



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GILCELENE DO SOCORRO MEDEIROS DE BRITO COSTA

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO DNA
MITOCONDRIAL HUMANO (HV1 E HV2) NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO
AMAPÁ: ASPECTOS POPULACIONAIS E FORENSES**

Recife
2019

GILCELENE DO SOCORRO MEDEIROS DE BRITO COSTA

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO DNA
MITOCONDRIAL HUMANO (HV1 E HV2) NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO
AMAPÁ: ASPECTOS POPULACIONAIS E FORENSES**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito parcial a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Coorientador: Prof. Dr. Pablo Abdon da Costa Francez

Recife

2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Costa, Gilcelene do Socorro Medeiros de Brito
Análise dos polimorfismos das regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial humano (HV1 e HV2) na população do Estado do Amapá : aspectos populacionais e forenses / Gilcelene do Socorro Medeiros de Brito Costa. - 2019.

71 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino.

Coorientador: Prof. Dr. Pablo Abdon da Costa Francez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Genética. 2. Genética forense. 3. Polimorfismo (Genética) I. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador). II. Francez, Pablo Abdon da Costa (coorientador) III. Título.

576

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-136

GILCELENE DO SOCORRO MEDEIROS DE BRITO COSTA

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO DNA
MITOCONDRIAL HUMANO (HV1 E HV2) NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO
AMAPÁ: ASPECTOS POPULACIONAIS E FORENSES**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como requisito parcial a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia.

Aprovada em: 18 / 06 / 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucas (*in memoriam*) e Terezinha, por terem me possibilitado uma boa educação, incentivo e muito amor e aos meus irmãos que amo imensamente, em especial a minha irmã Simone Medeiros de Brito pelo exemplo de vida e orgulho para a nossa família. Também dedico este trabalho ao meu marido, amor da minha vida, Glaucio Silveira da Costa, pai dedicado, companheiro e amigo, meu porto seguro, e aos meus filhos, Léo Augusto Medeiros da Costa e Laís Victória Medeiros da Costa, pelo amor, inspiração, apoio e compreensão pelos inúmeros momentos de minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Polícia Científica do Amapá e, especialmente, ao Instituto de Genética Forense do Maranhão, pelo poio financeiro e logístico;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino, pela orientação, confiança e dedicação;

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Pablo Abdon da Costa Francez, pela amizade, atenção, ensinamentos e pelo estímulo durante a orientação;

Ao Prof. Dr. Rafael Resque, meu muito obrigado pela amizade, incentivos e apoio para resolução de questões burocráticas e por estar sempre disposto a ajudar e a esclarecer dúvidas;

Agradeço ao meu chefe e amigo, Perito Criminal Henderson N. Gomes Barboza, pelo incentivo, apoio e por sempre torcer pelo meu sucesso profissional e pessoal, muito obrigada!

Ao Perito Odontologista Jean Trindade pela amizade e por ceder as amostras do município de Oiapoque utilizadas nessa pesquisa.

A todos os perito Criminais do Instituto de Genética Forense do Maranhão: Américo, Geyson, Lafayette, Wallison, Marcelo, e a todos os funcionários e equipe técnica, em especial à Biomédica Cindy, que direta e indiretamente deram a sua contribuição para o desenvolvimento deste trabalho, auxiliando-me nos experimentos, ou mesmo através de amizade e apoio;

Aos amigos da Thermo Fisher, Wesley e Danilo, pela interminável paciência, pelos ensinamentos, pelo incentivo e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratorio de Genética Forense do Estado do Amapá, Ciro e Faro, pela amizade, apoio e ao T.I Márcio pela ajuda e dedicação;

À minha querida amiga e irmã do coração, Perita Criminal Christhiane Pinto Cutrim, companheira de mestrado que dividiu comigo todas as angústias e alegrias para realização deste trabalho. Aprendi muito ao seu lado; sua amizade foi um verdadeiro presente. Te amo muito minha amiga querida!

Agradeço à Sofia e Rafael Pinto Cutrim pela acolhida, amizade e todo carinho com que sempre me receberam no período que estive no Estado do Maranhão;

Aos amigos Leila, Lúcia, Andrea, Izabelle, Antônio pela amizade, apoio e compreensão neste período de minha vida acadêmica;

Agradeço a minha amada mãe Terezinha Medeiros de Brito e os meus irmãos Gene, Léia, Mary, Lily, Simone e toda a minha família que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, amo cada um de vocês!

Gostaria de fazer um agradecimento especial a Marcelo Pereira, Maiane Galdino e Emília Pereira por terem cuidado com tanta dedicação e amor dos meus filhos. Meu eterno agradecimento.

Aos meus queridos sogros Leomary e Célia Maria por sempre poder contar com o apoio de vocês em todos os momentos bons ou ruins, e por muitas vezes me substituírem no papel de mãe com muita eficiência, obrigada, amo vocês!

Aos amores da minha vida, meu marido Gláucio Costa e meus filhos Léo e Laís por serem minha inspiração, por cuidarem de mim e cuidarem um do outro e pela compreensão nos momentos em família que precisei estar ausente, amo vocês;

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e realização deste trabalho;

Agradeço a Deus por mais essa oportunidade e por me manter firme nessa caminhada.

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

Albert Einstein

RESUMO

A maior parte do genoma humano está localizado dentro do núcleo celular. No entanto, há uma parcela do genoma encontrado dentro das mitocôndrias. As mitocôndrias são organelas, presentes em elevado número no citoplasma, em todos os organismos que utilizam oxigênio como fonte de energia. Os estudos genéticos atuais usam os polimorfismos de DNA (regiões do genoma humano onde há diferenças entre indivíduos normais), de acordo com sua natureza molecular e sua localização no genoma por serem mais confiáveis cientificamente. Este trabalho analisou os polimorfismos presentes nas regiões hipervariáveis HV1 e HV2 (posições 16024 a 16365 e 73 a 340 respectivamente) do DNA mitocondrial (mtDNA) humano em 55 pessoas não relacionadas nascidos ou residentes na cidade de Macapá e 26 pessoas não relacionadas nascidos ou residentes na cidade de Oiapoque estado do Amapá, para utilização na identificação humana e aplicações em investigações populacionais e forenses. Neste estudo determinou-se os haplótipos dessas duas regiões do mtDNA, com a finalidade de caracterizar geneticamente a variabilidade matrilinear dessas populações. Os resultados obtidos confirmam que a linhagem materna do estado do Amapá tem porcentagens de origens predominantemente ameríndia (62%), seguida de africana (20%), europeia (15%) e asiática (3%). A proporção de ancestralidade ameríndia, europeia e africana estimadas através do mtDNA para as populações miscigenadas das duas cidades estudadas foram consideravelmente distintas. Dada as peculiaridades da formação das cidades do presente estudo, é mais provável que os resultados obtidos para a cidade de Macapá reflitam melhor o observado para o estado do Amapá, do que quando se analisa as amostras das duas localidades em conjunto, em função de uma elevada concentração de ancestralidade ameríndia nas amostras provenientes de Oiapoque. O principal haplogrupo ameríndio observado na população estudada foi o haplogrupo C, encontrado 23,46% das amostras do estado do Amapá, sendo evidenciado em 16,36% da população de Macapá e 38,46% da população do Oiapoque. Os diferentes haplótipos obtidos (47) das 81 amostras analisadas, foram classificados em haplogrupos de acordo com árvore filogenética de mtDNA, através do software EMMA (*Estimating Mitochondrial Haplogroups Using a Maximum Likelihood Approach*).

Palavras-chave: DNA mitocondrial. Polimorfismo. Genética forense.

ABSTRACT

Most of the human genome is located within the cell nucleus. However, there is a portion of the genome found within the mitochondria. Mitochondria are organelles, which are high in number without cytoplasm, in all organisms that use energy sources. Investigations into the genome genome of polyporphous DNA (regions where the human genome exists), according to their molecular nature and location, are no longer genomes because they are more scientifically. This work analyzed the polymorphisms present in the hypervariable regions HV1 and HV2 (positions 16024 to 16365 and 73 to 340, respectively) of human mitochondrial DNA (mtDNA) in 55 unrelated persons born or resident in the city of Macapá and 26 unrelated persons born or resident in the city of Oiapoque, state of Amapá, for use in the identification of persons and applications in population and forensic investigations. This study determined the variables on two regions of the mtDNA, with the purpose of characterizing genetically a matrix variety of these populations. The results show that the maternity of the state of Amapá has origins of predominantly Amerindian origin (62%), followed by African (20%), European (15%) and Asian (3%). The American, African and African ancestry is estimated through the mtDNA for the miscegenated diseases of the two cities studied were considerably different. Given the peculiarities of the formation of the cities of the present study, it is more likely that the results obtained for the city of Macapá reflect better the observed for the state of Amapá than when analyzing the samples of the two localities together, due to a high concentration of Amerindian ancestry in samples from Oiapoque. The main Amerindian haplogroup observed in the study population was haplogroup C, found 23.46% of the samples from the state of Amapá, being evidenced in 16.36% of the population of Macapá and 38.46% of the population of Oiapoque. The different haplotypes obtained (47) from the 81 analyzed samples were classified into haplogroups according to the phylogenetic tree of mtDNA, through the EMMA software (Estimating Mitochondrial Haplogroups Using a Maximum Likelihood Approach).

