

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química

Programa de Biotecnologia

**ANÁLISE DE SNPs DO DNA MITOCONDRIAL EM INDIVÍDUOS RESIDENTES NO
ESTADO DO ESPÍRITO SANTO PARA APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO
HUMANA**

ISABELA BRUNELLI AMBROSIO

ARARAQUARA - SP

2015

ISABELA BRUNELLI AMBROSIO

**ANÁLISE DE SNPs DO DNA MITOCONDRIAL EM INDIVÍDUOS RESIDENTES NO
ESTADO DO ESPÍRITO SANTO PARA APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO
HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Molecular

ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

ARARAQUARA
2015

Aos meus pais, Antônio e Maria Inês, os
principais responsáveis por esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Maria Inês, que sempre apoiaram minhas escolhas e também acreditaram nos meus sonhos, fazendo o possível e o impossível para que eu pudesse realizá-los.

À minha irmã Fernanda e meu noivo Davi que sempre estiveram ao meu lado, dando-me força e conselhos, os quais sempre me mantiveram no caminho certo.

Aos meus avós, família e amigos que de alguma forma sempre estiveram presentes dando força, acreditando e torcendo pelo meu sucesso tanto pessoal quanto profissional.

À Profa. Regina Maria Barretto Cicarelli, pelas orientações dadas, confiança em mim depositada e conhecimento, o que foi essencial durante esses anos e que contribuíram com minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos meus amigos, Fernanda e Danilo, que tanto me ajudaram, seja através de seus conhecimentos ou pelos momentos de descontração e risada que sempre temos juntos.

À Greiciane pela ajuda prestada nos momentos de dificuldade encontrados ao decorrer deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Juliana, Laís, Flávia, Andrea e Ana Valéria, pela ajuda prestada durante esses anos.

À Lucilene e Luís, pela presteza no laboratório, sempre facilitando nosso trabalho.

À Dra. Rejane Grotto e Flávia pela ajuda, cedendo o ambiente e equipamentos que foram utilizados neste projeto.

Ao Instituto de Química e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, pelo suporte dado, tanto pelo núcleo profissional quanto pela infraestrutura, sendo possível o desenvolvimento desse projeto.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro concedido durante o andamento deste projeto, sendo possível sua realização.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Mitocôndria e DNA mitocondrial.....	17
1.2 Região Controle X Região Codificadora.....	19
1.3 DNA mitocondrial: sua utilização na Genética Forense.....	20
1.4 Classificação em haplogrupos.....	23
1.5 Banco de Dados do DNA mitocondrial.....	25
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO PROJETO	27
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Casuística.....	30
4.2 Seleção dos SNPs.....	30
4.3 Extração do DNAm _t em amostras de sangue.....	31
4.4 Reação de SNaPshot.....	31
4.4.1 Reação de PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) em <i>multiplex</i>	31
4.4.2 Purificação do Produto de PCR.....	34
4.4.3 Reação de SNaPshot.....	34

4.4.4	Purificação do Produto de SNaPshot.....	35
4.5	Eletroforese Capilar.....	35
4.6	Análise das reações de SNaPshot.....	35
4.7	Classificação em Haplogrupos.....	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Análise da reação de SNaPshot.....	38
5.2	Classificação das amostras e origem dos haplogrupos.....	41
6.	CONCLUSÕES.....	48
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICE A.....		53

RESUMO

A identificação humana por meio do DNA constitui um dos produtos mais revolucionários da Genética Moderna, tornando-se uma ferramenta indispensável na investigação criminal. Essa identificação é baseada no perfil genético do indivíduo, pela combinação de diversos marcadores herdados de seus progenitores. Os marcadores são, geralmente, diferenças nas sequências de DNA nuclear entre os indivíduos (polimorfismos). Em alguns casos, em que a análise do DNA nuclear não puder ser aplicada, a alternativa de maior sucesso é a análise do DNA mitocondrial (DNAmt). As mitocôndrias são organelas intracelulares de dupla membrana presentes em todas as células nucleadas de mamíferos, com genoma extracromossômico separado e distinto do genoma nuclear, o DNA mt.

A maioria dos laboratórios que utilizam tipagem do DNAmt baseiam-se nos polimorfismos presentes na sequência de nucleotídeos na região não codificadora (também conhecida como região controle, hipervariável, ou D-loop) do DNAmt. No entanto, a classificação em alguns haplogrupos pode não ser possível com base em dados apenas da região controle. Assim, estudos sugerem a necessidade de tipagem adicional de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em outras regiões do DNAmt, em especial, nos casos onde não é possível diferenciar os indivíduos apenas pela análise da região hipervariável.

Este trabalho teve como objetivo analisar, analisar 30 (trinta) SNPs do DNAmt em amostras de indivíduos não relacionados, nascidos e residentes no Estado do Espírito Santo, permitindo a classificação das mesmas em haplogrupos e complementando os dados de SNPs da região controle do DNAmt obtidos em trabalho anterior no laboratório, para posterior utilização em casos forense.

De um total de 100 amostras, foram encontrados 19 haplogrupos e a população estudada foi classificada conforme sua origem em: 43% africana, 30% europeia, 26% nativa americana e 1% asiática. O haplogrupo mais encontrado foi o L3 que tem origem africana.

Algumas amostras que em trabalho anterior não puderam ser corretamente classificadas apenas com o sequenciamento da região controle do DNAmt, após a

análise dos 30 SNPs, foram convenientemente identificadas nos seus respectivos haplogrupos.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a criação de um banco de dados brasileiro de DNA mitocondrial e podem ser utilizados pela polícia científica na elucidação de casos forenses.

Palavras-chave: DNA Mitocondrial; SNPs; SNaPshot; Haplogrupos; Espírito Santo-Brasil.

ABSTRACT

Human identification through DNA is one of the most revolutionary products of Modern Genetics, making it an indispensable tool in criminal investigation. This identification is based on the genetic profile of the individual, the combination of several markers inherited from their parents. The markers are generally differences in nuclear and DNA sequences between individuals (polymorphisms). In some cases, the analysis of nuclear DNA cannot be applied, the most successful alternative is the analysis of mitochondrial DNA (mtDNA). Mitochondria are intracellular organelles with a double membrane present on all nucleated mammalian cells with separate and distinct extrachromosomal genome nuclear genome, the mt DNA.

Most laboratories use typing based mtDNA polymorphisms in the nucleotide sequence in the noncoding region (also known as the control region, the hypervariable or D-loop) of mtDNA. However, in some haplogroups classification may not be possible based on only control data region. Thus, studies suggest the need for additional typing single nucleotide polymorphisms (SNPs) in other regions of mtDNA, especially in cases where it is not possible to differentiate individuals only by the analysis of hypervariable region.

This study aimed to analyze, analyze thirty (30) SNPs of mtDNA in samples of unrelated individuals born and living in the State of Espírito Santo, allowing their classification in haplogroups and complementing the SNPs data of mtDNA control region achieved in previous work in the laboratory, for later use in forensic cases. A total of 100 samples, 19 were found haplogroups and the sample were classified according to its origin: 43% African, 30% European, 26% Native American, and 1% Asian. The haplogroup was found more L3 having African origin.

Some samples of previous work could not be correctly classified only with the sequencing of the control region of mtDNA, after analysis of 30 SNPs were properly identified in their respective haplogroups.

The results of this study contribute to the creation of a Brazilian database mitochondrial DNA and can be used by forensic science in the elucidation of forensic cases.

Keywords: Mitochondrial DNA; SNPs; SNaPshot; Haplogroups; Espírito Santo-Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – DNA mitocondrial.	19
Figura 2 – Esquema da Região Controle do DNA mitocondrial.....	20
Figura 3 – Migrações e variações dos haplogrupos classificados a partir do DNA mitocondrial.....	22
Figura 4 – Árvore Filogenética Simplificada do DNA mitocondrial	24
Figura 5 - Esquema do DNAMt com a localização geral dos 30SNPs analisados.....	32
Figura 6 – Árvore filogenética englobando haplogrupos europeus, africanos e nativo americanos gerada a partir dos 42 SNPs (PANETO).....	37
Figura 7 - : Multiplex I - Eletroferograma com o perfil genético de uma amostra para os 21 SNPs, mostrando todas as cores de nucleotídeos fluorescentes. RFU: Unidade de fluorescência relativa.....	39
Figura 8 - Multiplex II - Eletroferograma com o perfil genético da mesma amostra utilizada na figura anterior para os 9 SNPs do DNAMt. RFU: Unidade de fluorescência relativa.....	40
Figura 9 - Classificação das amostras da população do Espírito Santo conforme a origem dos haplogrupos.....	43
Figura 10 – Distribuição dos Haplogrupos de origem africana na população do Espírito Santo.....	44

Figura 11 - Distribuição dos Haplogrupos de origem europeia na população do Espírito Santo.....44

Figura 12 - Distribuição dos Haplogrupos de origem nativo americana na população do Espírito Santo.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência dos haplogrupos encontrados nas 100 amostras após análise de 30 SNPs pela reação de SNaPshot.....	42
Tabela 2 - Ancestralidade geográfica de diferentes regiões brasileiras e do estado do Espírito Santo relacionadas com o DNA mitocondrial.....	46
Tabela 3 – Resultados da análise dos 30 SNPs por SNaPshot e classificação em haplogrupos das 100 amostras.....	53
Tabela 4 – Informações sobre os <i>primers</i> utilizados na reação de PCR em <i>multiplex</i>	63
Tabela 5 – Informações sobre os <i>primers</i> utilizados na reação de SNaPshot em <i>multiplex</i>	65

ABREVIATURAS

A - Base nitrogenada adenina

ATP - Adenosina Trifosfato

C - Base nitrogenada citosina

rCRS - revised *Cambridge Reference Sequence*

ddNTP- Dideoxirribonucleotídeos Trifosfatados

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

D-loop - *Displacement loop*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAmt - DNA mitocondrial

EC - Eletroforese Capilar

FBI - *Federal Bureau of Investigation*

G - Base nitrogenada guanina

HV1 - Região Hipervariável 1

HV2 - Região Hipervariável 2

HV3 - Região Hipervariável 3

min - Minuto

N - Número da amostragem

nt - Nucleotídeo

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

qsp - Quantidade suficiente para

RNA - Ácido Ribonucléico

RFU - Unidade de fluorescência relativa

rpm - Rotação por minuto

seg - Segundos

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de base única)

T - Base nitrogenada timina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
G	Gramma
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
μg	Micrograma
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
U	Unidade
pmol	Picomol
X	Vezez
V	Versão

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mitocôndrias e DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas intracelulares de dupla membrana presentes em todas as células nucleadas de mamíferos (BANDELT et al., 2006) e são o centro de produção de energia na célula. Ela contém um genoma extracromossômico separado e distinto do genoma nuclear, o DNA mt (BUDOWLE et al., 2003).

O genoma mitocondrial humano foi completamente sequenciado em 1.981 por Anderson e colaboradores. Esta sequência foi reanalisada e revisada por Andrews e colaboradores em 1999, sendo modificada e denominada *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS). O DNAm_t é composto por 16.569 nucleotídeos e apresenta-se como uma dupla fita circular. Uma fita é rica em purinas (chamada fita-pesada) e a outra fita é rica em pirimidinas (chamada fita-leve). A maior parte desse genoma é formada por um total de 37 genes, todos envolvidos na produção de energia celular; treze (13) desses genes codificam proteínas utilizadas na fosforilação oxidativa, o restante codifica RNAs transportadores (22 genes) e RNAs ribossomais (2 genes) (BUDOWLE et al., 2003).

O DNAm_t representa de 1 a 2% do DNA nuclear na célula e sua composição química não difere em nada da composição do DNA nuclear, entretanto, ele possui um código genético próprio.

