,5%	0,49%
Referência	Este Trabalho	Bobillo <i>et al.</i> , 2009.	Diegoli <i>et al.</i> , 2009.	Saunier <i>et al.</i> , 2008.	Tillmar <i>et al.</i> , 2010.	Saunier <i>et al.</i> , 2009.

Nota: “N” corresponde ao número de indivíduos analisados; Cent (central); Afri (Negros americanos); Hisp (Hispanicos). Toda região hipervariável (16024-576) foi levada em consideração.

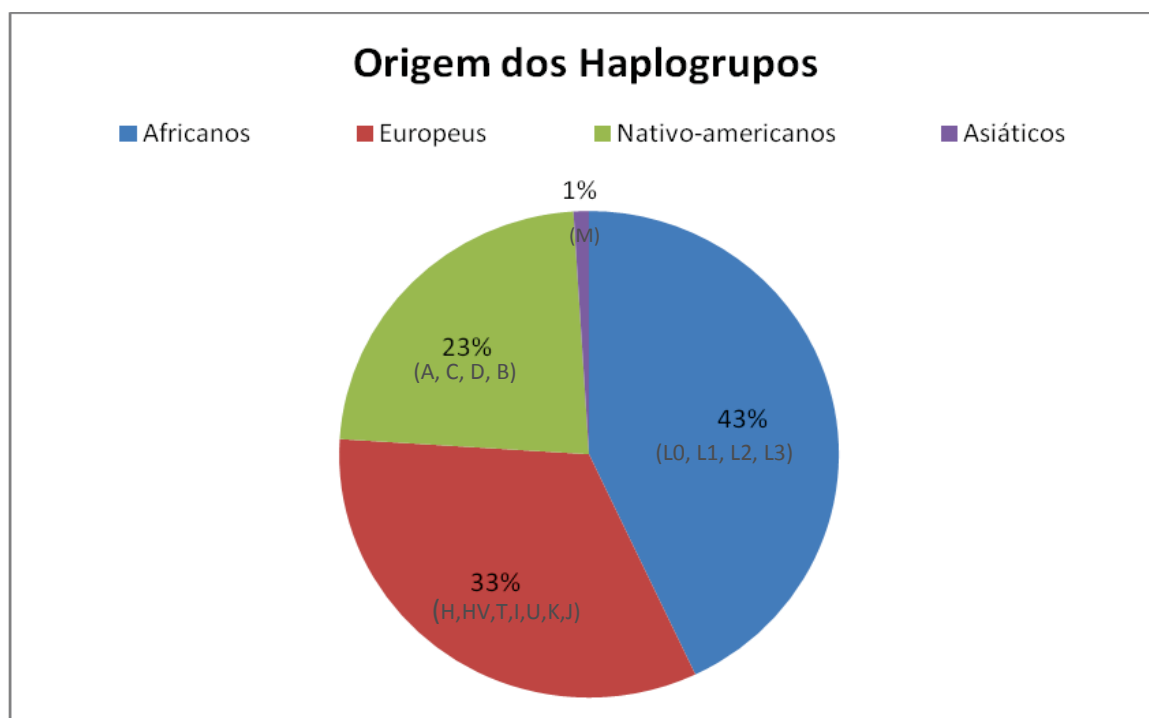
5.4. Classificação da origem dos haplogrupos

Os haplogrupos identificados nas amostras analisadas mostraram claramente quatro diferentes origens filogeográficas das linhagens matrilineares: o haplogrupo L, característico de populações africanas (OLIVIERI *et al.*, 2006); os

haplogrupos H, HV, HV0 (também conhecido como preV); haplogrupos I (também conhecido como preHV); J, T, U, e K são de origem europeia (TORRONI *et al.*, 1996; TORRONI *et al.*, 1998); os haplogrupos A, B, C e D são característicos de populações nativo-americanas (TORRONI *et al.*, 1993) e uma única amostra foi classificada como sendo pertencente ao haplogrupo M de origem asiática. O haplogrupo M, encontrado neste estudo, originou-se a partir de mutações que ocorreram em linhagens do haplogrupo L3 observadas fora da África (VAN OVEN; KAYSER, 2009). Baseado na classificação dos haplogrupos pôde-se determinar a linhagem de cada uma das amostras analisadas, apresentadas no Apêndice A, e a frequência da ocorrência de cada um dos haplogrupos pode ser visualizada na Figura 6.

A população estudada (100 indivíduos) foi classificada em 43% de origem africana, 33 % de origem europeia, 23% de origem nativo-americana e 1% de origem asiática (Figura 6). No estudo realizado por PENA *et al.*, 2000, as diversas linhagens (europeia, africana e ameríndias) podem ocorrer nas diferentes regiões brasileiras, segundo o padrão esperado pela história de colonização de cada uma das regiões.

Figura 6 – Distribuição dos haplogrupos das 100 amostras analisadas



O haplogrupo africano L divide-se em três grandes haplogrupos L1, L2 e L3, sendo os dois primeiros especificamente de africanos, enquanto o último ocorre em todos os continentes, podendo ser subdividido em haplogrupos típicos de populações africanas, europeias, asiáticas e ameríndias (PENA; CARVALHO-SILVA; ALVES-SILVA; PRADO, 2000). Dentre as amostras de origem africana, o haplogrupo mais comumente encontrado foi L3 (34,9%), seguido por L2 (30,2%), L1 (25,6%) e L0 (9,3%). Resultados similares foram descritos por outros autores (GONÇALVES *et al.*, 2008; HÜNEMEIER *et al.*, 2007; PANETO *et al.*, 2010). Em relação aos sub-haplogrupos de origem africana, o mais encontrado foi L3e (46,5%). Resultados similares foram descritos por outros autores (PENA; CARVALHO-SILVA; ALVES-SILVA; PRADO, 2000).