Keywords: mitochondrial DNA. Polymorphism. Forensic genetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de uma célula eucariótica animal, mitocôndria e mtDNA.....	20
Figura 2 – Representação esquemática do genoma mitocondrial humano...	22
Figura 3 – Modelo esquemático de uma reação de sequenciamento automatizado.....	24
Figura 4 – Heredograma representando a transmissão materna de mtDNA...	25
Figura 5 – Heteroplasma de sequência.....	29
Figura 6 – Heteroplasma de comprimento.....	30
Figura 7 – Como heteroplasma de comprimento influenciam na qualidade das sequências.....	31
Figura 8 – Mapa das rotas de migração humana.....	33
Figura 9 – Árvore Filogenética Simplificada do mtDNA.....	34
Figura 10 – Filogenia simplificada dos haplogrupos de mtDNA.....	34
Figura 11 – Exemplo de mutação por substituição e nomenclatura.....	39
Figura 12 – Exemplo de inserção deleção e sua nomenclatura.....	40
Figura 13 – Exemplo de deleção e sua nomenclatura.....	40
Figura 14 – Localização do estado do Amapá, destaque para os municípios de Macapá e Oiapoque.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primes utilizados para amplificação.....	43
Tabela 2 – Haplogrupos e respectivas frequencias na população do estado do Amapá, Brasil.....	47
Tabela 3 – Comparativo entre os percentuais de ancestralidade materna dos grupos étnicos parentais para as cidades de Macapá e Oiapoque.	48
Tabela 4 – Proporção de ancestralidade ameríndia, europeia e africana em populações das regiões brasileiras comparativo com a população do estado do Amapá, estimadas através de estudos com mtDNA.	49
Tabela 5 – Diversidade haplotípica das regioes HV1 e HV2 do mtDNA em uma amostra populacional do estado do Amapá.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
CAAE	Comitê
CRS	<i>Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge)
D-loop	<i>Displacement Loop</i> (Laço de deslocamento)
DEL	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Guanina
H	<i>Heavy</i> (pesado)
HV1	Região Hipervariável 1
HV2	Região Hipervariável 2
HV3	Região Hipervariável 3
L	<i>Light</i> (leve)
mL	Mililitro
µL	Micro litro
mtDNA	DNA mitocondrial
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
rCRS	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge revisada)
T	Timina
Y	Y chromosome (cromossomo Y)
STR	Short tandem repeat (repetições curtas em tandem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 HISTÓRICO.....	16
2.2 MIGRAÇÃO E EVOLUÇÃO	16
2.2.1 A Colonização e formação da população do estado do Amapá	17
2.3 MITOCÔNDRIA	19
2.3.1 DNA Mitocondrial Humano	21
2.3.2 Sequenciamento do genoma mitocondrial	23
2.3.3 Padrão de herança e número de cópias do DNA mitocondrial	24
2.3.4 Taxa de mutação do DNA mitocondrial	26
2.3.5 Heteroplasmia do Genoma Mitocondrial	26
2.3.6 Filogenia do DNA mitocondrial	31
2.3.7 Estudos do DNA mitocondrial na evolução humana	34
2.3.8 DNA Mitocondrial e as ciências forenses	35
2.3.9 Nomenclatura dos polimorfismos de mtDNA	38
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	41
3.1 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	41
3.2 COMITÊ DE ÉTICA.....	42
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA	42
3.4 REAÇÃO DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE): AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO D-LOOP (HV1 E HV2)	42
3.5 SEQUENCIAMENTO: PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE SEQUENCIAMENTO	43
3.6 GENOTIPAGEM: ELETROFORESE CAPILAR.....	44
3.7 ANÁLISE DOS DADOS.....	44
4. RESULTADOS	46
5. DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A	65

1 INTRODUÇÃO

Os polimorfismos das regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial humano vêm sendo utilizados em numerosos estudos da genética populacional histórica, médica e forense (JOBILING et al., 2004). No nível populacional, conhecer a ancestralidade tem interesse histórico e demográfico por permitir que seja traçado um perfil sobre migrações e povoamento, assim como inferir a provável origem de determinados povos (TAYO et al., 2011). A origem de nossa espécie passou a ser mais bem compreendida com a análise do DNA mitocondrial (mtDNA), localizado no continente africano, há cerca de 200.000 anos, com o surgimento do *Homo sapiens* (VIGILANT et al., 1991).

Com o propósito de determinar o polimorfismo das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do DNA mitocondrial humano e avaliar, com base na determinação dos haplogrupos de mtDNA presentes em uma amostra populacional de 81 indivíduos de dois municípios do estado do Amapá (Macapá, 55 indivíduos; e Oiapoque 26 indivíduos), qual foi a contribuição matrilinear dos principais grupos étnicos parentais para formação da atual população em estudo.

Este trabalho observou uma importante contribuição do grupo étnico Ameríndio na formação matrilinear da população do estado do Amapá, assim como foi previamente evidenciado em outras populações da região amazônica. Este estudo também apontou a importância do DNA mitocondrial no contexto forense como ferramenta para analisar amostras degradadas, e quando o sistema convencional que utiliza marcadores autossômicos não fornece as informações satisfatórias para obtenção de resultados conclusivos para as análises forenses, podemos utilizar os marcadores uniparentais. E a necessidade da introdução de novos marcadores genéticos fornecendo estimativas de frequências mais confiáveis a serem aplicadas em investigações forenses, sendo mais representativa para população estudada e a criação de banco de dados regionais de mtDNA. Uma das dificuldades em relação à utilização de banco de dados, é que a maioria dos laboratórios forenses não dispõe de dados regionalizados. Em regra, são utilizados bancos de dados de populações vizinhas ou de até outros países (BUDOWLE et al., 2003; SALAS et al., 2007). Este estudo contribuiu também na implementação e padronização de análises de DNA mitocondrial para futura rotina de casos forenses no Estado do Amapá.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Em função da ausência de estudos relativos à frequência de haplótipos de DNA mitocondrial (mtDNA) para população miscigenada do Estado do Amapá, este trabalho avaliou os polimorfismos das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA humano, regiões usualmente utilizadas para análises forenses, para responder qual a variabilidade genética matrilinear dessas populações, assim como compreender os processos de formação, migração, ancestralidade e constituição genética contemporânea da população das cidades de Macapá e Oiapoque.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a população de dois municípios do Estado do Amapá quanto aos polimorfismos das regiões HV1 e HV2 do DNA mitocondrial, visando determinar os padrões de ancestralidade materna da população.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e estimar a frequência dos haplogrupos do DNA mitocondrial pertencentes à população estudada;
- Avaliar e caracterizar geneticamente a variabilidade matrilinear dessas populações;
- Avaliar a mistura interétnica e estimar a contribuição dos grupos filogeográficos ameríndio, europeu e africano para a formação da população amapaense;
- Comparar as frequências haplotípicas mitocondriais obtidas para as populações investigadas com àquelas descritas para outras populações das cinco regiões brasileiras e com amostras modernas das três populações parentais, com o intuito de estimar a distância genética.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRICO

2.2 MIGRAÇÃO E EVOLUÇÃO

A população brasileira é reconhecidamente uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de cruzamentos étnicos entre indivíduos oriundos de três continentes: ameríndios autóctones; escravos africanos; e colonizadores europeus, representados mormente por portugueses. Quando os portugueses deram início ao processo de colonização no início do Século XVI, existiam cerca de 2.5 milhões de indígenas vivendo na área que hoje corresponde ao Brasil (SALZANO & FREIRE-MAIA 1970; BETHELL, 1997).

O processo de miscigenação resultante do contato entre estes três grupos filogeográficos resultou no estabelecimento de populações com vários tipos e graus variados de miscigenação (BEDOYA et al., 2006). A dinâmica de miscigenação ocorrida no Brasil é única no mundo e apresenta, portanto, grande complexidade. A contribuição dos três grupos parentais, em função das diferenças observadas no processo de gênese da população brasileira, apresenta variações regionais, entre estados diferentes de uma mesma região e até mesmo dentro de uma mesma cidade. Desta forma, considera-se que os primeiros brasileiros miscigenados surgiram da união entre homens europeus com mulheres indígenas (FRANCEZ, 2011).

Como a migração geralmente é constante entre as populações humanas, e tende a ocorrer inicialmente entre regiões vizinhas, as variações genéticas observadas se distribuem em um padrão contínuo e raramente têm descontinuidades geográficas marcantes (BEHAR et al., 2008). O povoamento das Américas é um exemplo clássico de migração em massa com enorme modificação na constituição populacional humana da população receptora (FRANCEZ, 2011). Além do que, tal migração promoveu também mudanças demográficas, havendo redução da população nativa em aproximadamente 90% daquela observada à época do início da colonização (BEDOYA et al., 2006).

Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos no Brasil que, utilizando polimorfismos de DNA, seja de cromossomos autossômicos, mtDNA ou do cromossomo Y, vêm buscando recuperar a história de formação do povo brasileiro

(SANTOS et al., 2006). Para HANDLEY (2007), a troca de material genético entre populações se dá inicialmente entre àquelas que se encontram a uma menor distância geográfica. Portanto, o fluxo gênico entre populações seria inversamente proporcional à distância geográfica entre elas.

Na busca por padrões surgem os inevitáveis questionamentos sobre a origem e a evolução da espécie humana. Só recentemente, graças ao advento da genética molecular, os cientistas passaram a ser capazes de responder a questões sobre evolução humana, tais como a definição de quais seriam os nossos parentes mais próximos e quais foram às circunstâncias que resultaram no surgimento dos humanos modernos (STONEKING, 2008).

2.2.1 A Colonização e formação da população do estado do Amapá

A margem esquerda do Rio Amazonas era, durante o período colonial, uma área praticamente deserta, sendo povoada pelas poucas tribos que ali habitavam. Eram os tucujus e tapuiaçus (ou tapujuçus), que pertenciam aos três grupos indígenas principais: aruaques; caraíbas; e tupis-guaranis. Os dois primeiros desceram da América Central e do Mar do Caribe e, pelos caminhos de terra, chegaram até essas regiões. Já os tupis-guaranis vieram do sul do continente americano (SARNEY et al., 1998).

No início da ocupação da Amazônia, a forte presença de índios do povo Tucuju na área compreendida entre o Rio Jari e a margem do Amazonas, fez com que os portugueses atribuíssem a denominação de Terra dos Tucujus ou Tucujulândia às terras que correspondem atualmente ao Amapá (SANTOS, 1994).

Os indígenas do Oiapoque, compostos na atualidade especialmente pelos povos Palikur-Arukwayene, Karipuna, Galibi-Marworno e Galibi Kali'na, junto com *créoles*, *antillesses*, cearenses, paraenses, maranhenses, ribeirinhos e caboclos de diversos lugares, constituem a complexa organização étnica desta região que não pode ser definida somente como “terra de índios”, de “não índios”, de caribenhos e de amazônicos, mas como um lugar de fronteira, lugar da diversidade e da alteridade, um lugar de encontros e desencontros realizados há séculos (ALMEIDA & RAUBER, 2017).