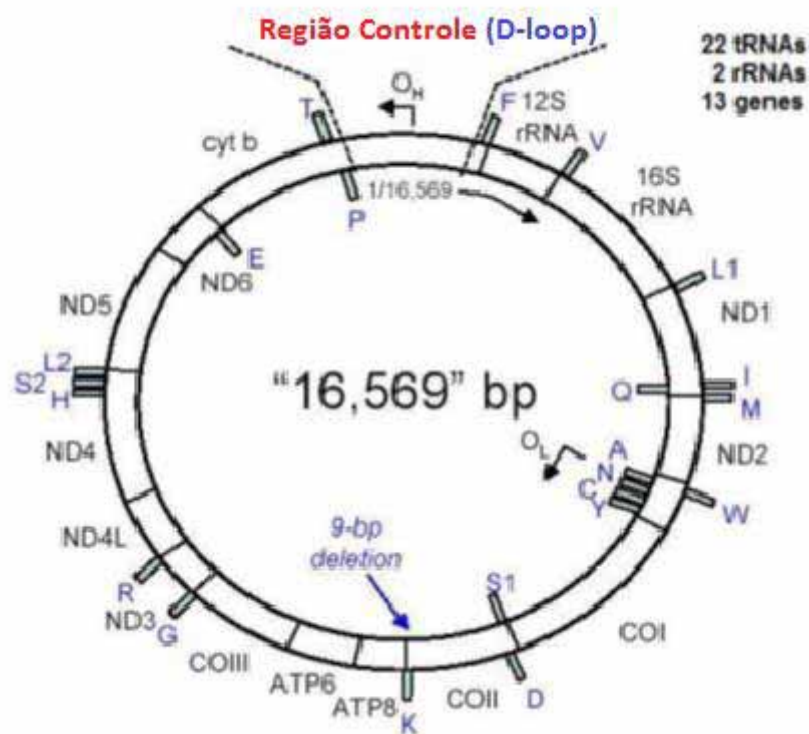
O genoma mitocondrial é haplóide devido a sua herança estritamente materna, por isso, não é submetido a processos de recombinação. Uma das características de interesse é o seu caráter monoclonal, ou seja, todo o DNA mt de um indivíduo apresenta a mesma sequência. A natureza haplóide e monoclonal simplificam a interpretação dos resultados no sequenciamento do DNAm_t (BUDOWLE et al., 2003), porém pode existir a condição de heteroplasmia, na qual ocorre a presença de mais de um tipo de DNAm_t em um único indivíduo, situação que é mais comumente encontrada em amostras de cabelo do que de sangue (PANETO et al., 2006).

Uma característica do DNAm_t é que ele está presente em média de 500 a 2.000 cópias por célula. Esta abundância aumenta significativamente as chances de que algumas cópias de DNAm_t permanecerão estáveis em ambientes que

apresentam condições não favoráveis à sua conservação (PARSONS; COBLE, 2001), além do que a natureza circular do DNAm_t o torna menos suscetível à degradação por exonucleases. (KASHYAP et al., 2004).

O genoma mitocondrial é composto pela região codificadora e região controle (Figura 1). Esta última contém o sinal que controla a síntese de DNA e RNA e também é conhecida como região não codificadora ou *D-loop*, pois se refere à fase inicial da replicação, quando a nova fita recém-sintetizada se desprende da fita molde formando uma “bolha” ou “loop”. Além disso, é conhecida como região hipervariável, devido ao seu acúmulo de mutações pontuais, apresentando taxa de mutação maior que a região codificadora e tal característica é, aproximadamente, dez vezes superior ao DNA nuclear, e pode ser explicada pela baixa fidelidade da DNAm_t polimerase e a aparente falta de mecanismos de reparo do DNAm_t (BUDOWLE et al., 2003). Esta taxa de erro pôde ser calculada, sendo a fidelidade média completa de polimerização de um erro a cada 440.000 bases incorporadas (LEE; JOHSON, 2006)

Figura 1 - DNA mitocondrial.



Fonte: Figura modificada de BUTLER, J. M. *Forensic DNA Typing*. London: Elsevier Academic Press, 2011.

1.2 Região Controle versus Região Codificadora

A região controle é formada por aproximadamente 1.122 pares de bases (pb) e, por ser altamente polimórfica, é muito utilizada para o propósito da genética forense. Esta região do DNAm^t inclui três sub-regiões hipervariáveis: HV1 (formada por 342 pb), HV2 (268 pb) e HV3 (137 pb), sendo esta última região um segmento que pode apresentar um tamanho variável de pares de base, pelo fato de conter repetições dinucleotídicas “CA”, cujo número pode diferir de um indivíduo para outro (LUTZ *et al.*, 2000; VANECEK *et al.*, 2004). Entre HV1, HV2 e HV3 existem duas regiões variáveis, as quais são raramente utilizadas para fins forenses (Figura 2). A maior parte da variação de sequência entre indivíduos é encontrada nos segmentos HV1 e HV2 e, por isso, são os mais utilizados na rotina forense para análise do

DNAmt. Entretanto, a região HV3 pode auxiliar essas análises (HOONG; LEK, 2005; ZHANG et al., 2005; LEE *et al.*, 2006; PANETO, 2011; SANCHES, 2013).

Figura 2 – Esquema da Região Controle do DNA mitocondrial



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

Uma vez que a região controle é relativamente enriquecida em variação de sequência, esta é mais utilizada em análises forenses. No entanto, a classificação em alguns haplogrupos não é possível com base nos dados apenas da região controle. Assim, com o objetivo de obter informações adicionais, ou seja, aumentar o grau de discriminação do DNAmt, estudos sugerem a tipagem adicional de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em outras regiões do DNAmt, nos casos em que não é possível diferenciar os indivíduos utilizando somente a análise da região hipervariável (COBLE et al., 2004).

Alguns autores já relataram casos na literatura onde houve necessidade de analisar polimorfismos adicionais, presentes na região codificadora do DNAmt, a fim de solucionar tais casos. Por isso, para confirmar ou atribuir informações dos haplogrupos previstos com base apenas na sequência da região controle, o uso de SNPs da região de codificadora é importante (PANETO, 2010; FRIDMAN, et al, 2011; JUST et al., 2010).

1.3 DNA mitocondrial: sua utilização na Genética Forense

A identificação humana por meio do DNA constitui um dos produtos mais revolucionários da Genética Moderna, tornando-se uma ferramenta indispensável na investigação criminal, e sendo aceita rotineiramente em processos judiciais em todo

o mundo. O perfil genético de um indivíduo, comumente 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) (citado em PANETO, 2010).

As primeiras técnicas forenses de identificação humana eram apropriadas apenas para análise de evidências biológicas que contivessem DNA nuclear. Atualmente, com o sequenciamento do DNA mitocondrial, essa limitação tem sido superada (LEE e LAAD, 2001). Assim quando o DNA nuclear da amostra apresentar-se muito degradado, ou quando o material biológico não apresentar o DNA nuclear, como é o caso de fios de cabelo sem raiz, ou em casos com investigação de parentesco entre gerações muito distantes, a única alternativa, ou pelo menos a alternativa de maior sucesso, é a análise do DNA mitocondrial (SALAS et al., 2001).

No contexto da análise forense, o interesse pelo DNAMt surgiu por vários motivos: primeiro, esse DNA também contém regiões polimórficas que permitem sua individualização; segundo, os descendentes recebem esse DNA apenas da mãe, o que permite traçar a linhagem materna de uma pessoa; e, terceiro, é mais resistente à degradação que o DNA nuclear, além de estar presente em várias cópias por célula. Assim, em grandes desastres (incêndios, explosões, queda de avião etc.), quando é mais difícil identificar os corpos, analisa-se o DNA mt (ANJOS et al., 2004), o qual é extraído dos restos mortais e a seqüência de interesse é comparada com seqüências obtidas de irmãos ou ascendentes maternos ou amostras de pertences da própria vítima.

A herança materna e alta taxa de mutação são características extremamente úteis também para estudos evolutivos, assim, o DNAMt tem sido utilizado para resolver questões evolutivas relacionadas a espécies extintas e as migrações humanas em todos os continentes (Figura 3). O campo da ciência forense também depende do DNAMt para identificar pessoas desaparecidas, localizar parentes maternos, identificar as vítimas em desastres de massa, e, em algumas situações, excluir um indivíduo da cena de crime (NELSON et al., 2007).

Figura 3 – Migrações e variações dos haplogrupos classificados a partir do DNA mitocondrial.



Fonte: <http://en.academic.ru>. Acesso em: Dezembro de 2014.

A maioria dos laboratórios que utilizam tipagem do DNAmt baseiam-se nos polimorfismos (SNPs, deleções e inserções) presentes na sequência de nucleotídeos nas regiões HV1 e HV2, comparando a amostra questionada com a sequência referência revisada de Cambridge (rCRS) para a anotação das diferenças (polimorfismos). A sequência da amostra questionada é então comparada com a da amostra referência (do indivíduo em questão ou de parentes com vínculo materno). (PANETO, 2010). De acordo com o FBI, se a sequência da amostra questionada e do segmento (referência) diferirem em dois ou mais polimorfismos, uma exclusão inequívoca pode ser feita. No caso das amostras diferirem em apenas um (01) nucleotídeo, o resultado é dito inconclusivo e procede-se à verificação de outras regiões polimórficas, como por exemplo, HV3 ou SNPs da região codificadora (PANETO, 2010). Se as sequências corresponderem uma à outra, existe a possibilidade da amostra questionada pertencer ao indivíduo em questão ou a qualquer outro indivíduo relacionado a ele por via materna. Existe ainda a possibilidade de a amostra pertencer a outro indivíduo em questão não aparentado ao suspeito. Por essa razão, é necessário verificar a frequência com que esse conjunto de polimorfismo ocorre na população (frequência do haplótipo), gerando a

necessidade da criação de um banco de dados populacional de DNAmT (HOLLAND; PARSONS, 1999).

Haplótipos pouco frequentes indicam maior probabilidade da amostra questionada ser realmente originada da amostra referência. Haplótipos muito frequentes indicam menor probabilidade de coincidência, já que muitos indivíduos apresentam o mesmo conjunto de polimorfismos naquela população (LUTZ et al., 2000).

1.4 Classificação em Haplogrupos

A classificação do DNAmT em haplogrupos tem sido uma importante ferramenta utilizada em genética de populações, em casos forense e em estudos genéticos de doenças (COBLE *et al*, 2004). 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).