Dentre as amostras de origem europeia, o haplogrupo mais comumente encontrado foi H (33,4%), seguido por HV (21,2%), T e I (15,1% cada) U e K (6,1% cada), e por último o haplogrupo J (3%). A frequência encontrada para o haplogrupo predominantemente H foi similar ao encontrado em outros trabalhos (PENA *et al.*, 2000; ALVES-SILVA *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000; ROOSTALU *et al.*, 2007; TURCHI *et al.*, 2008). Com relação a outras populações europeias, como italianos e alemães, que apresentam significativa contribuição para formação da população brasileira de diversas regiões, o haplogrupo H também é o mais frequente, ainda que seja expressiva a presença de outros haplogrupos como J, T, U e K (MOGENTALE-PROFIZI *et al.*, 2001; POETSCH *et al.*, 2003; PICHLER *et al.*, 2006).

Dentre os haplogrupos nativo-americanos (ameríndios) os mais comumente encontrados foram A e C (30,4% cada), seguido D (21,7%) e B (17,5%). Embora os haplogrupos A e C neste estudo estarem presentes nas mesmas proporções, a predominância do haplogrupo A foi descrita por outros autores, os quais constataram que o haplogrupo A era o mais frequente nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, e o haplogrupo C o mais comum no Norte do Brasil (PENA; CARVALHO-SILVA; ALVES-SILVA; PRADO, 2000). A presença ameríndia, embora menor se comparada às outras linhagens encontradas no estudo, foi marcante.

Uma única amostra foi classificada como pertencendo ao haplogrupo M (1%), de origem asiática.

5.5. Comparação da origem dos haplogrupos com outras populações

Quando comparamos os resultados obtidos neste estudo com o realizado por PANETO (2010), envolvendo indivíduos da grande São Paulo, é possível observar uma grande semelhança na origem dessas populações brasileiras, visto que, os dois estados pertencem à região Sudeste do Brasil e apresentam uma predominância de linhagens de origem africana, seguida de europeus e nativo-americanos. Isto, provavelmente, já seria o esperado quando levada em consideração a história de colonização desta região. Na região Nordeste observou-se que, apesar da predominância de indivíduos de origem africana, assim como na região Sudeste, a presença de nativo-americanos foi marcante se comparada às linhagens encontradas nas demais regiões do Brasil. A região Sul, diferente das demais regiões, apresentou uma predominância de indivíduos de origem europeia, pelo fato de ter recebido uma maior quantidade de imigrantes vindos da Europa, particularmente da Alemanha, Itália e Portugal (PALENCIA *et al.*, 2010) (Tabela 8).

Tabela 8 – Origem dos haplogrupos nas regiões Sudeste (ES/SP), Nordeste (AL) e Sul (SC) do Brasil.

Haplogrupos	Sudeste(ES)	Sudeste(SP)	Nordeste(AL)	Sul (SC)
N	100	160	157	80
Africanos	43%	46,6%	46,5%	21,2%
Europeus	33%	27,3%	19,1%	63,8%
Nativo-americanos	24%	26,1%	34,4%	15%
Referência	Este Trabalho	Paneto <i>et al.</i> , 2010.	Barbosa <i>et al.</i> , 2008.	Palencia <i>et al.</i> , 2010.

Nota: “N” corresponde ao número de indivíduos analisados. (ES) Espírito Santo, (SP) São Paulo, (AL) Alagoas e (SC) Santa Catarina. Foram excluídas as amostras com ancestralidade asiática confirmada.

O Brasil possui uma das populações mais heterogêneas do mundo, o resultado de cinco séculos de cruzamentos inter étnicos entre os povos de três continentes: os colonizadores europeus, representados principalmente pelos portugueses; escravos africanos, e os nativo-americanos (ALVES-SILVA *et al.*, 2000). As populações das Américas, em especial as populações brasileiras, foram estabelecidas principalmente através de cruzamentos envolvendo colonizadores europeus e mulheres ameríndias ou africanas. No entanto, têm sido descritas particularidades regionais e locais em todo o Brasil (Tabela 9).

5.6. Ancestralidade geográfica dos DNA mt de populações de cada uma das regiões do Brasil e do estado do Espírito Santo.

Quando comparamos os resultados deste projeto, em especial com os obtidos por Alves-Silva (2000) e, observou-se que os resultados são similares aos da região Sudeste e Nordeste do Brasil.

Tabela 9 – Ancestralidade geográfica dos DNA mt de populações de cada uma das regiões do Brasil e do estado do Espírito Santo.

Região/População(N)	Europeia	Ameríndia	Africana	Referências
Brasil				
Norte (48)	31	54	15	ALVES-SILVA <i>et al.</i> , 2000.
Nordeste (50)	34	22	44	ALVES-SILVA <i>et al.</i> , 2000.
Sudeste (99)	31	33	34	ALVES-SILVA <i>et al.</i> , 2000.
Sul (50)	66	22	12	ALVES-SILVA <i>et al.</i> , 2000.
Estado/População(N)				
Sudeste				
Espírito Santo (100)	33	24	43	Este trabalho

Nota: Foram excluídas as amostras com ancestralidade asiática confirmada. Os valores das linhagens encontradas foram expressos em porcentagens.

A análise do DNA mt das diversas regiões do Brasil faz-se necessária, visto que, as diferenças nas proporções das origens dos haplogrupos, provavelmente são resultantes do processo de colonização de cada local.