Em 1596, os ingleses, na pessoa do explorador Keymis, deram o nome de Oiapoque ao Rio de Vicente Pinzón. Nesse período, ingleses, irlandeses e holandeses

fizeram várias incursões registradas à foz do Rio Amazonas, o que supõe serem as terras amapaenses (SARNEY et al.,1998). A região de fronteira entre o Brasil e a Guiana Francesa, ao longo do Rio Oiapoque, foi palco de um longo litígio entre os países que se estendeu por mais de duzentos anos. Nessa região ocorreram migrações, algumas induzidas pelos estados nacionais e outras realizadas espontaneamente, entre diferentes populações - índios, *créoles* e caboclos (ROMANI, 2010)

Além das migrações históricas mais antigas, foram observados dois movimentos migratórios importantes no início do século XX: populações vindas do Norte, das ilhas do Caribe, em sua maioria da Martinica; e outras vindas do Sul, dos Estados do Pará e do Ceará. Estes grupos se encontraram no Oiapoque, na antiga Vila de Martinica, produzindo um complexo caldeirão cultural, na atualidade uma peculiar e sugestiva cultura que podemos denominar de caribenho-amazônica (ROMANI, 2010).

Com o intuito proteger as terras brasileiras na Amazônia e combater os invasores franceses e demais estrangeiros, as autoridades portuguesas, sob o comando do rei Felipe IV de Espanha e III de Portugal, Bento Maciel Parente, governador do Maranhão e Grão-Pará criaram em 1637 a Capitania do Cabo Norte, compreendendo as terras, pela primeira vez são delimitadas do Oiapoque ao Paru, que hoje são pertencentes ao estado do Amapá (MORAIS AND ROSÁRIO, 2009; SARNEY et al.,1998).

Os primeiros habitantes do Amapá foram os ameríndios, sendo que os primeiros registros de contatos com europeus foram registrados antes mesmo da chegada dos portugueses (MORAIS, 2005). Um importante registro da vinda de africanos para o Amapá ocorreu durante a construção da Fortaleza de São José de Macapá, em 1764 (SANTOS,1994). Foi o Marquês de Pombal quem, através de seu meio-irmão, o governador Mendonça Furtado, viabilizou a construção do Forte de Macapá e transformou a povoação nascente em vila, no ano de 1758. Ali fixou as famílias açorianas que formaram a primeira geração de amapaenses (SARNEY et al.,1998).

O território do Amapá se consolidou como um Estado brasileiro recentemente, quando da promulgação da Constituição Federal de 1988. O município de Oiapoque está inserido na Região Norte do Amapá e seus vínculos com o Brasil podem ser ponderados como recentes, se considerarmos a inconstância dos limites territoriais

do “contestado franco-brasileiro”, que se encerrou no início do século XX. Esta região, desde então, é marcada pela exploração de recursos naturais, sobretudo o garimpo de ouro, que contribuiu para fundamentar o crescimento socioeconômico da cidade de Oiapoque. O ouro é a peça razão do povoamento não indígena, na região de Oiapoque (ALMEIDA & RAUBER, 2017).

2.3 MITOCONDRIA

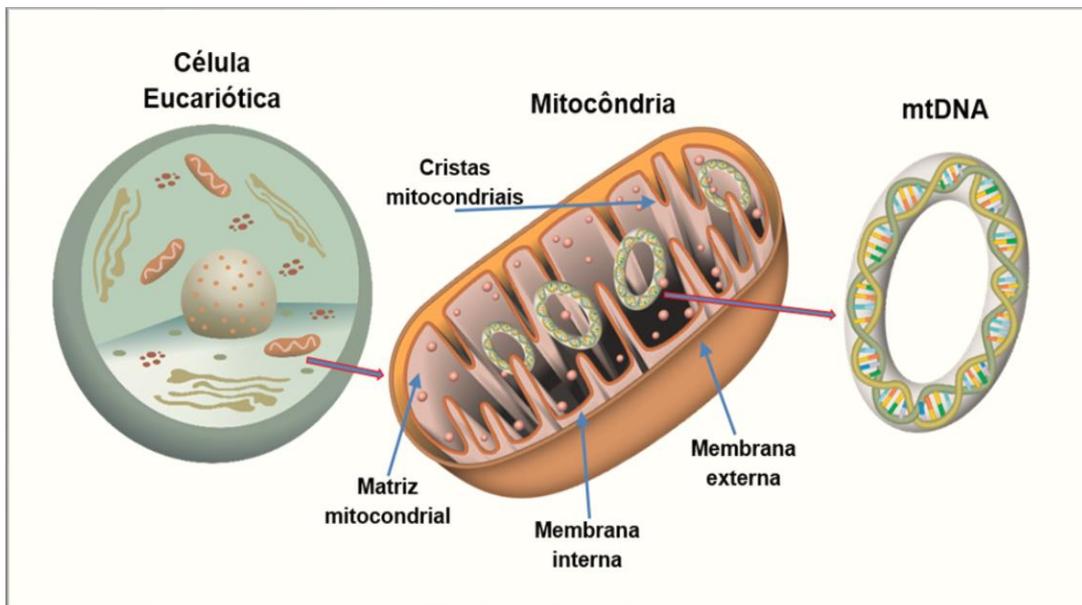
Há mais de um bilhão de anos, uma bactéria aeróbica colonizou uma célula eucariótica primitiva que não apresentava possibilidade metabólica para utilização de oxigênio e, a partir de então, estabeleceu-se uma relação simbiótica e permanente, havendo a substituição da glicólise anaeróbica pelo metabolismo aeróbico, uma forma muito mais eficiente de geração de energia pela célula (WALLACE et al., 1999; DIMAURO & SCHON, 2003; SOUZA, 2005). Vários trabalhos mostram que as mitocôndrias possivelmente surgiram nas células eucarióticas através de endossimbiose (simbiogênese), a partir do contato de uma célula hospedeira e células procarióticas. A endossimbiose é o processo que gera um novo organismo através de uma associação simbiótica estável (OLIVEIRA & MENCK, 2002).

As mitocôndrias são organelas que estão presentes no citoplasma de todas as células eucarióticas dos animais e plantas superiores e, também, em alguns microrganismos, tais como algas, fungos e protozoários (FINSTERER, 2004). Possuem forma cilíndrica rígida e alongada, com um diâmetro de 0,5 a 1µm e até 10µm de comprimento. Através de microfilmagens de células vivas, pode-se observar que são organelas móveis e plásticas que mudam de forma constantemente. A maneira como se movem no citosol demonstram que elas podem estar associadas a microtúbulos, os quais possivelmente determinam a orientação e distribuição que elas possuem nos diferentes tipos de células (NARDIN & JOHNS, 2001; ALBERTS et al., 2004). No organismo humano, o número de mitocôndrias varia entre as células; algumas contêm até 10.000 mitocôndrias, como as células do músculo estriado, e outras não contêm nenhuma, como os eritrócitos (hemácias). O número de mitocôndrias é proporcional à atividade metabólica de cada célula, havendo uma média de 500 a 2.000 mitocôndrias por célula.

Em 1946, a mitocôndria passou a ser reconhecida como a principal região celular responsável pelo metabolismo energético (SOUZA, 2005). Sua estrutura

básica só foi claramente identificada em 1950, através de microscopia eletrônica. Cada mitocôndria apresenta dupla membrana, separadas por um espaço intermembranar revestindo o espaço interno da matriz onde estão presentes o DNA mitocondrial, os ribossomos mitocondriais, os RNAs e várias enzimas. A membrana interna forma pregas chamadas de cristas (Figura 1), nas quais existem enzimas relacionadas ao processo respiratório. Neste compartimento existem enzimas que utilizam o ATP gerado na matriz para fosforilar nucleotídeos e proteínas relacionadas à morte celular por apoptose, ou morte celular programada (ALBERTS et al., 2004; SOUZA, 2005; KLUG et al., 2010).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de uma célula eucariótica animal, de uma mitocôndria, organela presente no citoplasma da célula e do DNA mitocondrial humano, que fica localizado na matriz interna da mitocôndria.



Fonte: Ilustração: 2019@AdautoBrito.

As reações químicas que ocorrem nas mitocôndrias geram grande quantidade de adenosina trifosfato (ATP), molécula que armazena energia em suas ligações, podendo liberá-la para a realização de processos que requerem energia (KLUG et al., 2010). Os complexos da cadeia respiratória mitocondrial são codificados pelo genoma nuclear e pelo genoma mitocondrial. É no núcleo que acontece a codificação da maioria das proteínas mitocondriais, e no citoplasma ocorre a tradução e o transporte para o interior da mitocôndria. E é também através de alguns genes nucleares que a mitocôndria se divide e se prolifera durante o seu desenvolvimento (SOUZA, 2005). Estes complexos devem funcionar perfeitamente para que possa ser gerada a

quantidade de energia celular suficiente para as necessidades de todo o organismo. Danos celulares de órgãos e tecidos de todo o organismo podem ocorrer se houver alguma alteração nos processos da cadeia respiratória mitocondrial (SOUZA, 2005).

As mitocôndrias possuem quatro funções fundamentais em um organismo: 1) a produção de ATP, que é a mais importante das funções; 2) atua na morte celular por apoptose; 3) a produção de calor; 4) contribuição na genética através do DNA mitocondrial (FINSTERER, 2004; SOUZA, 2005). Mas talvez esta última seja a característica mais importante e ímpar em relação às outras organelas humanas, no contexto desta obra: a presença de um material genético próprio, conhecido como o DNA mitocondrial (mtDNA) (CHAN, 2006).