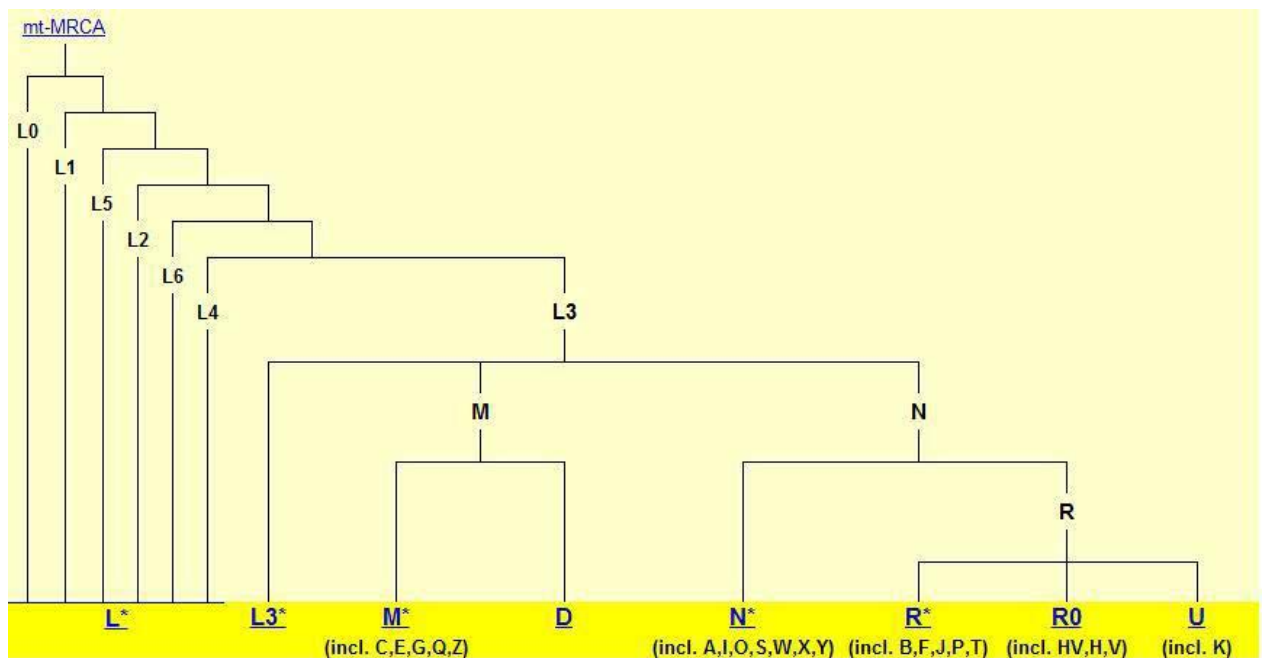
Detectados os polimorfismos, estes são então marcados como diferenças ("mutações") quando comparados com a rCRS. O termo "haplogrupo" refere-se ao conjunto de haplótipos derivados por descendência da mesma molécula ancestral, possuindo o mesmo padrão basal de mutações. Haplogrupos são definidos por motivos, constituídos de nucleotídeos particulares presentes nas regiões não-codificadora e codificadora do DNAmT. Assim, a classificação filogenética oferece suporte ao banco de dados, permitindo a detecção de incoerências nos resultados (BANDELT et al., 2006).

A nomenclatura utilizada para haplogrupos é designada por letras do alfabeto, e os primeiros haplogrupos do DNA mitocondrial, baseados em análise de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), descobertos em nativos americanos, foram batizados A, B, C e D (Torrioni et al., 1993). Haplogrupos posteriormente detectados foram designados usando outras letras do alfabeto e número (sistema alfanumérico). Subgrupos dentro de um haplogrupo, ou seja 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).

A fim de facilitar a utilização da variação global dos haplogrupos classificados por meio do DNAmT humano foi construída uma árvore filogenética mitocondrial abrangente e atualizada (Figura 4) com base em mutações presentes nas regiões não-codificadora e codificadora.

Figura 4 – Árvore Filogenética Simplificada do DNA mitocondrial



Fonte: <http://www.phylotree.org/tree/main.htm>. Acesso em: outubro 2014.

Supõe-se que todos os tipos de DNAmT da espécie humana possuem um único ancestral matrilinear comum que viveu há cerca de 200.000 anos na África (na figura 4 é representado por mt-MRCA) (MACAULAY, et al., 2005; MISHMAR, et al., 2003; BEHAR, et al., 2008). Assim, as variações da sequência do DNAmT evoluíram como um resultado da acumulação sequencial de mutações ao longo de linhagens maternamente herdadas, as quais podem ser representadas em uma árvore,

refletindo as relações filogenéticas de variantes de DNAm_t conhecidas (VAN OVEN; KAYSER, 2008).

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).

1.5 Banco de Dados do DNA mitocondrial

A criação de banco de dados de DNAm_t 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 et al, 2010). Atualmente, existem algumas ferramentas de bioinformática que podem ser utilizadas para evitar que esses erros humanos sejam cometidos; exemplo: 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 DNAm_t ou haplogrupos em todo o mundo e, uma enorme árvore filogenética dos haplogrupos observados, sub-haplogrupos e macrohaplogroups (BANDELDT, 2006).

No campo da identificação humana, as revistas científicas de maior impacto já exigem que os resultados de trabalhos envolvendo análises de DNAm_t e outros tipos

de análises gerado por pesquisadores, sejam adicionadas à bancos de dados para que se possam ser publicados. Um exemplo de banco de dados que foi desenvolvido com rigorosos parâmetros de qualidade é o banco de dados mundial EMPOP, o qual vem sendo rotineiramente revisado e atualizado. 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.

No Brasil, poucos laboratórios dispõem do conhecimento e experiência, necessários para a análise e interpretação do DNAMt. A Polícia Técnica Científica equipou laboratórios públicos para a análise de DNA em diferentes Estados brasileiros, os quais utilizam as diversas técnicas de identificação humana. Assim, faz-se necessário o estudo das frequências dos marcadores moleculares na população brasileira, como as frequências dos haplótipos do DNAMt, com a geração de resultados de alta qualidade e submissão dos mesmos em bancos de dados internacionais, viabilizando sua aplicação também no contexto forense brasileiro (PANETO, 2010).

Como a população brasileira é altamente miscigenada, apresentando origem europeia, africana e nativo-americana, a análise de um grande número de SNPs do DNAMt (compreendendo ambas regiões controle e codificadora) é necessária para permitir a classificação de todos os prováveis haplogrupos. Atualmente, essa classificação é feita utilizando-se a técnica de SNaPshot que permite a análise de diversos SNPs em uma única reação em *multiplex* (PANETO, 2010).

A reação de SNaPshot é baseada na extensão de um único dideoxynucleotídeo trifosfatado (ddNTP) em um oligonucleotídeo não marcado na porção 3' imediatamente adjacente ao SNP (na ausência de dideoxynucleotídeo trifosfatado na reação). Cada ddNTP é ligado com diferentes fluorescências e uma quinta cor é utilizada para o marcador de tamanho interno (LIZ 120). Esta técnica está em uso crescente devido a detecção rápida de vários polimorfismos em um único ensaio (MATTHEW et al, 2001). A capacidade *multiplex* é particularmente importante, especialmente no que diz respeito à análise de DNA forense, uma vez que reduz o consumo de amostras, enquanto aumenta o rendimento do processamento das amostras e análise de dados (NELSON et al, 2007).

A proposta de se analisar polimorfismos da região controle e codificadora em indivíduos residentes no estado do Espírito Santo ocorreu pela ausência de dados na literatura sobre indivíduos desse estado brasileiro. Uma dissertação de mestrado desenvolvida no laboratório da orientadora apresentou os dados do sequenciamento

da região controle do DNAm de 100 amostras de indivíduos do Espírito Santo (SANCHES, 2013) As mesmas amostras foram utilizadas na reação de SNaPshot, neste trabalho, para a complementação dos dados e correta classificação em haplogrupos desses indivíduos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Caracterizar os haplogrupos do DNAmT na população do estado do Espírito Santo pela análise de 30 SNPs do DNAmT.

- Avaliar a eficiência forense do sistema SNaPshot em relação aos dados obtidos por sequenciamento da região controle nos mesmos envolvidos (trabalho de SANCHES, 2013)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram coletadas amostras de sangue de 100 indivíduos, cujos critérios de inclusão é que fossem nascidos e residentes no Estado do Espírito Santo e não houvesse indivíduos aparentados. A coleta do material biológico (sangue) foi realizada no Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo – HEMOES, no momento da triagem para doação sanguínea. As demais etapas deste projeto foram realizadas no laboratório de Investigação de Paternidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara – SP.

A utilização das amostras tiveram o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Nº 03/2011.

4.2 Seleção dos SNPs

Paneto et al. (2011) analisou 42 polimorfismos SNPs do DNAmT que foram selecionados a fim de permitir a classificação em haplogrupos de indivíduos brasileiros. Selecionou-se 30, dos quais 28 estão presentes na região codificadora, sendo 1 deles uma deleção, e 2 SNPs (T16362C e T16569C) presentes na região não codificadora, os quais apresentam um aumento do poder discriminatório. A escolha destes polimorfismos se deu por serem suficientes para permitir a classificação desta população em haplogrupos europeus, africanos e nativo americanos, apresentando relevância para a classificação em haplogrupos da população brasileira.

Esta seleção foi feita utilizando uma reação de SNaPshot em *multiplex*, previamente publicada (KOHNEMANN et al., 2009), a qual permitia a classificação de amostras em haplogrupos europeus; nesta foram adicionados SNPs para a classificação de nativo americanos (A, B, C, D) e africanos (L0, L1, L2, L3, L4, L5 e L6) permitindo assim a classificação correta da população brasileira, que é altamente miscigenada, baseada em haplogrupos já descritos na literatura (ALVES-SILVA et al., 2000).

4.3 Extração do DNAm em amostras de sangue

As amostras de cada indivíduo foram previamente coletadas para a utilização em projetos anteriores e estavam armazenadas em cartão FTA a temperatura ambiente. Para a extração do DNA das amostras de sangue, foram cortados dois discos de 3 mm de papel filtro FTA – Whatman, utilizando *Harris Micro Punch Cutting Mat*, contendo o sangue e o DNA foi extraído pela a resina *Chelex* (BIO-RAD), com o protocolo descrito por Singer-Sam, et al., (1989), como segue:

Em microtubo de 1,5mL, foram colocados os dois discos de papel contendo a amostra (sangue), adicionando-se 50µL de água ultrapura Mili-Q submetendo-se ao vortex e a água foi descartada. Adicionou-se novamente 50µL de água ultrapura Mili-Q e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos. Após isso, a amostra foi centrifugada por 1 minuto (14.000g) e em seguida, descartou-se a água. Adicionou-se, então, 100µL de resina *Chelex* 5%, incubando-se por uma hora a 56 °C. A amostra foi então submetida ao vortex e incubada por 8 minutos a 100 °C. Para finalizar, as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, com as devidas identificações, cuidadosamente para que a resina precipitada não fosse aspirada. Ao fim da extração, cada uma das amostras foi quantificada com o equipamento Sellex e armazenadas a 4°C.

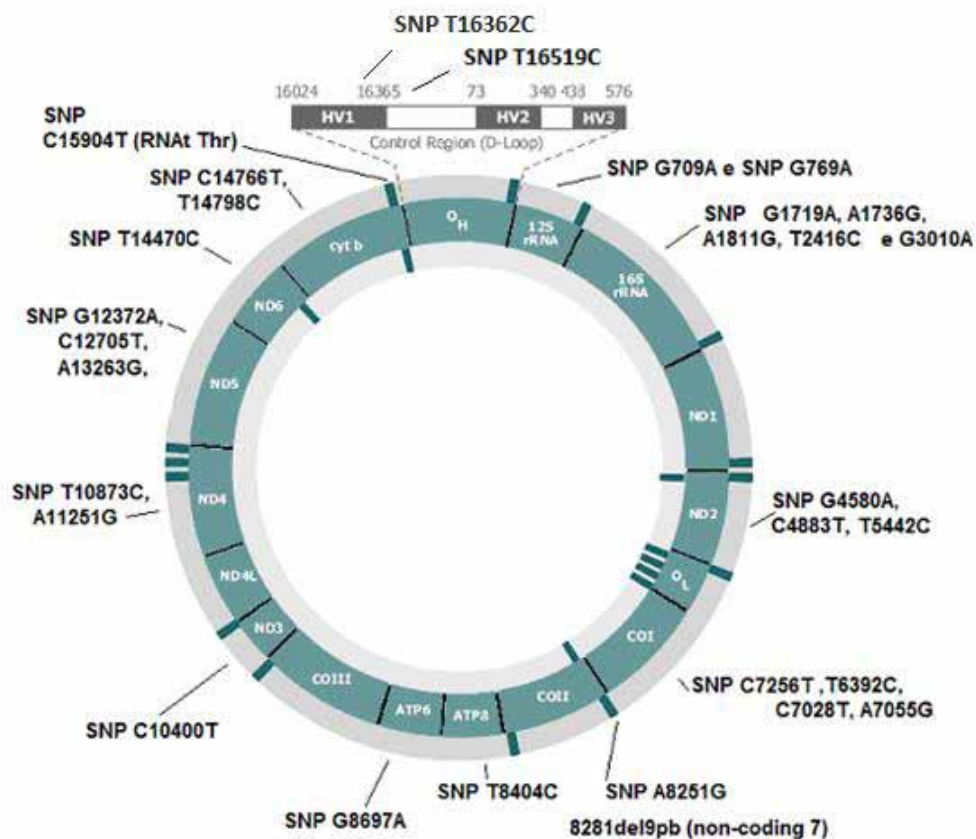
4.4 Reação de SNaPshot

Todas as etapas do SNaPshot foram realizadas conforme o protocolo descrito por Paneto (2010) com algumas modificações. As reações de PCR e SNaPshot foram feitas em duas reações distintas, *Multiplex I*, para 21 SNPs e *Multiplex II* para 9 SNPs, pois devido à algumas mudanças, como de equipamentos, foi necessária a padronização da reação no laboratório.