Inicialmente, após a descoberta do Brasil, o maior componente da população do Espírito Santo consistia de nativo-americanos, que contribuíram fortemente para a formação inicial do Brasil. Durante o período de ocupação, as tribos nativo-americanas sofreram um drástico declínio demográfico devido a conflitos com os colonizadores europeus e doenças para as quais não foram adaptados, com a entrada dos colonizadores juntamente com os escravos (ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

Os africanos foram introduzidos a partir de meio do século XVI, como escravos para trabalhar em fazendas de cana de açúcar e, mais tarde, nas minas de ouro e diamante e nas plantações de café. Os registros históricos indicam que entre 1551 e 1850 (quando o tráfico de escravos foi abolido), aproximadamente 3,5 milhões de africanos chegaram ao Brasil (SALZANO, FREIRE-MAIA, 1967; CURTIN, 1969; RIBEIRO, 1995; ALVES-SILVA *et al.*, 2000). Em meados do século XVII, um grande número de escravos trazidos para o Brasil desembarcou em Pernambuco e na Bahia para trabalharem (mão de obra escrava) no plantio da cana-de-açúcar. Em 1693, muitos deles vieram para o Espírito Santo após a descoberta de jazidas no interior do estado.

Quanto à imigração europeia, estima-se que aproximadamente quinhentos mil portugueses chegaram ao Brasil entre 1500 e 1808 (SALZANO, FREIRE-MAIA, 1967; ALVES-SILVA *et al.*, 2000). O Espírito Santo recebeu imigrantes de diversas partes da Europa, principalmente Portugal e Itália, junto com os africanos e alemães. Após a abertura dos portos brasileiros a todas as nações amigas, o Brasil recebeu de imigrantes de várias partes do mundo. Portugal manteve-se, de longe, a fonte mais importante de imigrantes, seguida pela Itália, Espanha e Alemanha. A imigração asiática ocorreu em menores proporções, vindos principalmente do Japão, bem como do Líbano e da Síria. A ocupação tanto de imigrantes europeus como de escravos africanos intensificou-se no início do século XIX, devido às primeiras plantações de cacau, estabelecidas por fazendeiros (ARQUIVO PÚBLICO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO - <http://www.ape.es.gov.br>). No século XIX, aproximadamente seis milhões de imigrantes chegaram oficialmente o Brasil (IBGE, 2000), dentre eles: portugueses

e italianos, espanhóis, sírios, libaneses e japoneses (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001).

As comparações entre os diferentes estados e regiões do Brasil, ressaltaram a grande diferença na ordem da predominância das linhagens em cada uma das diferentes as regiões do Brasil. As proporções das linhagens áfricas, europeias, nativo-americanas e asiáticas obtidas neste estudo estão, portanto, inteiramente relacionadas com a história da colonização do Espírito Santo.

Os haplótipos relatados no presente estudo serão disponibilizados no banco de dados EMPOP (www.empop.org).

6. CONCLUSÕES

- De um total de 100 amostras de indivíduos nascidos e residentes no estado do Espírito Santo, 94 haplótipos diferentes foram encontrados, e a probabilidade de encontrarmos dois indivíduos não relacionados com perfis idênticos nas amostras analisadas (probabilidade de semelhança) foi de 1,14% e a diversidade haplotípica calculada foi de 0,9986 $\pm$ 0,0017, para toda a região hipervariável do DNA mt (desconsiderando as regiões poli-C presentes nas posições 16193, 309 e 573). Isto demonstra a grande diversidade de haplótipos do DNA mt e confirmam a miscigenação brasileira;
- Foi possível confirmar que a adição da região HV3 e de regiões intermediárias, às demais regiões, apesar de não incrementarem tanto na diversidade haplotípica, fornecem informações adicionais para solução de um caso forense devido ao aumento no poder discriminatório e, principalmente, em estudos de frequência populacional para classificação filogenética;
- As proporções das linhagens africanas (43%), europeias (33%), nativo-americanas (23%) e asiáticas (1%) obtidas neste estudo estão, portanto, inteiramente relacionadas com a história da colonização do Espírito Santo;
- Os dados obtidos dos índices de diversidade deste estudo comparados com os de outras populações brasileiras e mundiais, confirmaram que as diversas

linhagens (africanas, europeias, nativo-americanas e asiáticas) ocorrem em todos os locais de acordo com o padrão de colonização de cada um delas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS, M.; GUIMARÃES, P. E. *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 67, p. 444-61, 2000.
- ALVES, T. P. N.; LEITE, K. C. E.; MONTEIRO, E. O. G.; GRATTAPAGLIA, D.; PEREIRA, R. W. Construção de um banco de dados de haplótipos mitocondriais de HVI e HVII sob rígidos controles de qualidade. Resumo do 51º Congresso Brasileiro de Genética. *Universidade Católica de Brasília*, 2005.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.*, v. 290, p. 457-465, 1981.
- ANDREWS, R. *et al.* Reanalysis and revision of Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, v. 23, p. 147, 1999.
- ARQUIVO PÚBLICO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. Disponível em: <<http://www.ape.es.gov.br/imigrantes/html/estatisticas.html>> Acesso em: 25 fev. 2012.
- AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos. Trans. R. SOC. Lond.*, v. 312, p. 325-342, 1986.
- BAASNER, A.; SCHÄFER, C.; JUNGE, A.; MADEA, B. Polymorphic sites in human mitochondrial DNA control region sequences: population data and maternal inheritance. *Forensic. Science. International.*, v. 98, p. 169-178, 1998.
- BANDELT, H. J.; ACHILLI, A.; KONG, Q. P.; SALAS, A. *et al.* Low "penetrance" of phylogenetic knowledge in mitochondrial disease studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, p. 122-130, 2005.
- BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. Human mitochondrial DNA and the evolution of *Homo sapiens*. 1st edition, Leipzig: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 153, 2006.
- BANDELT, H. J.; KONG, Q. P.; RICHARDS, M.; MACAULAY, V. Estimation of mutation rates and coalescence times: some caveats. In: BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. Human Mitochondrial DNA and the Evolution of *Homo sapiens*. *Berlin: Springer-Verlag*. p. 47-90, 2006.
- BARBOSA, A. B.; DA SILVA, L. A.; AZEVEDO, D. A. *et al.* Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas state, north-eastern Brazil. *J. Forensic Sci.*, v. 53, p. 142-6, 2008.

BEHAR D.M.; VILLEMS R.; SOODYALL H., *et al.* 2008b. The dawn of human matrilineal diversity. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 82, p. 1130-1140, 2008.