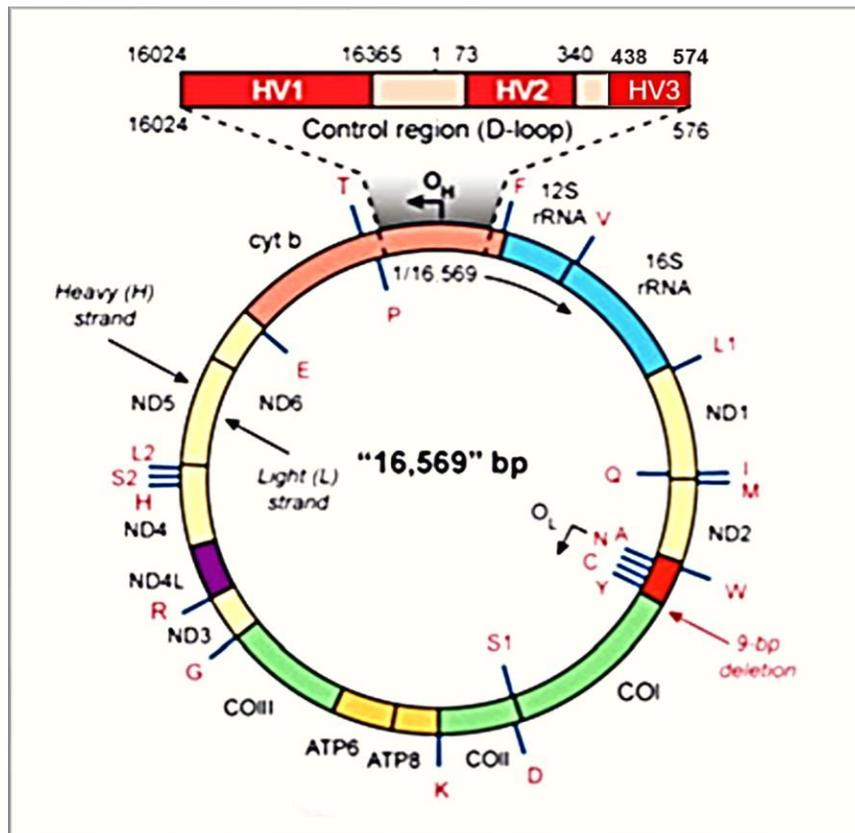
2.3.1 DNA Mitocondrial Humano

O DNA mitocondrial (mtDNA) humano consiste em uma molécula de fita dupla, contendo aproximadamente 16.569 pares de bases (pb) organizados de forma circular, podendo este número variar devido a pequenas deleções e/ou inserções (HOLLAND & PARSONS, 1999). O mtDNA é composto por uma cadeia pesada H (*Heavy* ou *H-strand*), rica em purinas, sendo assim denominada por apresentar maior quantidade de guanina em sua composição, e por uma cadeia leve L (*Light* ou *L-strand*), complementar à cadeia pesada, com menor peso molecular, rica em pirimidinas (TANAKA & OZAWA, 1994; NONIN-LECOMTE, DARDEL, AND LESTIENNE, 2005).

O mtDNA se apresenta compacto, sem *íntrons*, com uma utilização bastante econômica do genoma, já que possui poucas bases entre os genes inseridos na sua região codificante (BUTLER, 2011). É formado por uma região codificadora e uma região não codificadora, denominada Região Controle ou *D-loop* (*Displacement Loop*) e que apresenta cerca de 1.122 pb, sendo também conhecida como região hipervariável (HV). Esta parte do mtDNA foi denominada de região controle por conter promotores para a transcrição de genes presentes em ambas as fitas (HOLLAND & PARSONS, 1999; PANETO, 2010). A denominação de *D-loop* deveu-se ao fato de, durante a fase inicial de replicação, a fita recém-sintetizada se desprende da fita molde e forma uma “bolha” ou “*loop*”, a qual pode ser visualizada através de microscopia eletrônica (HOLLAND & PARSONS, 1999).

Na região codificadora estão presentes 37 genes que codificam 13 proteínas da cadeia respiratória (ND1, ND2, COI, COII, ATP8, ATP6, COIII, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 E CYT B), 22 tRNAs (F, V, L1, I, Q, M, A, W, N, C, Y, S1, D, K, G, R, H, S2, L2, E, P, T), dois rRNAs (12S rRNA e 16S rRNA), bem como as origens de replicação das fitas pesada e leve do mtDNA, representadas respectivamente por “OH” e “OL”, conforme pode ser visualizado na Figura 2 (BUTLER, 2012).

Figura 2 – Representação esquemática do genoma mitocondrial humano. Em destaque, a região controle, foco de estudos populacionais e forense.



Fonte: Modificado de LEMBRING, 2013.

A região controle do DNA mitocondrial é de interesse para a identificação humana por causa do alto grau de polimorfismo observado em três sub-regiões específicas: HV1 (posições de 16.024-16.365, 342 pb); HV2 (posições de 73-340, 268 pb); e HV3 (posições de 438-574, 137 pb). A última região é um segmento que pode apresentar extensão variável, pelo fato de conter repetições dinucleotídicas “CA” cujo número pode variar de um indivíduo para outro (LUTZ et al., 2000; VANECEK et al., 2004). Foi convencionado por Anderson et al. (1981) que a numeração das cadeias desta molécula se inicia na região controle próxima à origem de replicação. A região

controle vai da posição 16.024 a 16.569 e da posição 1 a 576, sendo que é nesta região que se encontram os três segmentos hipervariáveis (HV1, HV2 e HV3), altamente polimórficos e alvos de numerosos estudos (MORAIS, 2013).

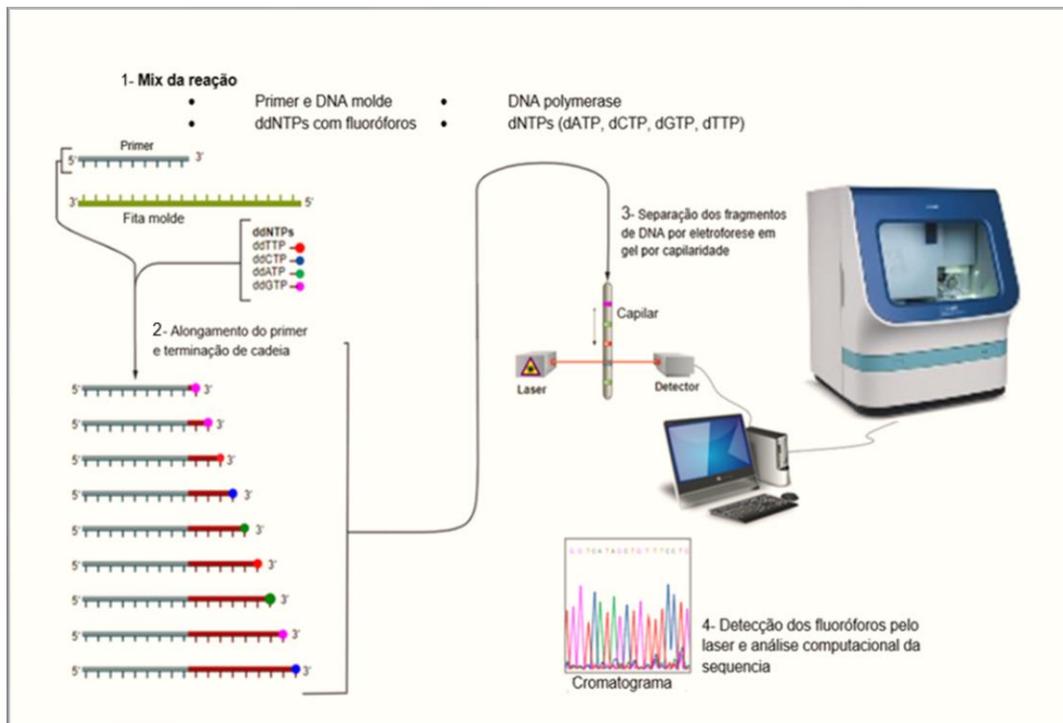
2.3.2 Sequenciamento do genoma mitocondrial

Em 1980, no laboratório de Frederick Sanger, em Cambridge (Inglaterra), o DNA mitocondrial humano foi sequenciado pela primeira vez. O sequenciamento de Sanger, ou identificação das bases moleculares do DNA pelo método de terminação da cadeia, é um dos métodos mais utilizados para estudos moleculares (SANGER et al 1977) até os dias atuais. Essa técnica se baseava, inicialmente, em dividir a amostra de DNA em quatro reações de sequenciamento separadas, contendo dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados); DNA polimerase; uma quantidade de 1:100, em relação aos dNTPs, de ddNTPs (didesoxirribonucleotídeos trifosfatados) de apenas um nucleotídeo para cada tubo. A polimerase começava a sintetizar o filamento complementar de DNA, começando a partir do primer; a incorporação aleatória do ddNTP na cadeia de DNA que está sendo sintetizada interrompe a reação de polimerização porque a extremidade 3' do ddNTP não possui um grupo hidroxila necessário para a formação da ligação fosfodiéster com o nucleotídeo subsequente da síntese. Dessa forma, a reação de amplificação e o fragmento anteriormente sintetizado fica com o ddNTP no final da cadeia (SANGER et al 1977).

ANDERSON et al. (1981) descreveram a primeira sequência do genoma mitocondrial humano, a qual viria a ser considerada como a sequência de referência designada por *Cambridge Reference Sequence* (CRS), e foi uma sequência consenso obtida principalmente a partir do sequenciamento de algumas regiões de uma placenta humana (LEVIN et al, 2003). Posteriormente, surgiu a primeira variação da técnica a possibilitar o sequenciamento automatizado: a criação de ddNTPs associados a fluoróforos (SMITH, 1985). Em 1986, a empresa Applied Biosystems começou a produzir máquinas para sequenciamento de DNA baseadas no método de Sanger. Essas máquinas usam diferentes marcadores fluorescentes para marcar cada nucleotídeo (como HEX 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína, FAM 6-carboxifluoresceína, ROX carboxi-X-rodamina ou TET 4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína) permitindo correr as reações em uma só coluna e realizar a leitura pela cor do nucleotídeo (ADAMS, 2008): o ddATP encontra-se marcado com a cor

verde, o ddCTP com a azul, o ddGTP é marcado com a amarela, mas é visualizado preto, e o ddTTP é marcado com a cor vermelha (figura 3). E em 1999, ANDREWS e colaboradores corrigiram 11 nucleotídeos sendo, atualmente, denominados de *Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS)* (MORAIS, 2013).

Figura 3 - Modelo esquemático de uma reação de sequenciamento automatizado.