Os *primers* utilizados na reação de PCR em *multiplex* foram desenhados por Paneto et al., (2011), utilizando o programa Pearl Primer (MARSHALL, 2004), sendo utilizados 24 pares de *primers* para a amplificação de todas as regiões contendo os SNPs analisados. Os tamanhos dos *amplicons* variaram de 55 a 196 pares de

bases. As informações com as sequências dos *primers* estão contidas na Tabela 4 (Apêndice A). A figura 5 apresenta um esquema do DNAmT com a localização dos SNPs utilizados neste projeto.

Figura 5: Esquema do DNAmT com a localização geral dos 30SNPs analisados.



Fonte: Figura modificada de PANETO (2010).

4.4.1 Reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em *multiplex*

As reações de PCR para cada amostra foram realizadas dois *multiplex*: *Multiplex I* contendo os *primers forward* e *reverse* para os seguintes SNPs: G709A, G769A, T2416C, G3010A, G4580A, C4883T, T5442C, C7256T, G8251A, DEL8281, C10400T, T10873C, A11251G, G12372A, C12705T, A13263G, T14470A, C14766T, T14798C, C15904T, T16362C; *Multiplex II* com os *primers* que referentes aos SNPs:

G1719A, A1811G, A1736G, T6392C, C7028T, A7055G, T8404C, G8697A, T16519C.

As reações de PCR em *multiplex* foram realizadas como segue:

- 1,25 mM MgCl₂;
- 1,0 mM dNTPs;
- 1X PCR Gold buffer (10x) (Applied Biosystems by Life Technologies)
- 0,32 mg/mL de soro albumina bovina (20 mg/mL);
- 0,08 U/μL AmpliTaq *Gold* (Applied Biosystems by Life Technologies);
- 100 pg de DNA da amostra
- *mix primers* (Tabela 4, Apêndice A)
- água ultrapura (Mili-Q) autoclavada q.s.p. 12,5μl.

As amplificações se realizaram em termociclador Veriti (Applied Biosystems by Life Technologies) utilizando-se as seguintes ciclagens:

95 °C – 10 min
 95 °C – 30 seg }
 55 °C – 45 seg } 3 ciclos
 72 °C – 30 seg }

95 °C – 30 seg }
 53* °C – 45 seg } 19 ciclos
 72 °C – 30 seg }
 *aumento de 0,2 °C por ciclo

95 °C – 30 seg }
 60 °C – 45 seg } 11 ciclos
 72 °C – 30 seg }

72° - 7 min

4.4.2 Purificação do Produto de PCR

Os produtos da reação de PCR foram previamente purificados por uma reação enzimática antes da reação de SNaPshot, para a retirada de nucleotídeos e excesso de *primers*, adicionando-se 1,5µL de ExoStar (GE Healthcare), incubados por 120 minutos a 37 °C, seguida de desnaturação da enzima a 75 °C por 15 min.

4.4.3 Reação de SNaPshot

Os *primers* utilizados na reação de SNaPshot foram desenhados manualmente por Paneto et al., (2011), permitindo que se anelassem a um nucleotídeo antes da posição do SNP a genotipar. Adicionou-se uma cauda nucleotídica descrita por Sanchez et al (2005), com diferentes números de bases à região 5` de cada *primer*. Esta cauda permite a separação dos fragmentos por diferentes tamanhos durante a eletroforese capilar. As informações dos *primers* utilizados na reação de SNaPshot estão presentes na Tabela 5 (Apêndice A)

A reação de SNaPshot foi realizada utilizando-se o ABI PRISM SNaPshot Multiplex kit (Applied Biosystems by Life Technologies) conforme segue:

- 2,5 µl SNaPshot Master mix;
- 0,5 µl PCR Gold Buffer 10x (Applied Biosystems by Life Technologies);
- 0,5 µl do mix de *primers* (Tabela 5, Apêndice A)
- 1,0 µl do produto de PCR purificado;
- água ultrapura (Mili-Q) autoclavada qsp. 10µl.

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems) utilizando-se a seguinte ciclagem:

96 °C – 10 seg	}	25 ciclos
55 °C – 5 seg		
60 °C – 30 seg		

4.4.4 Purificação do Produto da Reação de SNaPshot

Os produtos da reação de SNaPshot foram purificados por tratamento enzimático, adicionando-se 1,25 µl de SAP (fosfatase alcalina de camarão - AFFYMETRIX/USB), e incubação por 75 min a 37°C, seguida de desnaturação da enzima por 15 min a 75°C.

4.5 Eletroforese Capilar

Para a eletroforese capilar, as amostras foram preparadas em placa de 96 poços utilizando-se:

- 1 µl do produto da reação de SNaPshot purificado;
- 9,0 µl de formamida HI-DI (Applied Biosystems by Life Technologies)
- 0,5 µl de LIZ 120 (Applied Biosystems by Life Technologies).

Em seguida, a placa foi aquecida a 95°C em termociclador Veriti (Applied Biosystems) por 3 minutos, com a tampa aberta e, então, colocada em gelo por 3 minutos.

As amostras foram então submetidas à eletroforese capilar no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems by Life Technologies), utilizando o polímero POP-7 (Applied Biosystems by Life Technologies) e capilar de 50 cm (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.6 Análise das reações de SNaPshot

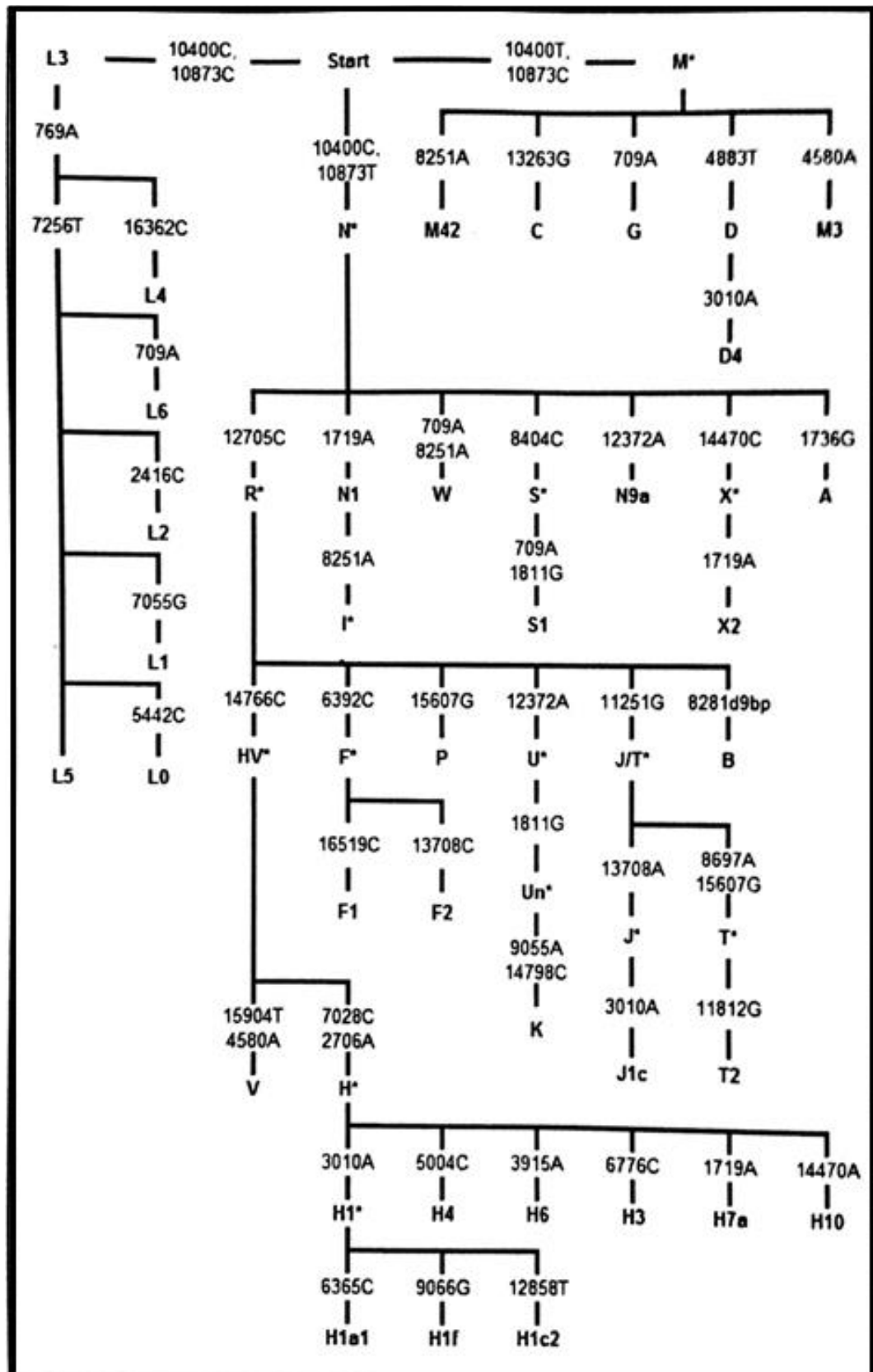
Os eletroferogramas com os perfis de SNPs do DNAm_t, obtidos por reações de SNaPshot, foram analisados no software Gene Mapper v 3.2 (Applied Biosystems by Life Technologies).

4.7 Classificação da amostras em Haplogrupos

A partir dos perfis de SNPs do DNAm, as amostras foram classificadas em haplogrupos, conforme o fluxograma descrito por Paneto (2010) (Figura 6), o qual permite a correta classificação de amostras provenientes da população brasileira. Estas foram confirmadas por Phylotree.org (VAN OVEN; KAYSER, 2009) e Haplogrep (www.haplogrep.uibk.ac.at).

Para a classificação de uma amostra deve iniciar-se pela posição START (SNPS 10400 e 10873) seguindo-se conforme os alelos de cada SNP presentes na amostra até encontrar o haplogrupo correspondente.

Figura 6: Árvore filogenética englobando haplogrupos europeus, africanos e nativo americanos gerada a partir dos 42 SNPs (PANETO 2010).



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da reação de SNaPshot

A classificação em haplogrupo é baseada apenas na análise da região hipervariável, utilizando a técnica de sequenciamento, e, em alguns casos pode ser deficiente, não expressando a correta classificação em haplogrupos. Assim, em trabalho anterior da equipe da orientadora, foi sequenciada a região hipervariável das 100 amostras, cujos dados estão sendo complementados neste momento. A análise dos 28 SNPs da região codificadora e 2 SNP da região hipervariável, complementou estes dados, dando mais confiabilidade na classificação destas amostras.