BINI, C. *et al.* Different informativeness of the three hypervariable mitochondrial DNA regions in the population of Bologna (Italy). *Forensic Sci. Int.*, v. 135, p. 48-52, 2003.

BOBILLO, M. C.; ZIMMERMANN, B.; SALA, A. *et al.* Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *Int. J. Legal Med.*, 2009. *In press*.

BIRKY, C. W.; MARUYAMA, T.; FUERST, P. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics.*, v. 103, p. 513-527, 1983.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 76, p. 1967-1971, 1979.

BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A. *et al.* Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, v. 76, p. 1967-71, 1982.

BUDOWLE, B.; ALLARD, M.; WILSON, M. R. *et al.* FORENSICS AND MITOCHONDRIAL DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annu. Rev. Genom. Human. Genet.*, v. 4, p. 119-141, 2003.

BUTLER, J. M. *Forensic DNA typing: Methodology*. 3rd edition, London: Elsevier Academic Press., p. 410, 2011.

CANN, R. L.; BROWN, W. M.; WILSON, A. C. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics.*, v. 106, p. 479-499, 1984.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.*, v. 325, p. 31-36, 1987.

CARRACEDO, A.; BAR, W.; MAYR, W. *et al.* DNA commission of international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci. Int.*, v. 110, p. 79-85, 2000.

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

COMAS, D.; PAABO, S.; BERTRANPETIT, J. Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *Genes. Res.*, v. 5, p. 89-90, 1995.

COBLE, M. D.; JUST, R. S.; O'CALLAGHAN, J. E. *et al.* Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int. J. Legal Med.*, v. 118, p. 137-146, 2004.

CURTIN, P. D. The Atlantic slave trade: a census. *University of Wisconsin Madison*, 1969 *in press*.

DIEGOLI, T. M.; IRWIN, J. A.; JUST, R. S. *et al.* Mitochondrial control region sequences from an African American population sample. *Forensic Sci. Int. Genet.*, v. 4, p. 45-52, 2009.

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

FARAH, S. B. DNA segredos e mistérios. 2. ed. São Paulo: Savier, 2007.

FEIO-DOS-SANTOS, A. C.; CARVALHO, B. M.; BATISTA DOS SANTOS, S. E. *et al.* Nucleotide variability of HV-I in admixed population of the Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci. Int.*, v. 164, p. 276-7, 2006.

FINNILÄ, S.; HASSINEN, I. E.; ALA-KOKKO, L.; MAJAMAA, K. Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in northern Finland based on sequence analysis of the complete coding region by conformation-sensitive gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 66, p. 1017-1026, 2000.

FINNILÄ, S.; LEHTONEN, M. S.; MAJAMAA, K. Phylogenetic network for European mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 68, p. 1475–1484, 2001.

GHEP-ISFG (*Grupo de Habla Española y de la Portuguesa*). Disponível em: <<http://www.gep-isfg.org>> Acesso em: 12 dez. 2012.

GILES, R. E.; BLANC, H.; CANN, H. M. *et al.* Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 77, p. 6715-19, 1980.

GINTHER, C.; ISSEL-TARVER, L.; KING, M. C. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat. Genet.*, v. 2, n. 2, p. 135-38, 1992.

GONÇALVES, V. F.; CARVALHO, C. M.; BORTOLINI, M. C. *et al.* The phylogeography of African Brazilians. *Hum. Hered.*, v. 65, p. 23-32, 2008.

GUERREIRO, V. F. Do Porto dos Casais a Porto Alegre: A trajetória demográfica e evolutiva de uma cidade revelada através de marcadores genéticos uniparentais. Tese (Mestrado em Genética e Biologia molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do UFRGS – Porto Alegre, 2007.

HERMANN, G. J.; SHAW, J. M. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, v. 14, p. 265-303, 1998.

HOLLAND, M. M.; FISHER, D. L.; MITCHELL, L. G. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war. *J. Forensic Sci.*, v. 38, n. 3, p. 542-53, 1993.

HOONG, L. L.; LEK, K. C. Genetic polymorphisms in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, v. 13, n. 2, p. 79-85, 2005.

HUANG, D.; GUI, C. YI, S. *et al.* Typing of 24 mtDNA SNPs in Chinese Population Using SNaPshot Minisequencing. *Med. Sci.*, v. 30, p. 291-98, 2010.

HÜNEMEIER, T.; CARVALHO, C.; MARRERO, A. R. *et al.* Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. *Am. J. Phys. Anthropol.*, v. 133, p. 854-67, 2007.

HUTCHINSON, C. A.; NEWBOLD, J. E.; POTTER, S. S. *et al.* Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature.*, v. 251, p. 536-39, 1974.
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro, 2000.

IMAIZUMI, K. *et al.* DNA typing of boné specimens-the potencial use of the profiler test as a tool for bone identification. *Legal Medicine*, v. 2, p. 31-41, 2005.

KIVISILD, T.; TOLK, H-V.; PARIK, J. *et al.* The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree. *Mol. Biol. Evol.*, v. 19, p. 1737-1751, 2002.

KIVISILD, T.; METSPALU, M.; BANDELT, H.J.; RICHARDS, M.; VILLEMS, R. The world mtDNA phylogeny. In: BANDELT, H.J.; MACAULAY, V.; RICHARDS M. Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. Berlin: Springer-Verlag. p. 149–179, 2006.

KONG, Q. P.; YAO, Y. G.; SUN, C. *et al.* Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 73, p. 671–676, 2003.

KONG, Q. P.; BANDELT, H. J.; SUN, C. *et al.* Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum. Mol. Genet.* p. 2076-2086, 2006.

LEE, H. R.; JOHNSON, K. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, 2006. In press.

LEE, H. R.; JOHNSON, K. A. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 36236-40, 2006.