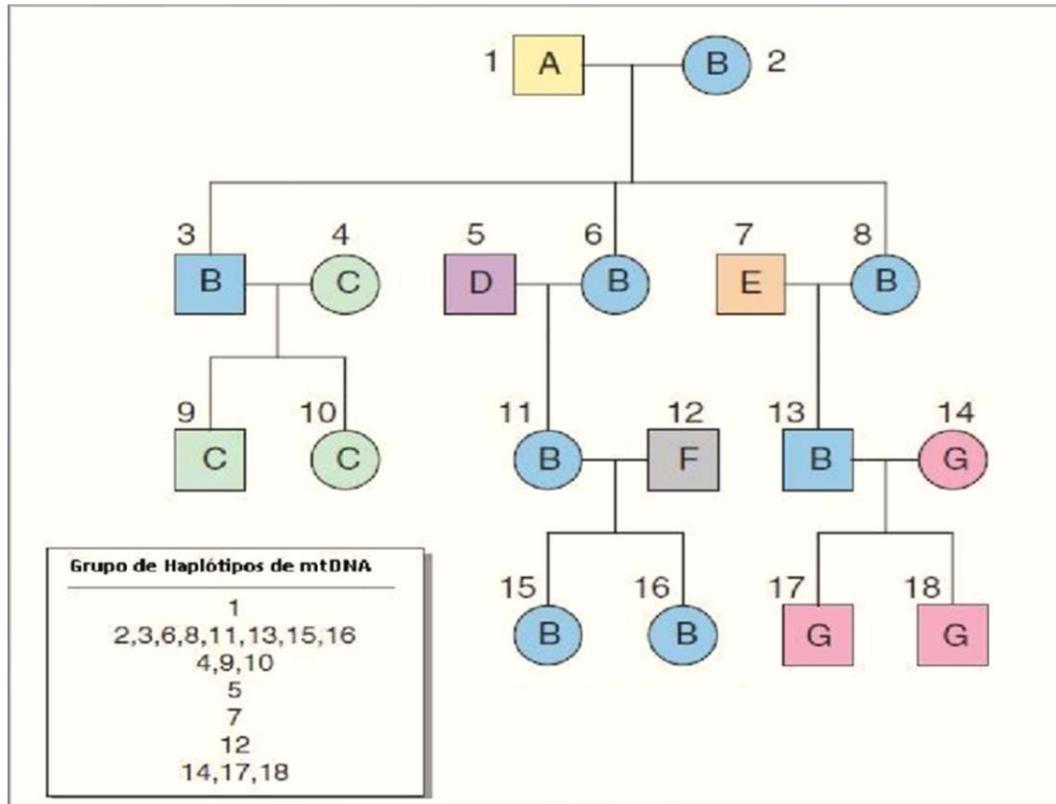


Fonte: Modificado de ESTEVEZJ, 2012.

2.3.3 Padrão de herança e número de cópias do DNA mitocondrial

Em 1980, GILES et al. (1980) demonstraram, pela primeira vez, que o genoma mitocondrial, um genoma haploide, é herdado estritamente da mãe. A herança uniparental do mtDNA traz como consequência o fato de que os haplótipos não são únicos para cada indivíduo, mas compartilhados entre indivíduos aparentados maternamente, conforme pode ser visto na Figura 4 (PARSON et al., 2004). Os haplótipos são conjuntos de pares de bases (blocos) identificados a partir de um gene devidamente sequenciado, por ser uniparental não ocorre recombinação gênica. (TORRONI et al., 2006). Embora esta seja a regra geral, no final de 2018 foi publicado um artigo científico que apontava que em algumas famílias existe herança do DNA mitocondrial de forma biparental (SHIYU LUO et al., 2018).

Figura 4 – Heredograma representando a transmissão materna de mtDNA com 18 indivíduos, os quadrados representam homens, círculos representam mulheres e cada letra representa um haplótipo.



Fonte: Modificado de BUTLER, 2012.

Geralmente o mtDNA paterno que consegue penetrar no ovócito sofre a ação de enzimas proteolíticas até a sua degradação completa (SCHWARTZ & VISSING 2002; WILLIAMS, 2002). Quando o zigoto se divide e o blastócito se desenvolve, o citoplasma e os restantes componentes celulares são consistentes com o oócito original da mãe. O oócito possui cerca de 100 mil moléculas de mtDNA, criando um cenário de diluição extrema para qualquer molécula de mtDNA do espermatozoide que possa existir no zigoto (CHEN et al., 1995; HOLLAND & PARSONS, 1999). Apesar dos espermatozoides possuírem algumas mitocôndrias na região do pescoço e cauda, o genoma mitocondrial masculino é destruído durante e logo após a fertilização, desaparecendo no começo da embriogênese (CUMMINS, WAKAYAMA & YANAGIMACHI, 1998; SHITARA et al., 1998; SHITARA et al., 2000).

Enquanto o DNA nuclear está presente em apenas duas cópias por célula diploide, estima-se que um óvulo maduro contenha milhares de mitocôndrias e mais de 100.000 cópias de mtDNA (PIKO & MATSUMOTO 1976; MICHAELS et al., 1982). Em geral, existem entre duas e 10 cópias de mtDNA por mitocôndria e entre 200 a 10.000 mitocôndrias por célula, dependendo do tipo de tecido (BOGENHAGEN &

CLAYTON, 1974; RICOY-CAMPO AND CABELLO 2003). O DNA mitocondrial é transmitido às gerações seguintes pela chamada herança citoplasmática, dando origem a uma matrilinearidade, e favorecendo a investigação da evolução da espécie, pois sua integridade genética é totalmente mantida, a não ser pelas mutações (SANTOS & SANTOS, 2012).

2.3.4 Taxa de mutação do DNA mitocondrial

Define-se mutação como todas e quaisquer alterações na sequência de pares de bases do DNA (GUSMÃO & ALVES, 2010). E quando esta variabilidade é registrada em mais do que 1% da população, transpõe-se para um polimorfismo (NUSSBAUM, MCINNES AND WILLARD, 2015). Um polimorfismo, que ocorre ao nível da linha germinativa, é bastante suscetível de ser transmitido à descendência, pois pressupõe-se que seja uma variabilidade já estável para que seja realmente transmitida às gerações seguintes (PINHEIRO, 2010). A não recombinação é uma das características essenciais do mtDNA.

As variações encontradas no genoma mitocondrial resultam exclusivamente de mutações adquiridas ao longo das gerações (UNDERHILL & KIVISILD, 2007). O mtDNA é uma molécula altamente polimórfica, apresentando taxas de mutação elevadas em comparação ao DNA nuclear em decorrência da baixa fidelidade da polimerase do mtDNA (pol γ) e da ausência de mecanismos de reparo, que permite um maior número de mutações durante o processo de replicação – cerca de um erro em cada 280 mil pb (JOHNSON & JOHNSON, 2001). De um modo geral, considera-se que as regiões do genoma mitocondrial sofrem de seis a dez vezes mais mutação que exemplares únicos de genes nucleares (BROWN, GEORGE & WILSON, 1979; BROWN et al., 1982; WALLACE et al., 1987; BUDOWLE et al., 2003).

2.3.5 Heteroplasmia do Genoma Mitocondrial

A heteroplasmia mitocondrial humana foi identificada pela primeira vez na década de 1980 em estudos genéticos de doenças mitocondriais, onde níveis variáveis de deleções ou mutações pontuais foram observados em pacientes afetados. Entretanto, a heteroplasmia também está presente em indivíduos saudáveis. Até agora, o estudo da heteroplasmia do mtDNA humano em indivíduos saudáveis

tem sido focado na análise da região controle, que cobre apenas 7% do total do genoma mitocondrial (RAMOS et al., 2013).

Podemos definir heteroplasmia como a presença de mais de um tipo de genoma mitocondrial em uma mesma célula ou em um mesmo indivíduo (MELTON, 2004; BRANDSTÄTTER & PARSON, 2003). Dessa forma, a heteroplasmia pode ser observada de várias maneiras: os indivíduos podem ter mais de um tipo de mtDNA em um único tecido; indivíduos podem exibir um tipo de mtDNA em um tecido e um tipo diferente em outro tecido (CARRACEDO et al., 2000). Durante o desenvolvimento do indivíduo, as moléculas de mtDNA se replicam independentemente umas das outras e são ditas não-recombinantes e, conseqüentemente, podem surgir mutações em apenas algumas linhagens celulares (SCHWART; VISSING, 2002). No surgimento de uma nova mutação e após a divisão de uma célula heteroplásmica, as mitocôndrias são distribuídas aleatoriamente pelas células filhas (DIMAURO & DAVIDZON, 2005).

O fenômeno de heteroplasmia também pode ocorrer pela presença de mitocôndrias paternas no organismo, evento decorrente de falhas no mecanismo normal de reconhecimento e destruição das mitocôndrias esperáticas durante a embriogênese (SCHWART; VISSING, 2002). E o fato dessa replicação possuir baixa fidelidade, existe a possibilidade de uma população de moléculas de mtDNA, encontradas em um indivíduo, serem diferentes, com variantes das mesmas replicando e segregando de forma independente (HOLLAND & PARSONS, 1999).

A coexistência de várias moléculas de mtDNA em uma única amostra ocorre com mais frequência em tecidos com alta atividade metabólica, como no caso do tecido muscular (CALLOWAY et al., 2000) e também nos fios de cabelo onde o grau de energia requerido para a sua queratinização é bastante alto (TULLY et al., 2004) e superiores àqueles verificados amostras de sangue ou saliva (ALONSO et al., 2002; ROBERTS & CALLOWAY, 2011). O tecido muscular esquelético e o cerebral são os tecidos que apresentam os índices mais elevados de heteroplasmia (ROBERTS & CALLOWAY, 2011).

Diz-se que um indivíduo é heteroplasmático quando possui uma mistura de diferentes mtDNA, que podem ocorrer no mesmo tecido, mesma célula ou mesma mitocôndria (BUTLER, 2012). Acredita-se atualmente que todos indivíduos são heteroplasmáticos em algum nível, podendo a maioria ser em porcentagem abaixo dos níveis de detecção nas análises de sequenciamento de mtDNA (COMAS, PÄÄBO &

BERTRANPETIT, 1995; BENDALL et al., 1996; STEIGHNER et al., 1999; TULLY et al., 2000).