Neste trabalho foram obtidos os 30 SNPs das 100 amostras analisadas que podem ser visualizados na tabela 3, apêndice A. E que foram obtidos através da reação de SNaPshot e posterior eletroforese capilar gerando eletroferogramas, que podem ser vistos nas figuras 7 (*Multiplex I*) e 8 (*Multiplex II*) como exemplo de uma das amostras. Os nucleotídeos adicionados na reação de SNaPshot foram marcados com fluorescência de forma que nos eletroferogramas os SNPs G são vistos na coloração azul, os SNPs A são vistos na coloração verde, os C são visto na coloração preta e os T na coloração amarela.

Figura 7: *Multiplex I* - Eletroferograma com o perfil genético de uma amostra para os 21 SNPs, mostrando todas as cores de nucleotídeos fluorescentes. RFU: Unidade de fluorescência relativa.

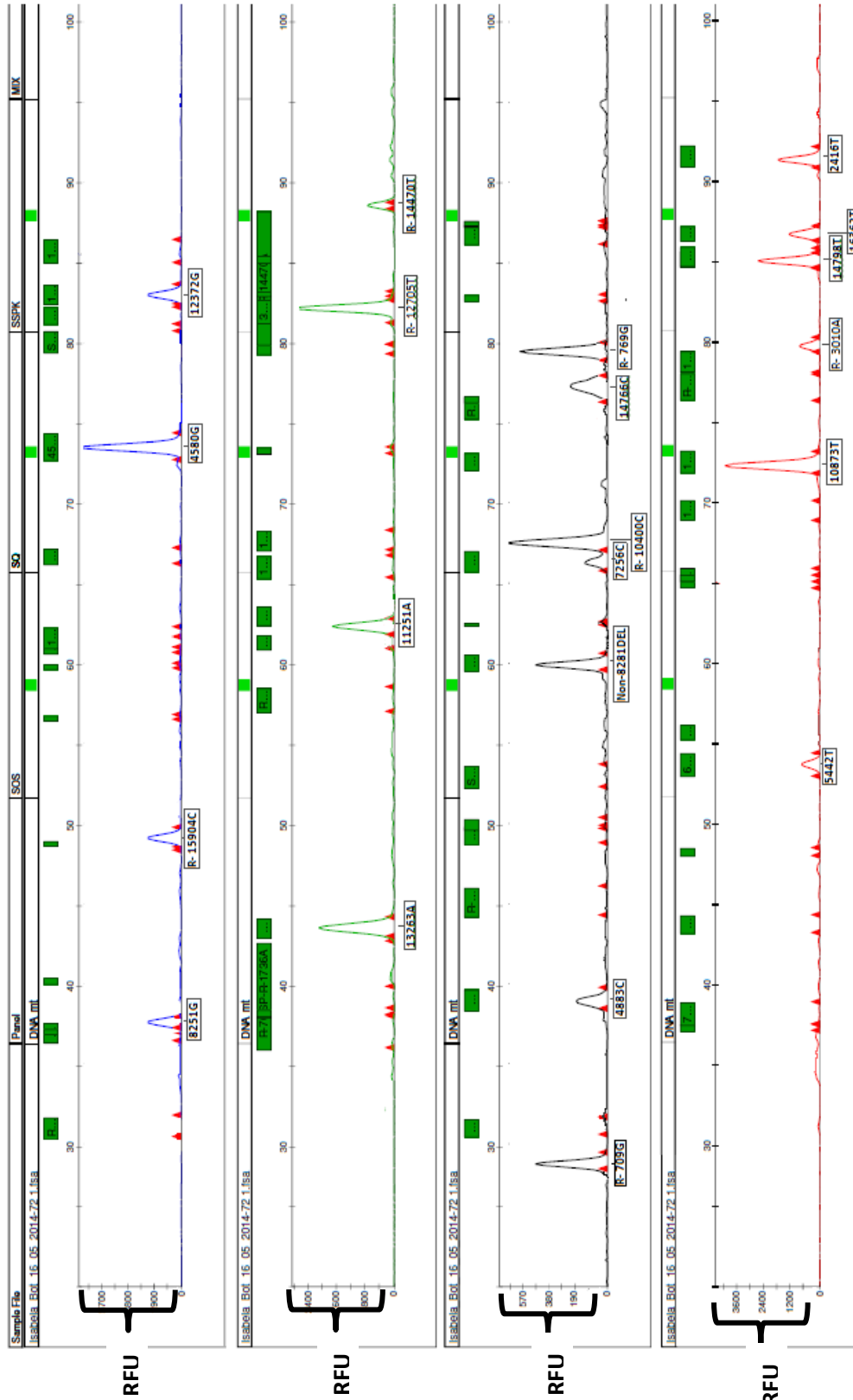
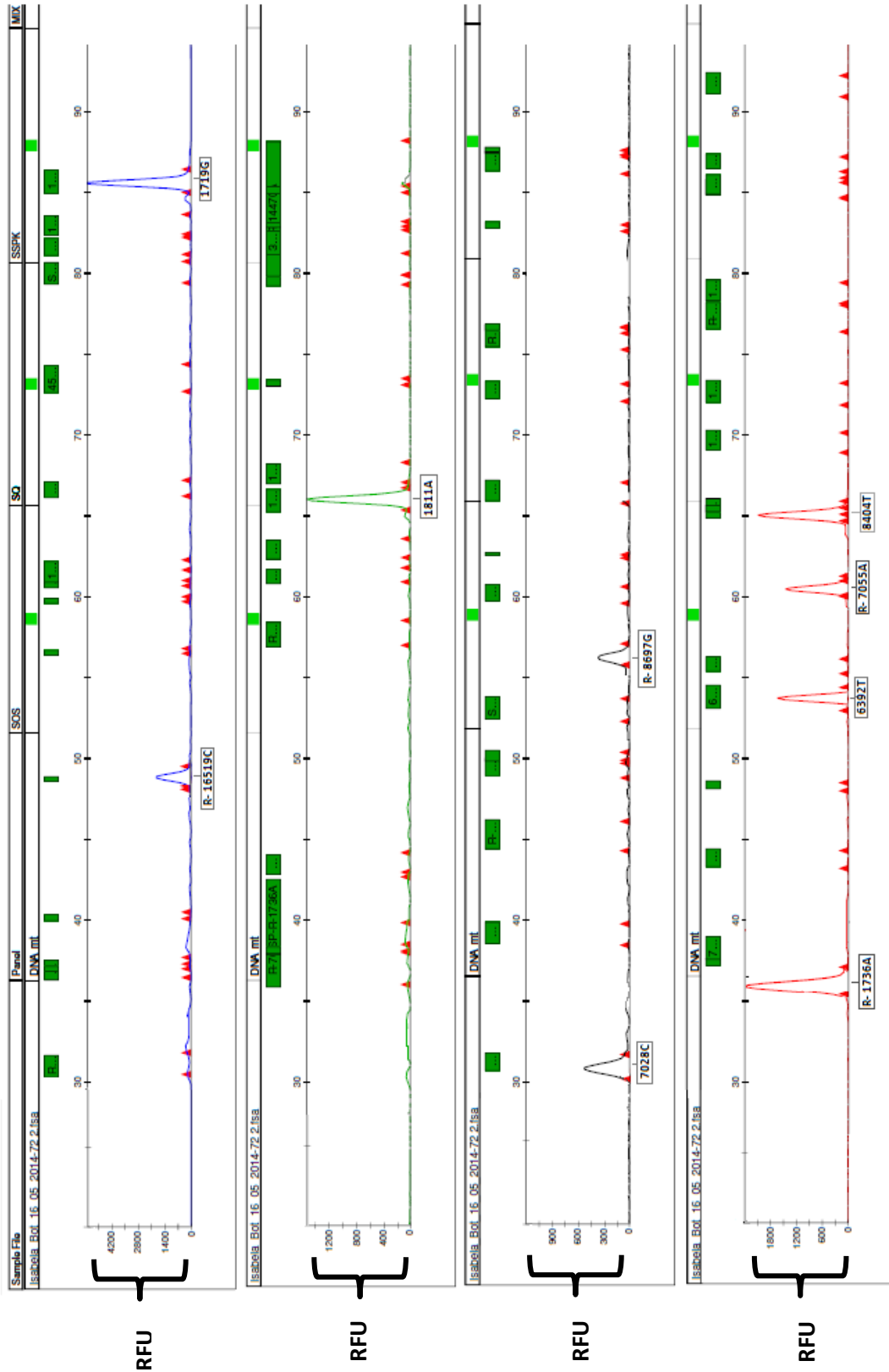


Figura 8: *Multiplex II* - Eletroferograma com o perfil genético da mesma amostra utilizada na figura anterior para os 9 SNPs do DNAmT. RFU: Unidade de fluorescência relativa.



5.2 Classificação das amostras e origem dos haplogrupos

Após a obtenção dos 30 SNPs (Tabela 3, Apêndice A), as amostras foram classificadas em haplogrupos (figura 6) utilizando o painel elaborado por Paneto (2010). No trabalho de Sanches (2013), quatro amostras (25, 30, 94 e 98) não puderam ser classificadas em seus respectivos haplogrupos somente com os dados do sequenciamento da região controle do DNAm, por não apresentarem como resultado final um único haplogrupo para sua classificação; assim, utilizando-se a análise dos 30 SNPs contidos no DNAm destas amostras, obtidos a partir da reação de SNaPshot, essas puderam ser adequadamente classificadas nos haplogrupos L2, T2, U* e H1* respectivamente, mostrando que os SNPs foram suficientes para a classificação desta população, obtendo-se, desse modo, um resultado consistente e aceitável.

Dentre as 100 amostras analisadas, encontraram-se 19 haplogrupos diferentes (Tabela 1) os quais foram classificados conforme a origem da população como africana, europeia, nativa americana e asiática.

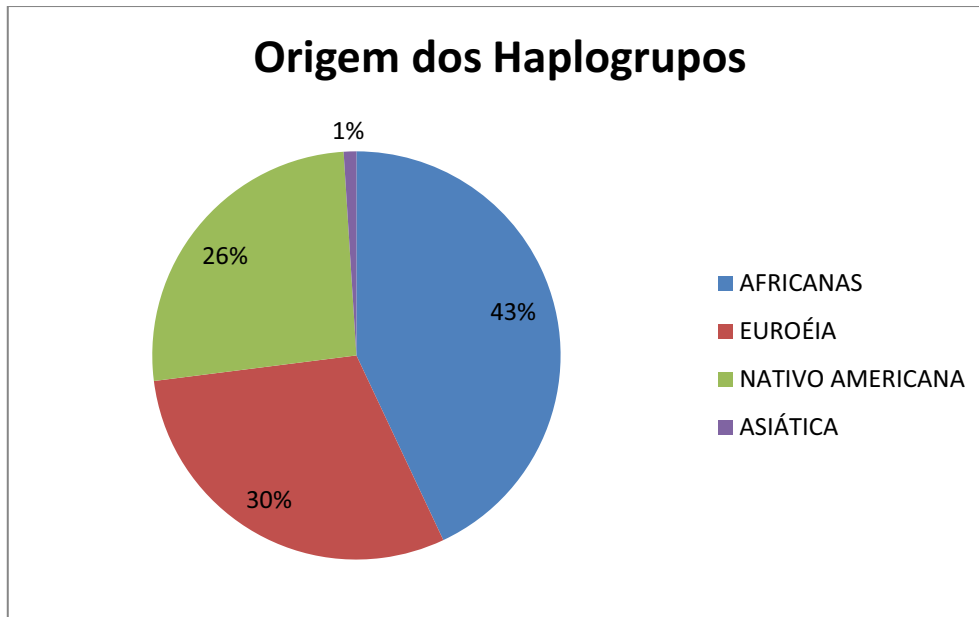
A tabela 1 resume as frequências dos haplogrupos encontrados nessa amostragem.