LEE, H. Y.; SONG, I.; HA, E. *et al.* mtDNAMAN: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *BMC Bioinformatics.*, v. 9, p. 483, 2008.

LUTZ, S.; WITTIG, H.; WEISSER, H. J. *et al.* Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci. Int.*, v. 113, p. 97-101, 2000.

MACAULAY, V.; RICHARDS, M.; HICKEY, E. *et al.* The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 64, p. 232-249, 1999.

MACAULAY, V.; HILL, C.; ACHILLI, A. *et al.* Single rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science*, v. 308, p. 1034-1036, 2005.

MISHMAR, D.; RUIZ-PESINI, E.; GOLIK, P. *et al.* Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 171-176, 2003.

MOGENTALE-PROFIZI, N.; CHOLLET, L.; STEVANOVITCH, A. *et al.* Mitochondrial DNA sequence diversity in two groups of Italian Veneto speakers from Veneto. *Ann. Human. Genet.*, v. 67, p. 1277-86, 2001.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, v. 155, p. 335-350, 1987.

OLIVIERI, A.; ACHILLI, A.; PALA, M. *et al.* The mtDNA legacy of the Levantine early Upper Palaeolithic in Africa. *Science.*, v. 314, p. 1767-1770, 2006.

PAKENDORF, B.; STONRKING, M. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annu. Rev. Genom. Human. Genet.*, v. 6, p. 165-83, 2005.

PALENCIA, L.; VALVERDE, L.; ALVAREZ, A. *et al.* Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of European input. *Int. J. Legal Med.*, 2010. *In press*.

PANETO, G. G. Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia). Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, Araraquara – SP, 2006.

PANETO, G. G. *et al.* Heteroplasmy in Hair: Study of Mitochondrial DNA Third Hypervariable Region in Hair and Blood Samples. *J. Forensic. Sci.*, v. 55, p. 715-717, 2010.

PANETO, G. G. Análise de Polimorfismo do DNA mitocondrial em indivíduos residentes na grande São Paulo para aplicação na identificação humana. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia). Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, Araraquara – SP, 2010.

PARSON, W.; BANDELT, H. J. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 1, p. 13-9, 2007.

PARSON, W.; DÜR, A.; EMPOP – a forensic mtDNA database. *Forensic Sci. Int. Genet.*, v. 1, p. 88-92, 2007.

PENA, S. D. J.; CARVALHO-SILVA, D. R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V. Retrato Molecular. *Ciência Hoje.*, v. 27, p.17-25, 2000.

PEREIRA, L.; PRATA, M. J.; AMORIM, A. Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet.*, v. 64, p. 491-506, 2000.

PICHLER, I.; MUELLER, J. C.; STEFANOV, S. A. *et al.* Genetic structure in contemporary south Tyrolean isolated populations revealed by analysis of Y-chromosome, mtDNA, and Alu polymorphisms. *Hum. Biol.*, v. 78, p. 441-64, 2006.

POETSCH, M.; WITTIG, H.; KRAUSE, D.; LIGNITZ, E. Mitochondrial diversity of a northeast German population sample. *Forensic. Sci. Int.*, p. 125-32, 2003.

PRIETO, L.; ALONSO, A.; ALVES, C. *et al.* 2006 GEP-ISFG collaborative exercise on mtDNA: reflections about interpretation, artefacts, and DNA mixtures. *Forensic Sci. Int. Genet.*, v. 2, p. 126-133, 2008.

RIBEIRO, D. O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. Companhia da Letras, São Paulo-SP, 1995.

RICHARDS, M.; MACAULAY, V.; HICKEY, E. *et al.* Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 67, p. 1251-1276, 2000.

RICHARDS, M. The mitochondrial DNA tree and forensic science. *International Congress Series.* p.91-93, 2004.

ROOSTALU, U.; KUTUEV, I.; LOOGVÄLI, E. L. *et al.* Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective. *Mol. Biol. Evol.*, v. 24, p. 436-48, 2007.

SALAS, A.; COMAS, D.; LAREU, M. V. mtDNA analysis of Galician population: o genetic edge of European variation. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 6, p. 365-375, 1998.

SALAS, A.; LAUREU, M. V.; CARRACEDO, A. Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. *Int. J. Legal Med.*, v. 114, p. 186-190, 2001.

SALAS, A.; BANDELT, H. J.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M. B. Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic. Sci. Int.*, p. 1-13, 2007.

SALZANO, F. M., FREIRE-MAIA, N. Populações Brasileiras, aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Editora Nacional, São Paulo – SP, 1967.

SAUNIER, J. L.; IRWIN, J. A.; JUST, R. S. *et al.* Mitochondrial control region sequences from a u.s. “hispanic” population sample. *Forensic Sci. Int. Genet.*, v. 2, p. 19-23, 2008.

SAUNIER, J. L.; IRWIN, J. A.; STROUSS, K. M. *et al.* Mitochondrial control region sequences from Egyptian population sample. *Forensic Sci. Int. Genet.*, v. 3, p. 97-103, 2009.

SCHLEBUSCH, C. M., NAIDOO, T.; SOODYALL, H. SNaPshot minisequencing to resolve mitochondrial macro-haplogroups found in Africa. *Electrophoresis*, v. 30, p. 3657-64, 2009.

SILVA, W. A.; BORTOLINI, M. C.; SCHNEIDER, M. P. C. *et al.* mtDNA Haplogroup Analysis of Black Brazilian and Sub-Saharan populations: Implications for the Atlantic Slave Trade. *BioOne. Reserch. Evolved.*, v. 1, p. 29-41, 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*, v. 3, p.11, 1989.

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

STONEKING, M.; BHATIA, K.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA variation in Eastern Highlanders of Papua New Guinea. In *Genetic Variation and Its Maintenance*, edited by ROBERTS, D.F. and DE STEFANO, G.F. *Cambridge University Press, Cambridge.*, p. 87-100, 1986.