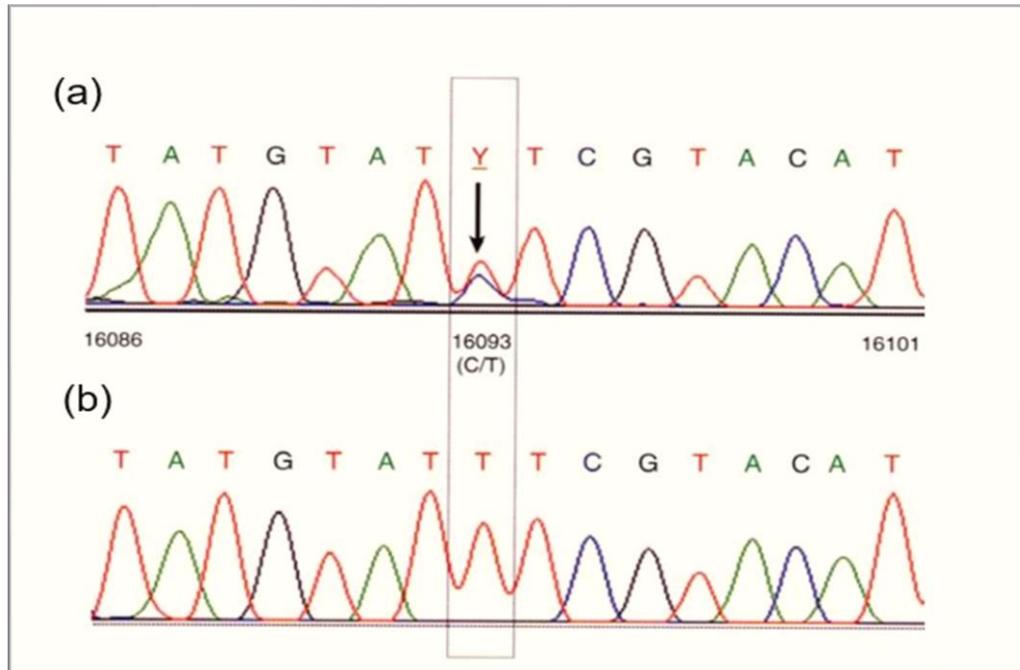
Nas investigações forenses é importante atentar para a existência de heteroplasmia em regiões do DNA mitocondrial de alguns indivíduos, visto que essa característica pode tornar a análise mais complexa (PRIETO et al., 2004). O primeiro caso de detecção de heteroplasmia de sequência na área forense ocorreu em virtude da análise dos restos mortais do Tsar Nicholas II. Membros da família Real Russa, após serem assassinados em 1918, foram queimados e enterrados em uma cidade da Sibéria, permanecendo sem identificação por mais de 70 anos. Um grupo de cientistas forenses, em 1991, constatou, através da análise antropológica por mtDNA, que as ossadas pertenciam ao Tsar e sua família, e que continham certo grau de heteroplasmia (IVANOV et al., 1996). As heteroplasmas podem ser classificadas em heteroplasmas de sequência ou de comprimento.

As heteroplasmas de sequência (também denominada de heteroplasma de ponto) são mutações pontuais no genoma mitocondrial, numa mesma sequência de um indivíduo, dois nucleotídeos são observados em uma mesma posição do mtDNA, geralmente, numa única posição (Figura 5), ocorrendo, porém com muita raridade, em duas ou até três posições - triplasmia (TULLY et al., 2000; SALAS, LAREU & CARRACEDO, 2001). Estas mutações por substituição podem ser transições (substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina) ou transversões (substituição de uma purina por uma pirimidina ou de uma pirimidina por uma purina) (BENDALL & SYKES, 1995; BENDALL et al., 1996; MELTON, 2004).

Para designar as posições de heteroplasma, deve-se seguir as normas da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a saber: nucleotídeos G/T = K; A/G = R; G/C = S; A/T = W; C/T = Y; A/C = M; A/G/T = D; A/C/T = H; A/C/G = V; C/T/G = B; A/C/G/T = N (FBI, 2003). As posições comumente afetadas pelas heteroplasmas de sequência coincidem com aquelas conhecidas como *hotspots* para mutações (IRWIN et al., 2009). Mesmo não existindo um valor definido de background para a detecção da heteroplasma de sequência, deve-se relatar baseada em sequências de qualidade e sempre após a confirmação da heteroplasma no sequenciamento de ambas as fitas do mtDNA (PARSON et al., 2014).

Na Figura 5 a posição 16093, observamos na amostra “a”, uma Heteroplasma de Sequência (presença de dois nucleotídeos em uma mesma posição), representada pela letra Y (nucleotídeos Citosina e Timina) e na amostra “b” apenas a Timina.

Figura 5: Mostra sequenciamento da região do mtDNA entre as posições 16086 e 16101, em duas amostras diferentes (a) (b).



Fonte: BUTLER, 2012.

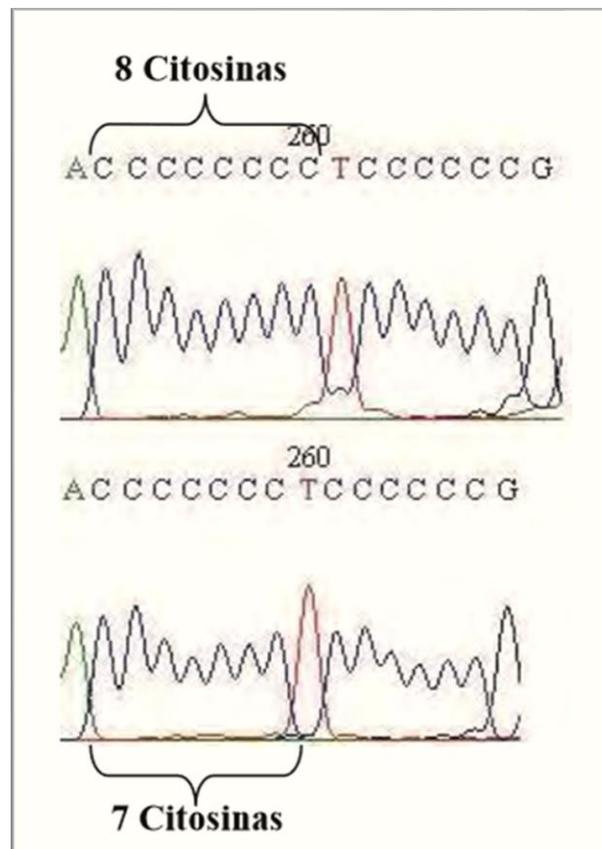
As heteroplasmias de comprimento podem ocorrer por inserções e/ou deleções (BENDALL & SYKES, 1995; BENDALL et al., 1996; MELTON, 2004), estando associadas a regiões polimórficas constituídas por citosinas, designadas de zonas homopoliméricas (por conterem repetições mononucleotídicas) de citosinas ou de poli-citosinas (poli-C) ou *hotspots* mutacionais (NAUE et al., 2015; PANETO, 2010). Ocorrem tipicamente em sequências que apresentam, no mínimo, oito citosinas consecutivas (Figura 6). É na região controle do mtDNA, especificamente nos segmentos HVI e HVII, que se observa a maior frequência das heteroplasmias de comprimento (ROBERTS & CALLOWAY, 2011).

Este tipo de heteroplasmia frequentemente causa perda na qualidade da sequência, devido à presença de duas ou mais variantes de comprimento, causando o registro sobreposto dos nucleotídeos após esta região (BUTLER, 2012), e predominantemente ao redor das posições 16189, 309, 315 e 573 (Figura 7), nas quais se observam trechos de policitosina ininterruptas e próximas da posição 524, consequência das diversas repetições dos dinucleotídeos citosina e adenina (PARSON & BANDELT, 2007).

Em casos raros, a heteroplasmia de comprimento também pode ser observada em outras regiões, tais como ao redor das posições 16258, 16293, 73 e 455 ou em algumas regiões de sequência não repetitivas devido a eventos de inserção

e deleção (PARSON & BANDELT, 2007). A heteroplasmia de comprimento surge durante o processo de replicação por erros da polimerase do mtDNA, que sintetiza uma cadeia complementar com variação no tamanho em relação à sequência principal, num processo denominado de deslize de replicação (*replication slippage*). Este fenômeno dificulta a análise do genoma mitocondrial (BUTLER, 2011), quando ocorre perda da qualidade do sequenciamento à jusante das regiões poli C, que levam a leitura de apenas uma das fitas do DNA mitocondrial (L ou H) a partir da região poli C em sentidos opostos, recomenda-se que seja realizado um novo sequenciamento da amostra utilizando outros dois primers (um “forward” e um “reverse”), para garantir a dupla leitura de todas as posições da região sequenciada, e quando não é possível, é aceitável a dupla leitura proveniente da mesma fita (PARSON et al., 2014).

Figura 6 - Heteroplasmia de comprimento.

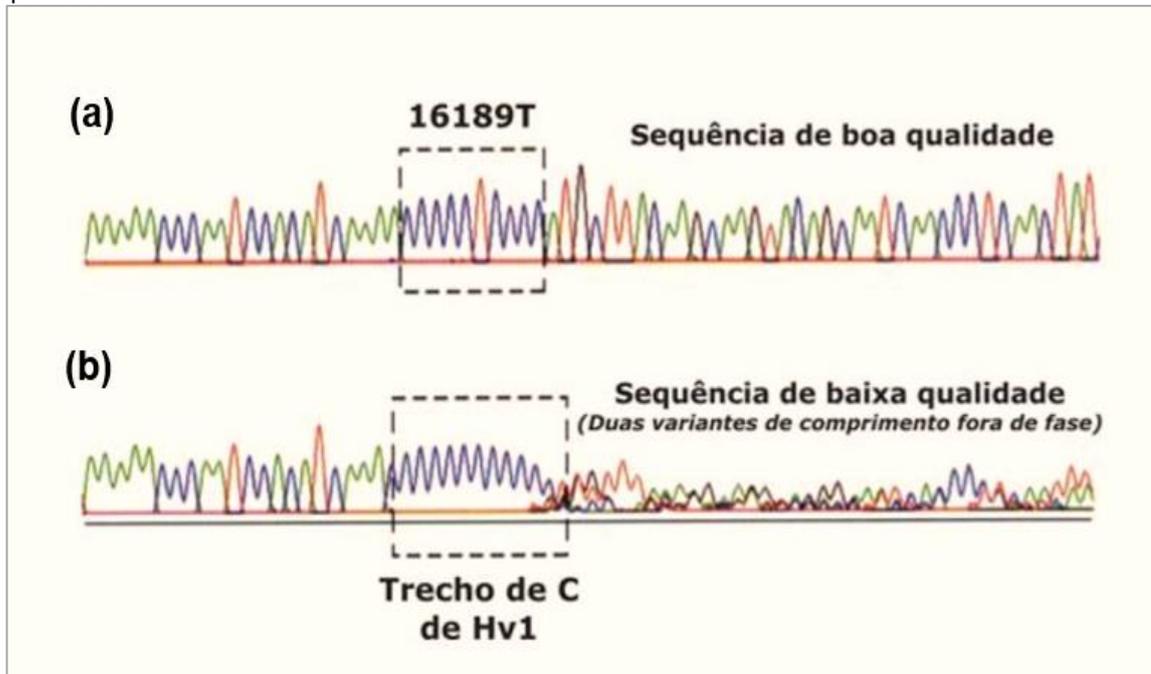


Fonte: BUTLER, J. M. Forensic DNA Typing. London: Elsevier Academic Press, 2005.