Tabela 1: Frequência dos haplogrupos na população do Espírito Santo (N=100) pela análise de 30 SNPs do DNAm

Haplogrupos	Origem do Haplogrupos	Frequência dos Haplogrupos
L3	Africana	15%
L2	Africana	13%
A	Nativo Americana	11%
L1	Africana	11%
C	Nativo Americana	7%
HV	Européia	7%
H1*	Européia	5%
B	Nativo Americana	4%
D	Nativo Americana	4%
H	Européia	4%
L0	Africana	4%
T2	Européia	3%
U*	Européia	3%
H6	Européia	2%
K	Européia	2%
T*	Européia	2%
J1c	Européia	1%
M*	Asiática	1%
X*	Européia	1%

A partir destes resultados, foi possível classificar e distribuir a população estudada em 43% de origem africana, 26% de origem nativo americana, 30% de origem europeia e 1% de origem asiática (Figura 9).

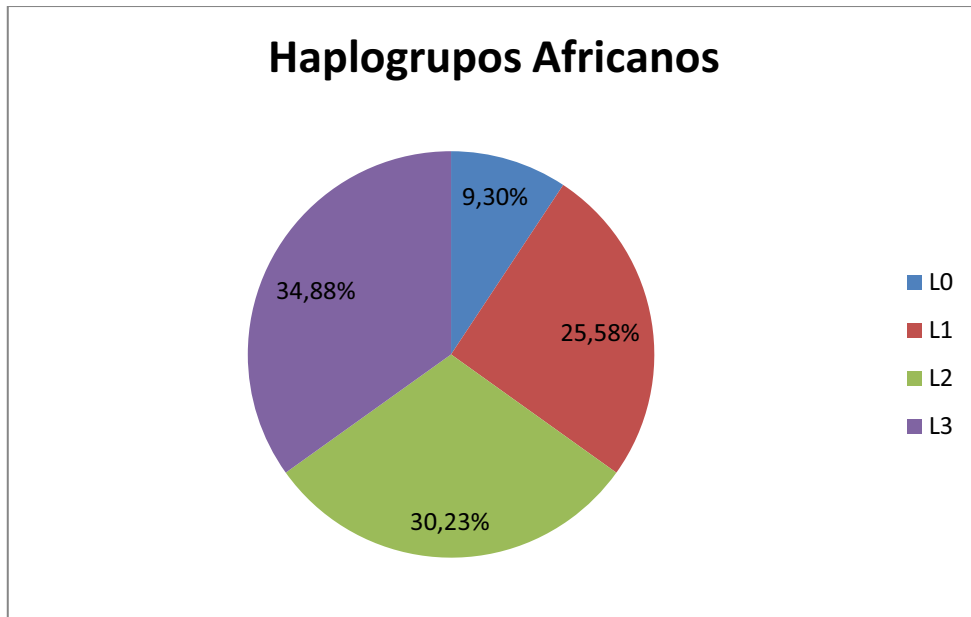
Figura 9: Classificação das amostras da população do Espírito Santo conforme a origem dos haplogrupos.



O haplogrupo africano L divide-se em grandes haplogrupos e os encontrados nesta população foram: L0, L1, L2, L3. Os haplogrupos encontrados que apresentam origem europeia foram: H, H1*, H6, HV, J1c, K, T*, T2, U*, X*. Os haplogrupos de origem nativo americana encontrados foram: A, B, C e D; e o único haplogrupo asiático encontrado foi o M*.

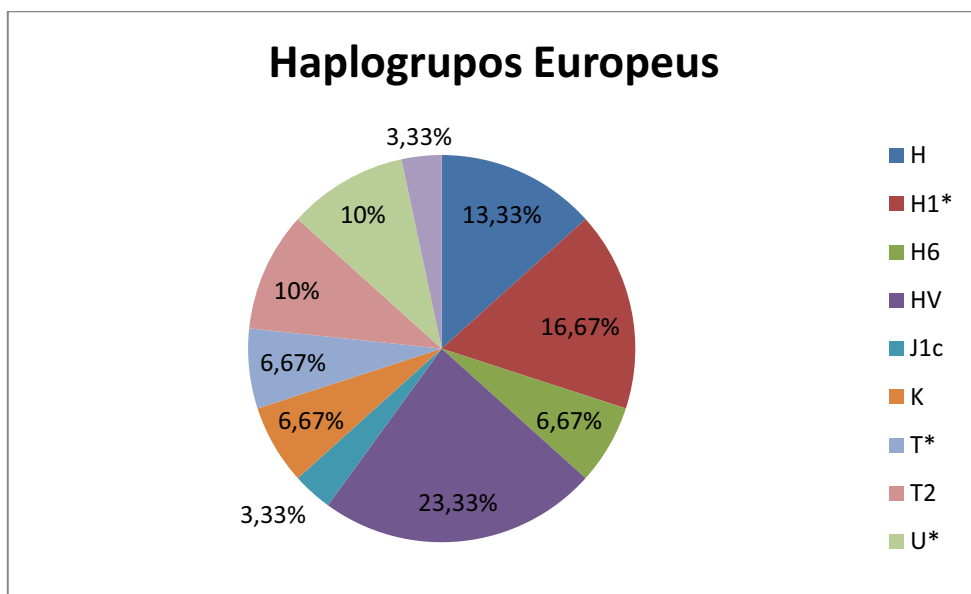
Dentre as amostras de origem africana, o haplogrupo mais prevalente foi o L3, representando 43% das amostras (Figura 10).

Figura 10: Distribuição dos Haplogrupos de origem africana na população do Espírito Santo.



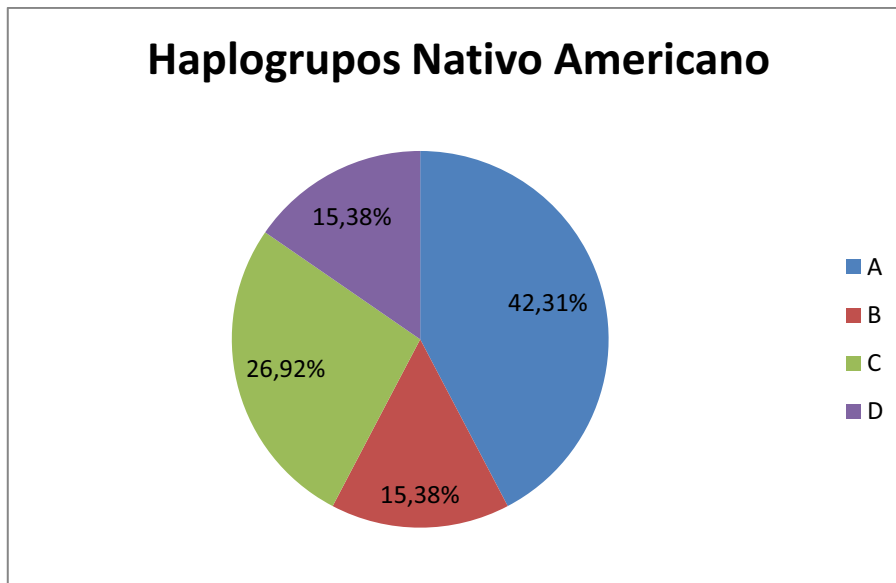
Dentre as amostras de origem europeia, o haplogrupo mais frequente foi HV, seguido por H1*, H, T2, U*, K, H6, T*, J1c e X* (Figura 11).

Figura 11: Distribuição dos Haplogrupos de origem europeia na população do Espírito Santo.



O haplogrupo de origem nativo americana mais encontrado foi o A, seguido por C, B e D (Figura 12).

Figura 12: Distribuição dos Haplogrupos de origem nativo americana na população do Espírito Santo.



O único haplogrupo encontrado com origem asiático foi o haplogrupo M*.

O haplogrupo mais frequente dentre as 100 amostras analisadas foi o L3 de origem africana enquanto que os menos frequentes foram J1c, M* e X* de origem europeia, asiática e europeia, respectivamente.

Na literatura foram encontrados dois estudos realizados com a população do sudeste brasileiro (ALVES-SILVA et al, 2000) e outro com a população da grande São Paulo (PANETO, 2010), cujos resultados foram os seguintes: 34% (africana), 33% (nativo americana), 31% (européia) e 46,6% (africana), 26,1% (nativo americana) e 27,3% (européia), respectivamente.

Nossos resultados assemelham-se mais aos de Paneto (2010), como esperado, já que ambos os estudos foram realizados em estados brasileiros localizados na mesma região (Região Sudeste) do país. Os dados também estão de acordo com a história do Brasil, que antes da descoberta era habitado por nativo americanos; porém, durante a sua ocupação ocorreu um declínio demográfico devido a conflitos

com os colonizadores e doenças trazidas pelos mesmos. O número de africanos reflete o período da escravidão, pois os negros foram trazidos em larga escala da África para inicialmente trabalharem em fazendas de cana de açúcar e, após este período, muitos deles foram ao Espírito Santo devido às descobertas de jazidas no interior do estado.

O grande número de europeus deve-se à imigração principalmente de portugueses, que chegaram entre 1.500 a 1.808. A imigração asiática também ocorreu, porém em menor escala (AIVES-SILVA et al, 2000).

Ao compararmos os resultados deste trabalho com o de Sanches (2013), vemos que houve uma pequena modificação, com aumento na frequência de haplogrupos de origem europeia e consequente diminuição da frequência de haplogrupos com origem nativo americana, pois algumas amostras tiveram, neste trabalho, uma reclassificação em haplogrupos mais consistente (Tabela 2).

Tabela 2: Ancestralidade geográfica de diferentes regiões brasileiras e do estado do Espírito Santo, relacionada com o DNA mitocondrial.

Regiões	N	Africanos	Europeus	Nativo-americanos	Referência
Sudeste (ES) 1	100	43%	30%	26%	Presente trabalho
Sudeste (ES)2	100	43%	33%	24%	Sanches, 2013.
Sudeste (SP)	160	46,60%	27,30%	26,10%	Paneto et al., 2010
Sudeste	99	34%	31%	33%	Alves-Silva et al., 2000
Nordeste (AL)	157	46,5%	19,1%	34,4%	Barbosa et al., 2008
Nordeste	50	44%	34%	22%	Alves-Silva et al., 2000
Norte	48	15%	31%	54%	Alves-Silva et al., 2000
Sul (SC)	80	21,20%	63,80%	15%	Palencia et al., 2010
Sul	50	12%	66%	22%	Alves-Silva et al., 2000

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

Os dados de frequência encontrados no presente estudo apresentam forte semelhança com as frequências relatadas por Paneto (2010), em estudo realizado com a região da grande São Paulo, pois ambos os estados brasileiros localizam-se na mesma região do Brasil (sudeste), com predominância de linhagens de origem africana, seguida por europeus e nativo-americanas, o que era esperado levando-se em conta a história de colonização desta região.

Em estudos realizados na região nordeste observou-se uma predominância de linhagens africanas assim como os dados relatados para a região sudeste, porém com incidência marcante de nativo-americanos, enquanto na região norte esta linhagem foi predominante, principalmente quando comparado com a frequência do mesmo haplogrupo no restante do país.

Estudos realizados na região sul do país mostraram a presença mais marcante de linhagens europeias, visto que esta região recebeu um grande número de imigrantes vindos da Europa, principalmente da Alemanha, Itália e Portugal, durante sua colonização (PALENCIA et al, 2010).

Os dados confirmam, portanto, que a população brasileira é altamente miscigenada, mostrando a grande diversidade de linhagens quando cotejadas as regiões do país, sendo a população mais miscigenada do mundo, resultado de cruzamentos étnicos entre os povos de três continentes: colonizadores europeus, escravos africanos e os nativo-americanos (ALVES-SILVA et al, 2010).