STONEKING, M.; JORDE, L. B.; BHATIA, K. *et al.* Geographic Variation in Human Mitochondrial DNA from Papua New Guinea. p. 718 – 733, 1989.

SWGDM – Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation. *Forensic Science Communications*, v. 5, n. 2, 2003.

TILLMAR, A. O.; COBLE, M. D.; WALLERSTRÖM, T. *et al.* Homogeneity in mitochondrial DNA control region sequences in Swedish subpopulations. *Int. J. Legal Med.*, v. 124, p. 91-98, 2010.

TORRONI, A.; SCHURR, T. G.; CABELL, M. F. *et al.* Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 53, p. 563–590, 1993.

TORRONI, A.; LOTT, M. T.; CABELL, M. F. *et al.* mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 55, p. 760–776, 1994.

TORRONI, A.; HUOPONEN, K.; FRANICALACCI, P. *et al.* Classification of European mtDNAs from analysis of three European populations. *Genetics.*, v. 144, p. 1835-2850, 1996.

TORRONI, A.; BANDELT, H. J.; D'URBANO, L. *et al.* mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* v. 62, p. 1137-1152, 1998.

TORRONI, A.; ACHILLI, A.; MACAULAY, V. *et al.* Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet.*, p. 339-345, 2006.

TSUTSUMI, H.; KOMURO, T.; MUKOYAMA, R.; NOGAMI, H. Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and a family analysis. *Jornal of Oral Science.*, v. 48, n. 3, p. 145-152, 2006.

TURCHI, C.; BUSCEMI, L.; PREVIDERÈ, C. *et al.* Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing. *Int. J. Legal Med.*, v. 122, p. 199-204, 2008.

UMETSU, K.; YUASA, I. Recent progress in mitochondrial DNA analysis. *Legal Medicine.*, v. 7, p. 259-262, 2005.

VANECEK, T.; VOREL, F.; SIP, M. Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data. *Int. J. Legal Med.*, v. 118, p. 14-18, 2004.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.*, v. 30, p. 386-394, 2008.

VIGILANT, L.; STONEKING, M.; HAPENDING, H.; WILSON, A. C. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science.*, v. 253, p. 1503-7, 1991.

WALLACE, D. C.; YE, J.; NECKELMANN, S. N. *et al.* Sequence Analysis of cDNAs for the Human and Bovine ATP Synthase Beta Subunit: Mitochondrial Genes Sustain Seventeen Times more Mutations. *Current Genetics*, v. 12, p. 81-90, 1987.

WILSON, A. C. *et al.* Mitochondrial DNA and two perspectives on evolution-ary genetics. *Biol. J. Linn.*, v. 26, p. 375-400, 1985.

WILSON, A. C.; ZIMMER, E. A.; PRAGER, E. M. KOCHER, T. D. *et al.* Restriction mapping in the molecular systematics of mammals: a retrospective salute. *Elsevier. Science*, ed. 9. p. 407-41, 1989.

WILSON, M. R. *et al.* Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int. J. Legal. Med.*, v. 108, p. 68-74, 1995.

ZHANG, Y. J. *et al.* Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region I, II and III in northeast China Han. *Forensic Sci. Int.*, v. 149, p. 267-269, 2005.

Anexo A**Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 13/2010

Interessada: NAIARA MARTINS SANCHES

Orientadora: Profa. Dra. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI

Projeto: Análise de polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos residentes no Espírito Santo para utilização na identificação humana

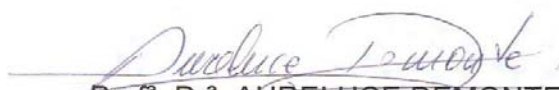
Parecer nº 03/2011 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa "Análise de polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos residentes no Espírito Santo para utilização na identificação humana", 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 parcial do projeto de pesquisa deverá ser entregue em janeiro de 2012 e o relatório final em janeiro de 2013 no qual deverá constar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 31 de janeiro de 2011.


Profª. Drª. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

Anexo B

Modelo do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este termo de consentimento refere-se ao projeto de pesquisa “**Análise de polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos residentes no Espírito Santo para utilização na identificação humana**”.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. Nesta pesquisa serão estudadas regiões do meu material genético que são passadas dos pais para os filhos, as quais não estão relacionadas a nenhuma característica física ou doença, sendo utilizadas exclusivamente para a identificação de indivíduos;
2. Este trabalho tem como finalidade determinar a frequência destas regiões em indivíduos não aparentados da população do estado do Espírito Santo e disponibilizar essa informação em um banco de dados de DNA que tem como objetivo ajudar na identificação humana de outros indivíduos, bem como do voluntário da pesquisa. Além disso, estarei contribuindo com os dados genéticos da população brasileira, os quais são ainda pouco conhecidos;
3. Para a realização dessa pesquisa terei que doar algumas gotas de sangue. No momento da triagem, quando uma gota de sangue for retirada do meu dedo, sem a necessidade de uma nova punção, serão coletadas mais 5 gotas de sangue em um cartão especial para armazenar amostra biológica;
4. A coleta do material biológico terá um pequeno desconforto decorrente da compressão realizada no meu dedo para saída do sangue;
5. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe/Instituição responsável pelo trabalho;
6. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
7. Meu nome será mantido em **sigilo**, assegurando assim a minha **privacidade** e, se desejar, serei informado pelas pesquisadoras desse projeto sobre os resultados dessa pesquisa;
8. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
9. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;
10. Em caso de dúvida poderei entrar em contato com a equipe científica do projeto pelo telefone (16) 3301-6950 (Contato: Naiara Martins Sanches);
11. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados,

Eu _____, RG _____, Idade _____ anos, Endereço _____
 _____, Cidade _____, Estado _____, Telefone _____,

concordo em participar do estudo “**Análise de polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos residentes no Espírito Santo para utilização na identificação humana**”

Espírito Santo, _____ de _____ de _____

 Assinatura do Voluntário

 Assinatura do Pesquisado

Apêndice A

Haplótipos e classificação em haplogrupos das 100 amostras analisadas por sequenciamento de toda a região hipervariável.