Na figura 7 comparando uma amostra “a” apresentando boa qualidade de sequência, pois possui na posição 16189 uma Timina interrompendo a cadeia de poli Citosinas nesta região, na amostra “b” na qual a Timina foi substituída por uma Citosina, dando origem a uma região com inúmeras repetições do nucleotídeo C.

Sendo assim na amostra “b” a qualidade da sequência cai rapidamente após a sequência poli C. Ocorrendo isso por causa da presença de duas ou mais variantes de comprimento (Heteroplasmia de Comprimento), a qual causa o registro sobreposto dos nucleotídeos após esta região.

Figura 7: Demonstração de como as heteroplasmias de comprimento influenciam na qualidade das sequências.



Fonte: Modificado de BUTLER, 2012.

2.3.6 Filogenia do DNA mitocondrial

Através de análises de variações do DNA mitocondrial, tem se realizado estudos de ancestralidade, voltados para a antropologia e evolução, sendo estabelecidos, por exemplo, na espécie humana, grupos específicos denominados de haplogrupos, que são específicos para determinados povos. Assim, tornou-se possível reconstruir rotas migratórias e análises filogenéticas (ALVES-SILVA, 2000; ALLARD et al., 2006; ALVAREZ, 2007). Cada haplogrupo é formado por um conjunto de haplótipos que apresentam algumas características em comum, que os definem como tendo uma ancestralidade compartilhada (BUDOWLE et al., 2003). A variação de sequências de mtDNA evoluiu em função do acúmulo de mutações ao longo das linhagens femininas (VAN OVEN & KAYSER, 2009).

Para facilitar a verificação global dos haplogrupos, foi gerada uma árvore filogenética da variação de mtDNA a partir de todos os dados de sequência

disponíveis (4.198 sequências de genoma completo de mtDNA e outras 945 sequências da região codificante disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). Esta abrangente árvore filogenética de mtDNA apresenta uma nomenclatura universal dos haplogrupos, a qual é atualizada frequentemente e pode ser acessada no site <http://www.phylotree.org> (VAN OVEN & KAYSER, 2009).

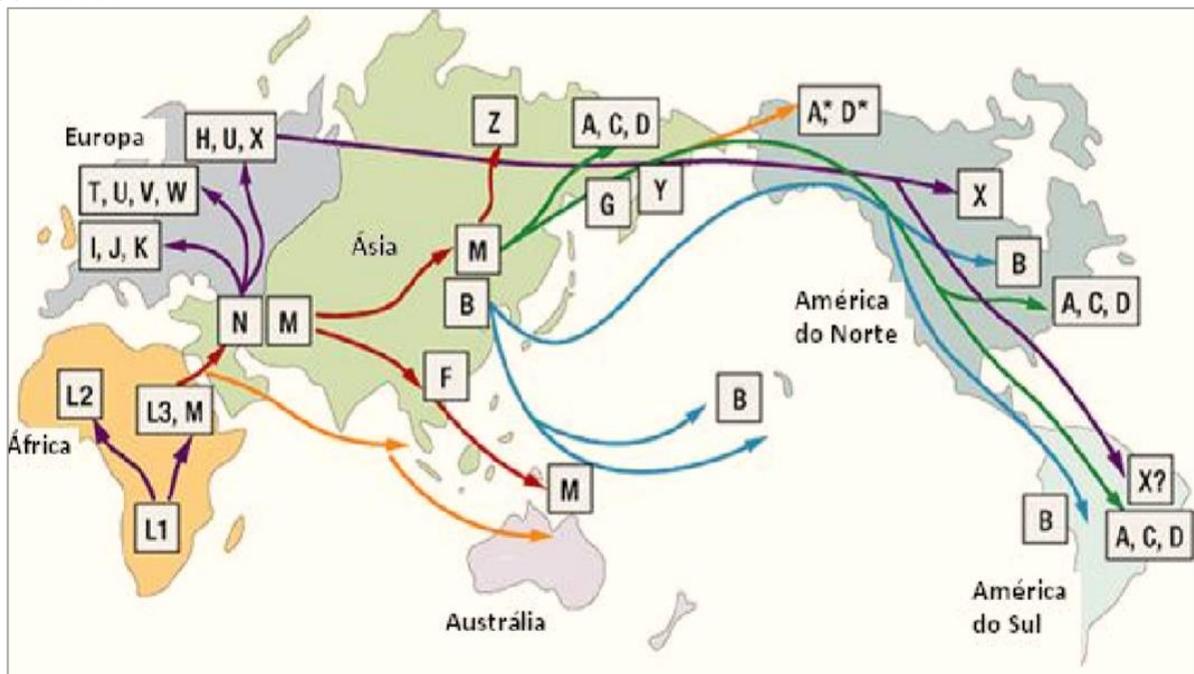
Os primeiros haplogrupos reconhecidos foram os dos nativos americanos, nomeados A, B, C e D (TORRONI et al., 1993). Posteriormente, haplogrupos de populações de diferentes continentes foram caracterizados, seguindo-se a sua designação por outras letras do alfabeto (VAN OVEN & KAYSER, 2009). Os haplogrupos L são específicos, indicando a origem africana do homem moderno, linhagem mais antiga 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, 2009), que compreende toda a variação observada fora da África (Figura 10).

A nomenclatura evoluiu de tal modo que os haplogrupos representados pelas letras C, D, E, G, Q e Z designam linhagens pertencentes a M; os haplogrupos A, I, S, W, X e Y são de linhagens dentro do haplogrupo N; as linhagens B, F, HV, H, J, K, P, T, U e V designam linhagens dentro do macrohaplogrupo R (VAN OVE & KAYSER, 2009). A letra O a única não utilizada foi substituída, renomeada como N12 por HUDJASHOV et al. (2007). Existem outras linhagens descendentes, subdivisões de um haplogrupo em particular, para as quais não foram reservadas letras alfabéticas únicas. Estes haplogrupos foram marcados com um asterisco (Figura 9). Por exemplo: N* significa N5, N12, N13, N14, N21 e N22 (VAN OVEN & KAYSER, 2009). O asterisco é utilizado para designar membros de um haplogrupo que não pertencem a nenhum dos sub-haplogrupos já denominados. Assim como os sub-haplogrupos, são designados por números, ou seja, a nomenclatura para sub-agrupamentos adicionais segue a alternativa letra-número-letra-número, em ordem crescente alfabética e numérica a partir do último grupo publicado (AFONSO, 2008; PANETO, 2010).

Os haplogrupos são continentais ou etnicamente específicos (RICHARDS et al., 2000). Sete deles (L0, L1, L2, L3, L4, L5, L6) formam as linhagens africanas, corroborando com a teoria de que nossa espécie surgiu nesse continente (VAN OVEN & KAYSER, 2009; 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); e oito haplogrupos A, B, C, D, E, F, G e M englobam a maioria das linhagens descritas para a Ásia, Oceania e nativos americanos (KIVISILD et al., 2002; TORRONI et al., 1993; KONG et al., 2003). A importância do DNA mitocondrial se dá principalmente na sua aplicação para entender a história das populações e na identificação humana (Figura 8). (GINTHER et al., 1992; BALOGH et al., 2003; COBLE et al., 2009).

Figura 8 – Mapa das rotas de migrações humanas, o surgimento e variações dos haplogrupos a partir do mtDNA

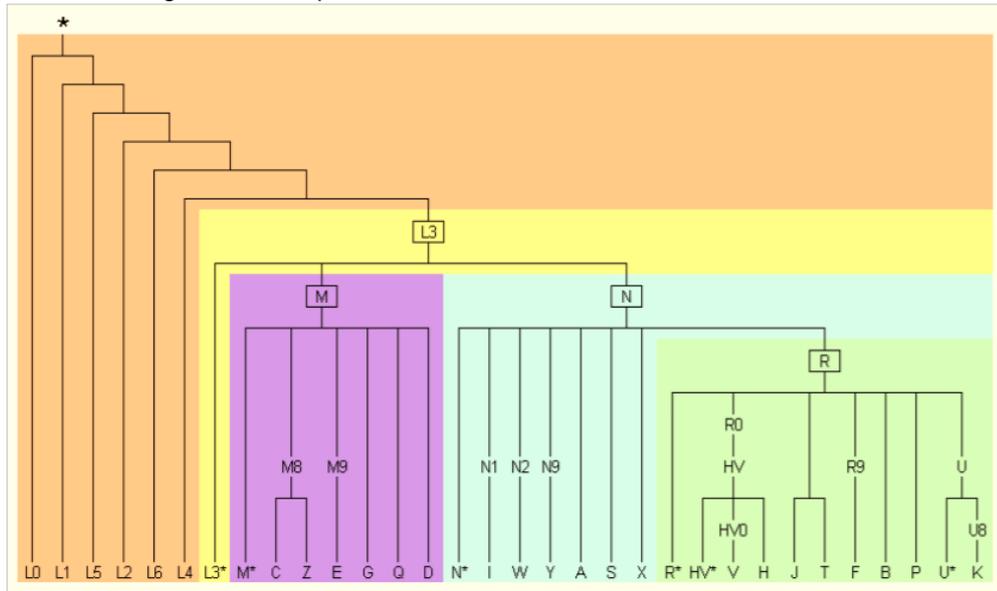


Fonte: Modificado de Family Tree DNA.

Cada grupo populacional pertenceu a um ou mais haplogrupos de acordo com sua origem. Atualmente, são 25 os principais haplogrupos, contendo um total de 497 variáveis polimórficas definidas (WALLACE, 2005; ROMERO et al., 2014). A importância de uma filogenia global detalhada do mtDNA foi abordada por diversos autores (RICHARDS, 2004; BANDELT et al., 2005; TORRONI et al., 2006; SALAS et al., 2007; VAN OVEN & KAYSER, 2009).