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

6. CONCLUSÕES

- Dentre os 42 SNPs do DNAMt utilizados por Paneto (2010), a seleção dos 30 SNPs utilizados neste projeto foi suficiente para a efetiva classificação em haplogrupos da população brasileira, permitindo classificar as amostras que não puderam ser convenientemente classificadas, em trabalho anterior, por sequenciamento da região controle do DNAMt;
- De um total de 100 amostras estudadas, foram encontrados 19 haplogrupos diferentes que possibilitaram classificar a população do estado do Espírito Santo em 43% africanas, 30% europeus, 26% nativo-americanos e 1% asiáticas;
- Os dados obtidos estão de acordo com os encontrados na literatura com populações da região sudeste, diferindo de outras regiões do país; entretanto, todos os haplogrupos são encontrados em todo o território brasileiro, embora em diferentes proporções, influenciado por características peculiares da colonização de cada região, comprovando, uma vez mais, a grande miscigenação (subestruturação) da população brasileira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 444-461, 2000.
- ANDERSON, S. 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. **Nature Genetics**, v. 23, p. 147, 1999.
- ANJOS, M. J. et al. Individual genetic identification of biological samples: a case of an aircraft accident. **Forensic Science International**, v. 146S, p. S115-S117, 2004.
- BARBOSA, A. B. et al. Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas state, north-eastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 53, p. 142-146, 2008.
- BEHAR, D. M. et al. The dawn of human matrilineal diversity. **American Journal of Human Genetics**, v. 82, p. 1130-1140, 2008.
- BUDOWLE, B. et al. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 4, p. 119-141, 2003.
- BUTLER, J. M. Mitochondrial DNA analysis. In: _____. **Advanced topics in forensic DNA typing: methodology**. 3rd ed. London: Elsevier Academic Press., 2011. p. 405-456.
- COBLE, M. D. et al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. **International Journal Legal Medicine**, v. 118, p. 137-146, 2004.
- FINNILA, S.; LEHTONEB, M. S.; MAJAMAA, K. Phylogenetic network for European mtDNA. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 1475-1484, 2001.
- FRIDMAN, C. et al. SNPs in mitochondrial DNA coding region used to discriminate common sequences in HV1-HV2-HV3 region. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, p. e75-e76, 2011.
- HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA Sequence analysis - validation and use for forensic casework. **Forensic Science Review.**, v. 11, n. 1, p. 22-50, 1999.
- HOONG, L. L.; LEK, K. C. Genetic polymorphism in mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III of the Malaysian population. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 79- 85, 2005.
- JUST, R. S. et al. Titanic`s unknown child: the critical role of the mitochondrial DNA coding region in a re-identification effort. **Forensic Science International Genetics**, v. 5, p. 231-235, 2011.

- KASHYAP, V. K. et al. DNA profiling technologies in forensic analysis. **International Journal of Human Genetics**, v. 4, n. 1, p. 11-30, 2004.
- KIVISILD, T. et al. The world mtDNA phylogeny. BANDELT, H.-J. et al. (Ed.). **Human mitochondrial DNA and the evolution of *Homo sapiens***. Berlin: Springer, 2006. p. 149-179
- KOHNEMANN, S.; HOHOFF, C.; PFEIFER, H. An economical mtDNA SNP assay detecting different mitochondrial haplogroups in identical HVR 1 samples of Caucasian ancestry. **Mitochondrion**, v. 9, p. 370-375, 2009.
- KONG, Q. P. et al. Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. **American Journal of Human Genetics**, v. 73, p. 671-676, 2003.
- LEE, H. C.; LADD, C. Preservation and collection of biological evidence. **Croatian Medical Journal**, v. 42, n. 3, p. 225-228, 2001.
- LEE, H. R.; JOHNSON, K. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 36236-36240, 2006.
- LUTZ, S. 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 Science International**, v. 113, p. 97-101, 2000.
- MACAULAY, V. et al. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. **American Journal of Human Genetics**, v. 64, p. 232-249, 1999.
- MACAULAY, V. et al. Single rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. **Science**, v.100, p. 171-176, 2003.
- MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standar, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2471-2472, 2004.
- MATTHEW, G. N. et al. Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer set" amplification strategy. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 2, p. 247- 253, 2001.
- MISHMAR, D. et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, p. 171-176, 2003.
- NELSON, T. M. et al. Development of a multiplex single base extension assay for mitochondrial DNA haplogroup typing. **Forensic Science**, v. 48, p. 460-472, 2007.
- PALENCIA, L. et al. Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of European input. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, p. 331-336, 2010.
- PANETO, G. G. **Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

PANETO, G. G. **Análise de polimorfismos do DNA mitocondrial em indivíduos residentes na grande São Paulo para aplicação na identificação humana**. 2010. 118 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

PANETO, G. G. et al. A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. **Mitochondrion**, v. 11, p. 296-302, 2011.

PARSON, T. J.; COBLE, M. D. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. **Forensic Sciences**, v. 42, n. 3, p. 304-309, 2001.

PARSON, W.; BALDELT, H. J. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic sciences. **Forensic Science International: Genetics**, v. 1, p. 13-19, 2007.

PARSON, W.; DÜR, A. EMPOP-a forensic mtDNA database. **Forensic Science International Genetics**, v. 1, p. 88-92, 2007.

PHILIPS, C. et al. Characterization of U.S. population samples using a 34plex ancestry informative SNP multiplex. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, p. e182-e183, 2011.

RICHARDS, M. et al. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 1251-1276, 2000.

SALAS, A.; LAREU, M. V.; CARRACEDO, A. A heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. **International Journal of Legal Medicine**, v. 114, p. 186-190, 2001.

SANCHES, N. M. **Análise de polimorfismos da região controle do DNA mitocondrial em indivíduos residentes do estado do Espírito Santo para utilização na identificação humana**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

SANCHEZ, J. J.; BORSTING, C.; MORLING, N. Typing of chromosome SNPs with multiplex PCR methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 297, p. 209-228, 2005.

SCHLEBUSCH, C. M.; NAIDOO, T.; SOODYALL, H. SNaPshot minisequencing to resolve mitochondrial macro-haplogroups found in Africa. **Electrophoresis**, v. 30, p. 3657-3664, 2009.

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.

TORRONI, A. et al. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. **American Journal of Human Genetics**, v. 53, p. 563-590, 1993.

TORRONI, A. 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. **American Journal of Human Genetics**, v. 55, p. 760-776, 1994.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Human Mutation.**, v. 118, p. 14-18, 2004.

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

ZHANG, Y. J.; XU, Q. S.; ZHENG, Z. J.; LIN, H. Y.; LEE, J. B. Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region I, II and III in northeast China Han. **Forensic Science International**, v. 149, p. 267-269, 2005.

APÊNDICE A:

Tabela 3: Resultados da análise dos 30 SNPs por SNaPshot e classificação em haplogrupos das 100 amostras

Amostras	HG	G709A	G769A	G1719A	A1736G	A1811G	T2416C	G3010A	G4580A	C4883T	T5442C	T6392C	C7028T	A7055G	C7256T
ES001	T2	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES002	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES003	K	G	G	G	A	G	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES004	D	G	G	G	A	A	T	A	G	T	T	T	T	A	T
ES005	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES006	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES007	D	G	G	G	A	A	T	A	G	T	T	T	T	A	T
ES008	C	G	G	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	C
ES009	C	G	G	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	C
ES010	C	G	G	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	C
ES011	HV	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES012	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES013	D	G	G	G	A	A	T	A	G	T	T	T	T	A	T
ES014	HV	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES015	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES016	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES017	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES018	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES019	M*	G	G	G	A	A	T	G	A	C	T	T	T	A	C
ES020	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T

Amostras	A8251G	8281DEL9PB	T8404C	G8697A	C10400T	T10873C	A11251G	G12372A	C12705T	A13263G	T14470C	C14766T	T14798C	C15904T	T16362C	T16519C
ES001	G	C	T	A	C	T	G	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES002	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES003	G	C	T	G	C	T	A	A	C	A	T	T	C	C	T	C
ES004	G	C	T	G	T	C	A	G	T	A	T	T	T	C	C	C
ES005	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES006	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES007	G	C	T	G	T	C	A	G	T	A	T	T	T	C	C	C
ES008	G	C	T	G	T	C	A	G	T	G	T	T	T	C	T	C
ES009	G	C	T	G	T	C	A	G	T	G	T	T	T	C	T	C
ES010	G	C	T	G	T	C	A	G	T	G	T	T	T	C	T	C
ES011	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES012	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES013	G	C	T	G	T	C	A	G	T	A	T	T	T	C	C	C
ES014	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES015	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES016	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES017	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES018	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES019	G	C	T	G	T	C	A	A	T	A	T	T	T	C	T	C
ES020	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T

Amostras	HG	G709A	G769A	G1719A	A1736G	A1811G	T2416C	G3010A	G4580A	C4883T	T5442C	T6392C	C7028T	A7055G	C7256T
ES021	C	G	G	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	C
ES022	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES023	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES024	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES025	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES026	H	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	C	A	C
ES027	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES028	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES029	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES030	T2	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES031	U*	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES032	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES033	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES034	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES035	HV	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES036	H1*	G	G	G	A	A	T	A	G	C	T	T	C	A	C
ES037	H1*	G	G	G	A	A	T	A	G	C	T	T	C	A	C
ES038	U*	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES039	H	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	C	A	C
ES040	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C

Amostras	A8251G	8281DEL9PB	T8404C	G8697A	C10400T	T10873C	A11251G	G12372A	C12705T	A13263G	T14470C	C14766T	T14798C	C15904T	T16362C	T16519C
ES021	G	C	T	G	T	C	A	G	T	G	T	T	T	C	T	C
ES022	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES023	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES024	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES025	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES026	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES027	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES028	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES029	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES030	G	C	T	A	C	T	G	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES031	G	C	T	G	C	T	A	A	C	A	T	T	T	C	T	T
ES032	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES033	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES034	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES035	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES036	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	C
ES037	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	C
ES038	G	C	T	G	C	T	A	A	C	A	T	T	T	C	T	T
ES039	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES040	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T

Amostras	HG	G709A	G769A	G1719A	A1736G	A1811G	T2416C	G3010A	G4580A	C4883T	T5442C	T6392C	C7028T	A7055G	C7256T
ES041	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES042	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES043	HV	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES044	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES045	HV	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES046	K	G	G	G	A	G	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES047	H1*	G	G	G	A	A	T	A	G	C	T	T	C	A	C
ES048	B	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES049	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES050	H	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	C	A	C
ES051	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES052	HV	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES053	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES054	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES055	C	G	G	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	C
ES056	T*	A	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES057	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES058	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES059	L0	G	A	G	A	A	T	G	G	C	C	T	T	A	T
ES060	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T

Amostras	A8251G	8281DEL9PB	T8404C	G8697A	C10400T	T10873C	A11251G	G12372A	C12705T	A13263G	T14470C	C14766T	T14798C	C15904T	T16362C	T16519C
ES041	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES042	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES043	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES044	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES045	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES046	G	C	T	G	C	T	A	A	C	A	T	T	C	C	T	C
ES047	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	C
ES048	G	G	T	G	C	T	A	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES049	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES050	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES051	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES052	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES053	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES054	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES055	G	C	T	G	T	C	A	G	T	G	T	T	T	C	T	C
ES056	G	C	T	A	C	T	G	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES057	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES058	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES059	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES060	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C