Amostra	HG	Polimorfismos da região hipervariável													
BR-ES001	T2b	73G	263G	309.1C	16126C	16172C	16263C	16294T	16304C	16519C					
BR-ES002	L3f1b	73G	150T	189G	200G	263G	315.1C	16209C	16218T	16223T	16256T	16292T	16311C	16519C	
BR-ES003	K1a	73G	195C	263G	315.1C	497T	524.1A	524.2C	16224C	16311C	16519C				
BR-ES004	D1	62C	066T	73G	152C	183G	263G	315.1C	489C	16223T	16260T	16325C	16362C	16519C	
BR-ES005	A2	73G	146C	153G	235G	263G	309.1C	523DEL	524DEL	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C	
BR-ES006	A2	64T	73G	146C	153G	185T	235G	263G	315.1C	485C	523DEL	524DEL	16111T	16223T	
		16290T	16319A	16362C											
BR-ES007	D4a	73G	152C	263G	309.1C	489C	16129A	16223T	16362C	16519C					
BR-ES008	C1aC1c	73G	193G	249DEL	263G	290DEL	291DEL	315.1C	489C	16166G	16223T	16224C	16260T	16298C	
		16325C	16327T	16356C	16519C										
BR-ES009	C1aC1c	73G	193G	249DEL	263G	290DEL	291DEL	315.1C	489C	16166G	16223T	16224C	16260T	16298C	
		16325C	16327T	16356C	16519C										
BR-ES010	C1b	73G	195C	249DEL	263G	290DEL	291DEL	309.1C	489C	493G	523DEL	524DEL	16223T	16266T	
		16298C	16325C	16327T											
BR-ES011	HV0	72C	263G	315.1C	16189C	16298C									
BR-ES012	L3b1b	73G	152C	200G	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16124C	16223T	16249C	16278T	16293G	16362C	
		16519C													

Amostra	HG	Polimorfismos da região hipervariável												
BR-ES040	A2	59C	62T	64T	73G	146C	152C	153G	235G	263G	297G	315.1C	523DEL	524DEL
		16209C	16223T	16278T	16290T	16319A								
BR-ES041	L3d3	73G	152C	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16093C	16124C	16183C	16189C	16223T	16278T	16304C
		16311C												
BR-ES042	L2a	73G	143A	146C	152C	195C	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16223T	16278T	16287T	16294T
		16390A												
BR-ES043	HV6	263G	315.1C	444G	456T	523DEL	524DEL	16172C	16304C	16311C				
BR-ES044	L2a1	73G	146C	152C	195C	263G	309.1C	16183C	16189C	16223T	16225T	16234T	16278T	16294T
		16309G	16390A	16519C										
BR-ES045	HV0	72C	263G	315.1C	16189C	16298C								
BR-ES046	K1a6	73G	263G	271T	309.1C	497T	16093C	16224C	16311C	16519C	16527T			
BR-ES047	H1c	263G	315.1C	477C	16519C									
BR-ES048	B4b	73G	263G	315.1C	499A	524.1 ^a	524.2C	16183C	16189C	16193.1C	16217C	16519C		
BR-ES049	L3e2b	73G	150T	195C	263G	309.1C	16172C	16189C	16223T	16301T	16320T	16519C		
BR-ES050	H	152C	263G	309.1C	16519C									
BR-ES051	L3e2a	73G	150T	195C	198T	263G	315.1C	499A	16223T	16269G	16320T	16399G	16519C	
BR-ES052	HV0	72C	194T	263G	309.1C	315.1C	16218T	16298C						
BR-ES053	L3d1d	73G	146C	152C	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16124C	16223T	16256T	16519C		
BR-ES054	L1c	73G	151T	152C	182T	186 ^a	189C	195C	198T	247A	263G	297G	315.1C	316A
		523DEL	524DEL	16086C	16129A	16187T	16189C	16223T	16241G	16278T	16291T	16294T	16311C	16519C

Amostra	HG	Polimorfismos da região hipervariável												
BR-ES055	C1b	73G	249DEL	263G	290DEL	291DEL	309.1C	489C	493G	523DEL	524DEL	16223T	16292T	16298C
		16325C	16327T	16362C										
BR-ES056	T1a	73G	152C	195C	263G	309.1C	16126C	16163G	16186T	16189C	16215T	16294T	16519C	
BR-ES057	L3e3	73G	150T	195C	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16086C	16223T	16265T	16519C		
BR-ES058	L1c2	73G	151T	152C	182T	186A	189C	195C	198T	247A	263G	297G	315.1C	316ª
		16129A	16187T	16189C	16223T	16265C	16278T	16286G	16294T	16311C	16343T	16360T	16519C	16527T
BR-ES059	L0a	93G	95C	185A	189G	236C	247A	263G	309.1C	16129A	16148T	16172C	16187T	16188G
		16189C	16223T	16230G	16311C	16320T								
BR-ES060	L1c3b	73G	76T	89C	93G	95C	152C	182T	186A	189C	236C	247A	263G	297G
		315.1C	316A	523DEL	524DEL	16129A	16189C	16223T	16274A	16278T	16293G	16294T	16311C	16360T
		16519C												
BR-ES061	L2b1	73G	150T	152C	182T	195C	198T	204C	263G	315.1C	418T	523DEL	524DEL	16114ª
		16129A	16213A	16223T	16278T	16284G	16355T	16362C						
BR-ES062	D4o	73G	195C	263G	315.1C	489C	16187T	16223T	16290T	16325C	16362C	16519C		
BR-ES063	I2	73G	152C	199C	204C	207A	250C	263G	315.1C	471C	16129A	16223T	16390A	16391ª
		16519C												
BR-ES064	J1b1	73G	242T	263G	295T	315.1C	462T	489C	16069T	16126C	16145A	16172C	16261T	
BR-ES065	L2b1	73G	150T	152C	182T	195C	198T	204C	263G	315.1C	418T	523DEL	524DEL	16114ª
		16129A	16213A	16223T	16278T	16284G	16355T	16362C	16390A					