Amostras	HG	G709A	G769A	G1719A	A1736G	A1811G	T2416C	G3010A	G4580A	C4883T	T5442C	T6392C	C7028T	A7055G	C7256T
ES061	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES062	D	G	G	G	A	A	T	A	G	T	T	T	T	A	T
ES063	X*	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES064	J1c	G	G	G	A	A	T	A	G	C	T	T	T	A	C
ES065	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES066	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES067	T*	A	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES068	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES069	L0	G	A	G	A	A	T	G	G	C	C	T	T	A	T
ES070	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES071	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES072	H1*	G	G	G	A	A	T	A	G	C	T	T	C	A	C
ES073	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES074	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES075	T2	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES076	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES077	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES078	L2	G	A	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	T
ES079	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T
ES080	B	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C

Amostras	A8251G	8281DEL9PB	T8404C	G8697A	C10400T	T10873C	A11251G	G12372A	C12705T	A13263G	T14470C	C14766T	T14798C	C15904T	T16362C	T16519C
ES061	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES062	G	C	T	G	T	C	A	G	T	A	T	T	T	C	C	C
ES063	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	C	T	T	C	T	C
ES064	G	C	T	G	C	T	G	G	C	A	T	T	C	C	T	C
ES065	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES066	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES067	G	C	T	A	C	T	G	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES068	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES069	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES070	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES071	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES072	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	C
ES073	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES074	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES075	G	C	T	A	C	T	G	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES076	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES077	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES078	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES079	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES080	G	G	T	G	C	T	A	G	C	A	T	T	T	C	T	C

Amostras	HG	G709A	G769A	G1719A	A1736G	A1811G	T2416C	G3010A	G4580A	C4883T	T5442C	T6392C	C7028T	A7055G	C7256T
ES081	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES082	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES083	L3	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES084	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES085	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES086	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES087	B	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES088	H	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	C	A	C
ES089	H6	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	C	A	C
ES090	L0	G	A	G	A	A	T	G	G	C	C	T	T	A	T
ES091	C	G	G	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	C
ES092	C	G	G	G	A	A	C	G	G	C	T	T	T	A	C
ES093	H6	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	C	A	C
ES094	U*	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES095	B	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES096	HV	G	G	G	A	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES097	A	G	G	G	G	A	T	G	G	C	T	T	T	A	C
ES098	H1*	G	G	G	A	A	T	A	G	C	T	T	C	A	C
ES099	L0	G	A	G	A	A	T	G	G	C	C	T	T	A	T
ES100	L1	G	A	A	A	A	T	G	G	C	T	T	T	G	T

Amostras	A8251G	8281DEL9PB	T8404C	G8697A	C10400T	T10873C	A11251G	G12372A	C12705T	A13263G	T14470C	C14766T	T14798C	C15904T	T16362C	T16519C
ES081	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES082	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES083	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C
ES084	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES085	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES086	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES087	G	G	T	G	C	T	A	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES088	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES089	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	C	T
ES090	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES091	G	C	T	G	T	C	A	G	T	G	T	T	T	C	T	C
ES092	G	C	T	G	T	C	A	G	T	G	T	T	T	C	T	C
ES093	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	C	T
ES094	G	C	T	G	C	T	A	A	C	A	T	T	T	C	T	T
ES095	G	G	T	G	C	T	A	G	C	A	T	T	T	C	T	C
ES096	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	T
ES097	G	C	T	G	C	T	A	G	T	A	T	T	T	C	C	T
ES098	G	C	T	G	C	T	A	G	C	A	T	C	T	C	T	C
ES099	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	T
ES100	G	C	T	G	C	C	A	G	T	A	T	T	T	C	T	C

Tabela 4 - Informações sobre os *primers* utilizados na reação de PCR em *multiplex*.

Posição dos SNPS	Primer	Sequencia do Primer (5´-3´)	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração Final (µM)
G709A e G769A	mtG709A-FWD mtG709A-REV	AAGATTACACATGCAAGCATCC CTAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG	112	0,178
G1719A; A1811G e A1736G	mtG1719 + 1811A-FWD mtG1719 + 1811- REV	CTTGACGCTCTCGAGCTAAA GCAGAAGGTATAGGGGTTAGTCC	196	0,178
T2416C	mtT2416C-FWD mtT2416C-REV	CAGCCCAATATCTACAATCAACC GTAAGATTTGCCGAGTTCCT	114	0,178
G3010A	mtG3010A-FWD mtG3010A-REV	ACCTCGATGTTGGATCAGGACA CGAACCTTTAATAGCGGCTGCAC CAT	55	0,027
G4580A	mtG4580A-FWD mtG4580A-REV	CGCTAAGCTCGCACTGATTT TTTTGGTTAGAAGTGAATAAAA GC	130	0,125
C4883T	mtC4883T-FWD mtC4883T-REV	CCTTTCACCTCTGAGTCCCA GCTTACGCTYTAGTGAGGGAG	128	0,036
T5442C	mtT5442C-FWD mtT5442C-REV	AATCTACTCCACCTCAATCAC GTAGGAGTAGCGTGGTRAGG	125	0,178
T6392C	mtT6392C-FWD mtT6392C-REV	TGGAGCCTCCGTAGACCTAA TGGCAGGGGGTTTTATATTG	110	0,045
C7028T e A7055G	mtC7028-FWD mtC7028T-REV	AGCAAACCTCATCACTAGACATCG GATGGCAAATACAGCTCCTATTG A	94	0,071
C7256T	mtC7256T-FWD mtC7256T-REV	TCTTCCCACAACACTTTCTC GAGAAATGAATGAAGCCTACAG	109	0,089
A8251G e 8281del9pb	mtG8251A-FWD mtDEL8281-9REV	CATGCCCATCGTCCTAGAAT TGCTAAGTTAGCTTTACAGTGG	113	0,089
T8404C	mtT8404C-FWD mtT8404C-REV	CAGTCAAATGCCCAACTAAA TTTGGTGAGGGAGGTAGGTG	126	0,107
G8697A	mtG8697A-FWD mtG8697A-REV	CCAACAATGACTAATCAAACCTAA CC GTATAAGAGATCAGGTTCGTCCT TT	80	0,036
C10400T	mtC10400T-FWD mtC10400T-REV	GCCCTAAGTCTGGCCTATGA TGAGTCGAAATCATTGTTTTG	90	0,178
T10873C	mtT10873C-FWD mtT10873C-REV	AATCAACACAACCACCCACA GGGGAACAGCTAAATAGGTTG	90	0,178
A11251G	mtA11251G-FWD mtA112511G-REV	CGCAGGCACATACTTCTATTC AGTGAGCCTAGGGTGTGTGAG	90	0,032
G12372A	mtG12372A-FWD mtG12372A-REV	AAAATTTTGGTGCAACTCCA AACGAGGGTGGTAAGGATGG	107	0,089
C12705T	mtC12705T-FWD mtC12705T-REV	CCCAAACATTAATCAGTTCTTCAA GAACAGTTGGAATAGGTTGTTAG C	91	0,107
A13263G	mtA13263G-FWD mtA13263G-REV	CCCACTAATCCAACTCTAACAC GCCGATTGTAACCTATTATGAGTC C	145	0,045

T14470A	mtT14470A-FWD mtT14470A-REV	CCCCATGCCTCAGGATACTC TTTAGGGGGAATGATGGTTG	126	0,268
C14766T e T14798C	mtC14766T-FWD mtC14798C-REV	CAACTACAAGAACACCAATG ATCATGCGGAGATGTTGGAT	82	0,125
C15904T	mtC15904T-FWD mtC15904T-REV	TACTCAAATGGGCCTGCCT TGATTTGCCTTGAAAAAGGT	86	0,089
T16362C	mtT16362C-FWD mtT16362C-REV	TAGCACATTACAGTCAAATCCC GGATATTGATTTACGGAGGA	151	0,071
T16519C	mtT16519C-FWD mtT16519C-REV	CCATAA CACTGGGGGTAGC TTATTTAAGGGGAACGTGTGG	99	0,089

Tabela 5 - Informações sobre os primers utilizados na reação de SNaPshot em multiplex

Nome do primer	SNP	Sequência do primer	Orientação	Concentração Final (μ M)
R-G709A-SNP	G709A	TTTAGAGGGTGAACCTCACTGGAA	R	0,023
SP2-R-G769A	G769A	CGTCGTGAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAAAGCGTTTTGAGCTGCATTG	R	0,06
G1719A-SNP	G1719A	AACTGACTAAACTAGGTGCCAGTCTGAAAAGTCTGACAAAACGTCGTGAAAAGTCTGACAAACCCCTTACTACCAGACAAACCTTA	F	0,08
SP-R-A1736G	A1736G	CAATTCAAATTTCTATCGCCTTATACTTTAT	R	0,05
A1811G-SNP	A1811G	AACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAGCAAGGGAAAAGATGAAAAATTATA	F	0,1
SP4-T2416C	T2416C	TGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACAACCAACAAGTCATTATTACCC	F	0,1
R-G3010A-SNP	G3010A	CGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACCTCGATTTGGATCAGGACATCC	F	0,024
G4580A-SNP	G4580A	ACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAATTTACCTGAGTAGGGCTAGAAAATAAACAT	F	0,025
SP2-C4883T	C4883T	GTGAAAAGTCTGACAACATGACAAAAAAGTAGCCCC	F	0,03
SP2-T5442C	T5442G	TAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACAACCAACAACCCACCCCA	F	0,034
T6392C-SNP	T6392C	GTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACCTCTATCTTAGGGGCCATCAA	F	0,1
C7028T-SNP	C7028T	ACTACAGCACGCTACTACGTTGTAGC	F	0,025
SP2-R-A7055G	A7055G	CTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACCTATGATGGCAAAATACAGC	R	0,02
SP2-C7256T	C7256T	CAAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACGATGACAAACGATGCATACACCACATGAAA	F	0,06
SP-A8251G	A8251G	CCACGTCGTGAAAAGTCTGACAATTTCCCTTAAAAATCTTTGAAAATAGG	F	0,05
SP2-del8281-9	8281del9pb	GTCGTGAAAAGTCTGACAACCCCTATARCACCCCTCTA	F	0,07
T8404C -SNP	T8404C	ACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACCTACCGTATGGCCACCATAAAT	F	0,03
R-G8697A-SNP	G8697A	GTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACGTCCTTTAGTGTGTGATGGTTAT	R	0,028
C10400T-SNP	C10400T	ACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAATGACTACAAAAAGGATTAGACTGARC	F	0,075
T10873C-SNP	T10873C	GACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACAGCCTAATTTATTAGCATCATCCC	F	0,07
A11251G-SNP	A11251G	AACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACCTCCCTACTCATCGCACT	F	0,007
G12372A-SNP	G12372A	CGTCGTGAAAAGTCTGACAAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTACTATAACCACCCTAACCCCT	F	0,1
R-C12705T-SNP	C12705T	CAAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAGGTAACAAAGTATTAGTATGGTAAITAGGAA	R	0,05
SP-A13263G	A13263G	GTCGTGAAAAGTCTGACAACCCCTTCTCCACTTCAAGTCA	F	0,03
R-T14470A-SNP	T14470A	TCTGACAAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAAATTTATTAGGGGGAAATGATGGTTGTCTTTGG	R	0,15
C14766T-SNP	C14766T	GAAAAGTCTGACAAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAACCAATGACCCCAATACGCCAAAA	F	0,04

T14798C-SNP	T14798C	CGTGAAGTCTGACAAAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCCCTAATAAAAAATTAATTAACCACTCA	F	0,28
R-C15904T-SNP	C15904T	ACGTCCGTGAAAGTCTGACAACCGGTTTACAAGACTGGTGATTA	R	0,007
SP2-T16362C	T16362C	CCACGTCGTGAAAGTCTGACAAAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAATTCACAGTCAAATCCCTTCTCG	F	0,07
R-T16519C-SNP	T16519C	CGTGAAGTCTGACAATGTGGGCTATTTAGGCTTATG	R	0,03