Amostra	HG	Polimorfismos da região hipervariável													
BR-ES066	A2	64T	73G	146C	151T	153G	189G	217C	235G	263G	309.1C	489C	523DEL	524DEL	
		16111T	16185T	16189C	16223T	16290T	16310A	16319A	16362C	16519C					
BR-ES067	T1	73G	263G	309.1C	16126C	16163G	16186T	16189C	16284G	16294T	16519C				
BR-ES068	L1b1*	73G	151T	152C	182T	185T	195C	247A	263G	315.1C	357G	523DEL	524DEL	16126C	
		16187T	16189C	16264T	16270T	16278T	16311C	16519C							
BR-ES069	L0a1a	64T	93G	185A	189G	200G	236C	247A	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16129A	16148T	
		16168T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T					
BR-ES070	L2b	73G	146C	150T	152C	182T	195C	198T	204C	263G	315.1C	16114A	16129A	16213A	
		16223T	16278T	16354T	16390A										
BR-ES071	L2a1	73G	143A	146C	152C	195C	263G	309.1C	16093C	16223T	16256T	16278T	16294T	16309G	
		16390A	16519C												
BR-ES072	H1a	73G	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16051G	16162G	16343G	16519C					
BR-ES073	L3e2	73G	150T	195C	263G	309.1C	16223T	16320T	16519C						
BR-ES074	A2	64T	73G	146C	153G	207ª	235G	263G	309.1C	523DEL	524DEL	16111T	16214A	16223T	
		16239A	16266T	16290T	16319A	16362C									
BR-ES075	T2b	73G	152C	263G	309.1C	16126C	16294T	16296T	16304C	16519C					
BR-ES076	L3e2b	73G	150T	195C	263G	309.1C	16172C	16183C	16189C	16223T	16320T	16519C			
BR-ES077	L1b	73G	152C	185T	189G	195C	247A	263G	315.1C	357G	523DEL	524DEL	16126C	16166G	
		16187T	16189C	16193T	16223T	16264T	16270T	16278T	16293G	16311C	16519C				

Amostra	HG	Polimorfismos da região hipervariável												
BR-ES078	L2b1	73G	150T	152C	182T	195C	198T	204C	263G	315.1C	418T	523DEL	524DEL	16114a
		16129A	16213A	16223T	16278T	16355T	16362C	16390A						
BR-ES079	L1c3b	73G	151T	152C	182T	186A	189C	247A	263G	315.1C	316A	523DEL	524DEL	16129a
		16163G	16187T	16189C	16209C	16223T	16278T	16293G	16294T	16311C	16360T	16519C		
BR-ES080	B2c	73G	152C	263G	271T	309.1C	460C	499A	16182C	16183C	16189C	16217C	16249C	16312G
		16344T	16519C											
BR-ES081	L3e2	73G	150T	195C	263G	309.1C	16183C	16189C	16223T	16320T	16519C			
BR-ES082	L3e2b	73G	150T	195C	263G	309.1C	16172C	16183C	16189C	16223T	16320T	16519C		
BR-ES083	L3e2b	73G	150T	195C	263G	309.1C	16172C	16183C	16189C	16223T	16320T	16519C		
BR-ES084	I2	73G	152C	199C	204C	207A	250C	263G	309.1C	16129A	16223T	16390A	16391A	16519C
BR-ES085	I2	73G	152C	199C	204C	207A	250C	263G	309.1C	16129A	16223T	16390A	16391A	16519C
BR-ES086	I2	73G	152C	199C	204C	207A	250C	263G	309.1C	16129A	16223T	16390A	16391A	16519C
BR-ES087	B4b	73G	263G	309.1C	499A	524.1A	524.2C	16183C	16189C	16193.1C	16217C	16519C		
BR-ES088	H	263G	315.1C	16169T	16519C									
BR-ES089	H6	239C	263G	309.1C	315.1C	16207G	16261G	16362C	16482G					
BR-ES090	L0a1a	64T	93G	185A	189G	200G	236C	247A	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16129A	16148T
		16168T	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T				
BR-ES091	C1b	249DEL	263G	265C	290DEL	291DEL	309.1C	489C	493G	523DEL	524DEL	16223T	16298C	16325C
		16327T	16526A											
BR-ES092	C1b	73G	249DEL	263G	290DEL	291DEL	309.1C	493G	523DEL	524DEL	16223T	16298C	16325C	16327T

Amostra	HG	Polimorfismos da região hipervariável															
BR-ES093	H5	263G	309.1C	315.1C	456T	16192T	16304C										
BR-ES094	U5b2a1/	73G	198T	263G	309.1C	489C	524.1A	524.2C	16142T	16179T	16189C	16193.1C	16223T	16295T			
	D1?	16325C	16362C	16497G	16519C												
BR-ES095	B4b	73G	103A	152C	199C	263G	309.1C	499A	16183C	16189C	16193.1C	16217C	16241G	16519C			
BR-ES096	HV4a	152C	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16221T	16519C									
BR-ES097	A2	73G	153G	263G	309.1C	523DEL	524DEL	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C					
BR-ES098	R8b/H1d?	73G	146C	152C	195C	247 ^a	315.1C	456T	471C	498DEL	523DEL	524DEL	16311C				
BR-ES099	L0a1a	64T	93G	189G	200G	236C	247A	263G	315.1C	523DEL	524DEL	16129A	16148T	16168T			
		16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G	16311C	16320T								
BR-ES100	L1b1*	73G	152C	182T	185T	195C	247A	263G	309.1C	357G	523DEL	524DEL	16126C	16187T			
		16189C	16223T	16245T	16264T	16270T	16278T	16311C	16519C								

Nota: (HG) haplogrupos