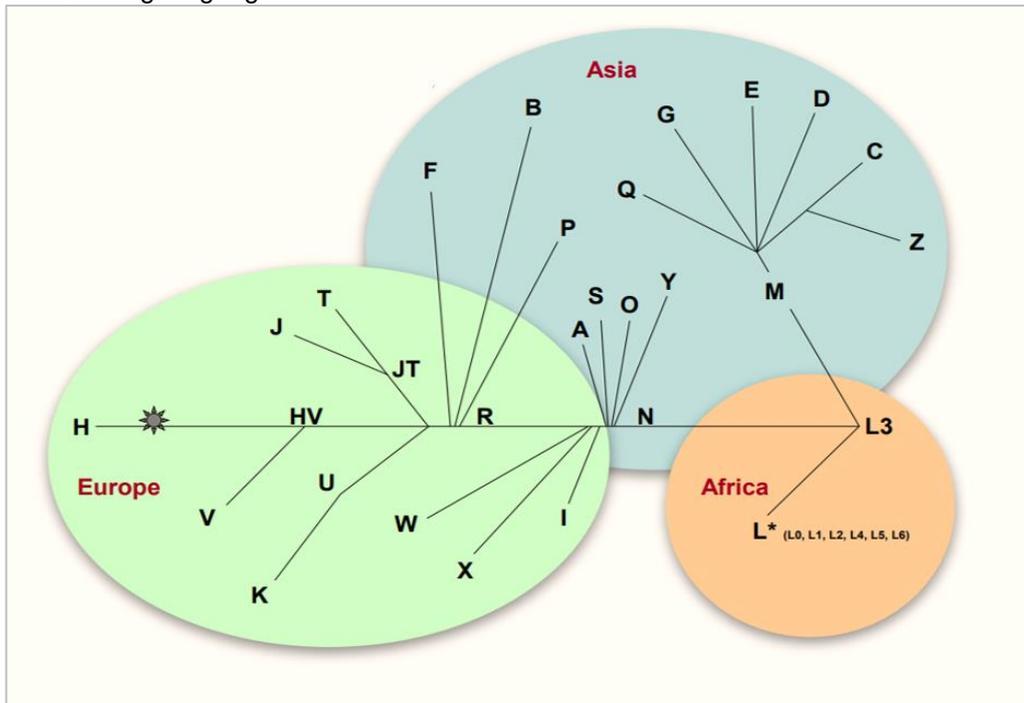
Na figura 9 está mostrando o uso de letras do alfabeto para a denominação de Haplogrupos. A raiz da árvore é indicada por uma estrela que representa o antepassado matrilinear comum mais recente de todos os humanos. Esta figura não ilustra toda variação global de DNA mitocondrial humano (pode ser acessada em <http://www.phylotree.org>), ela apenas mostra a topologia alfabética dos haplogrupos.

Figura 9 – Árvore Filogenética Simplificada do DNA Mitocondrial Humano.



Fonte: VAN OVEN & KAYSER, 2009.

Figura 10 – Filogenia simplificada dos haplogrupos de mtDNA, os círculos agrupam os haplogrupos de acordo com sua origem geográfica.



Fonte: Modificado de FOSWIKI, 2016.

2.3.7 Estudos do DNA mitocondrial na evolução humana

Os estudos pioneiros do mtDNA humano foram feitos na década de 1980 pelo grupo comandados por Allan Wilson (WILSON et al., 1985; CANN et al, 1987;

VIGILANT et al., 1991). Estes estudos estabeleceram que existe relativamente pouca variação no mtDNA das populações humanas e que as maiores variações são encontradas no mtDNA das populações africanas (SNUSTAD et al., 2001). A molécula do DNA mitocondrial (mtDNA) passou a fazer parte de muitos, senão da maioria dos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos, migratório e evolutivos (WILSON et al., 1985; MORITZ et al., 1987; AVISE, 1994). Segundo a Teoria da Eva Mitocondrial, a humanidade conhecida teria vindo de uma só mulher, que viveu há cerca de 150 mil anos, na África (WILSON, 1992).

Os marcadores genéticos, especialmente os uniparentais, vêm sendo utilizados em numerosos estudos que buscam elucidar eventos demográficos e históricos em populações humanas. A origem de nossa espécie foi mais bem compreendida com a análise do DNA mitocondrial (VIGILANT et al., 1991). Aplicando-se os marcadores moleculares que mostram as variabilidades genéticas entre os indivíduos, pode-se estudar os processos evolutivos dos países e de diversos grupos étnicos no mundo. Os marcadores do DNA mitocondrial são excelentes para estudar as árvores da evolução, as diferenças entre as espécies e as mutações que definem características que determinam um grupo (HOLLAND, 1995; CARRACEDO et al., 2005). Devido às características particulares do mtDNA, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de reconstruir a origem e evolução das populações e de investigar o passado demográfico e a dinâmica populacional, nomeadamente, das expansões, migrações e outros padrões de fluxo de genes. Desta forma é possível traçar a história de uma determinada população e estabelecer uma correlação com eventos da humanidade (PAKENDORF & STONEKING, 2005; LADOUKAKIS & ZOUROS, 2017)

2.3.8 DNA Mitocondrial e as ciências forenses

No cenário criminalístico, o DNA mitocondrial está ganhando espaço por apresentar características que o torna uma estratégia importante na rotina forense (MARQUES, 2012). Obviamente o DNA não pode por si só provar a culpabilidade criminal de uma pessoa ou inocentá-la, mas pode estabelecer uma conexão irrefutável entre essa pessoa e a cena do crime. Atualmente os resultados da determinação de

identificação genética pelo DNA já são rotineiramente aceitos em processos judiciais em todo o mundo (PENA, 2005).

O mtDNA é utilizado, especialmente, em amostras onde exista uma reduzida probabilidade de obter resultados aplicando o estudo de marcadores polimórficos no DNA nuclear, como exemplos, nos cabelos (onde só é possível obter resultados de DNA nuclear que apresentam bulbos) e, em determinadas circunstâncias, ossos e dentes (BUDOWLE et al., 2003). O elevado número de cópias de mtDNA é vantajoso em aplicações forenses para estudo de amostras altamente degradadas (BUDOWLE et al., 2003). O mtDNA apresenta-se, de fato, como uma molécula bastante resistente às condições ambientais (HOLLAND & PARSONS, 1999). A conformação circular do mtDNA o torna menos suscetível à ação de exonucleases, o que facilita a preservação da molécula e a análise de seus resultados. Outro ponto importante é o fato de esta molécula ser protegida por duas membranas, as mitocôndrias internas e externas (GARRIDO, 2014).

Na rotina dos laboratórios forenses, a metodologia utilizada para análise de DNA mitocondrial é a extração do DNA, amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase) seguida de sequenciamento e eletroforese (BLUTER, 2005). O sequenciamento do DNA mitocondrial é uma ferramenta válida e confiável, utilizada em casos forenses, mostrando-se uma importante ferramenta na genética forense (WILSON et al., 1995). Foi a primeira ferramenta utilizada na identificação dos remanescentes ósseos de soldados americanos que lutaram na Guerra do Vietnam (HOLLAND et al., 1993). No início do XXI, também foi utilizada na identificação das vítimas da tragédia ocorrida em 11 de setembro de 2001, no World Trade Center (HOLLAND et al., 2003), onde, o laboratório Myriad Genetics Inc., realizou testes com vários tipos de amostras (lâminas de barbear, pentes, escovas de dentes) de pessoas supostamente desaparecidas durante o atentado (LEWIS, 2004).

A não recombinação característica do mtDNA, em conjunto com a sua herança materna, permite a utilização de familiares de uma mesma linhagem materna para resolução de casos de investigação da identidade, em indivíduos desaparecidos ou vítimas de desastres em massa, já que, excluindo mutações pontuais que possam ocorrer e ser adquiridas, a mãe passa para os filhos o seu mtDNA na íntegra, ou seja, o seu haplótipo. O haplótipo é o conjunto de variações na sequência de mtDNA de um indivíduo em comparação com a rCRS. O mtDNA não é único, é partilhado por todos os indivíduos da mesma linhagem materna (BUDOWLE et al., 2003).

Como mencionado, a heteroplasmia é um estado biológico que parece ser mais comum do que foi citado inicialmente (MONNAT; LOEB, 1985). E a frequência de heteroplasmia é também de interesse prático nos testes para identificação forense, pois pode ser relevante na solução de um caso (SALAS; LAREU; CARRACEDO, 2001). A maior parte da variação de sequências se localiza na região “controle” (ou *D-loop*), dentro da qual há outras duas regiões conhecidas como hipervariáveis: HV1 e HV2. Estas regiões são alvo gênico de análises do mtDNA para fins forenses (GARRIDO et al., 2014).

Segundo dados do SWGDAM (Scientific Working Group DNA Analysis Methods) (2003), a análise das regiões HV1 e HV2 não pode ser considerada uma identificação conclusiva, pois o DNA mitocondrial não tem o poder de discernimento de um marcador. Consequentemente, para se determinar a significância dos resultados em que não se pode excluir a possibilidade das amostras apresentarem mesma origem ou mesma linhagem matrilinea, é necessário verificar a frequência com que esse conjunto de polimorfismos ocorre na população. Desta forma, busca-se determinar estatisticamente a raridade da sequência, sendo estes cálculos baseados em banco de dados populacional de DNA mitocondrial (PARSONS et al., 2004). O EMPOP é um banco de dados populacional de mtDNA criado pelo grupo European DNA Profiling (EDNAP), com a finalidade de compartilhar dados confiáveis. Estes dados podem ser acessados na plataforma online (www.empop.org); os laboratórios que venham participar dos exercícios colaborativos do controle de qualidade podem submeter seus dados populacionais. Atualmente, o EMPOP é o banco mais utilizado pelos laboratórios forenses ao redor do mundo (PARSON et al., 2004; PRIETO et al., 2011).

Todos os indivíduos relacionados por meio de ancestrais do sexo feminino tendem a possuir haplótipos mitocondriais idênticos, sendo assim consiste em uma análise acessória que agrega informações às investigações, porém não tem poder de individualização. Caracteristicamente, os laboratórios liberam os resultados das análises de mtDNA tendo como base a variação observada em relação a sequência de referência (GARRIDO et al., 2014).

As regiões hipervariáveis têm um alto interesse na identificação humana devido à sua elevada taxa de mutação. O pequeno tamanho de cada uma das três regiões permite a amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e o sequenciamento, assim como a natureza haploide e monoclonal do mtDNA simplifica

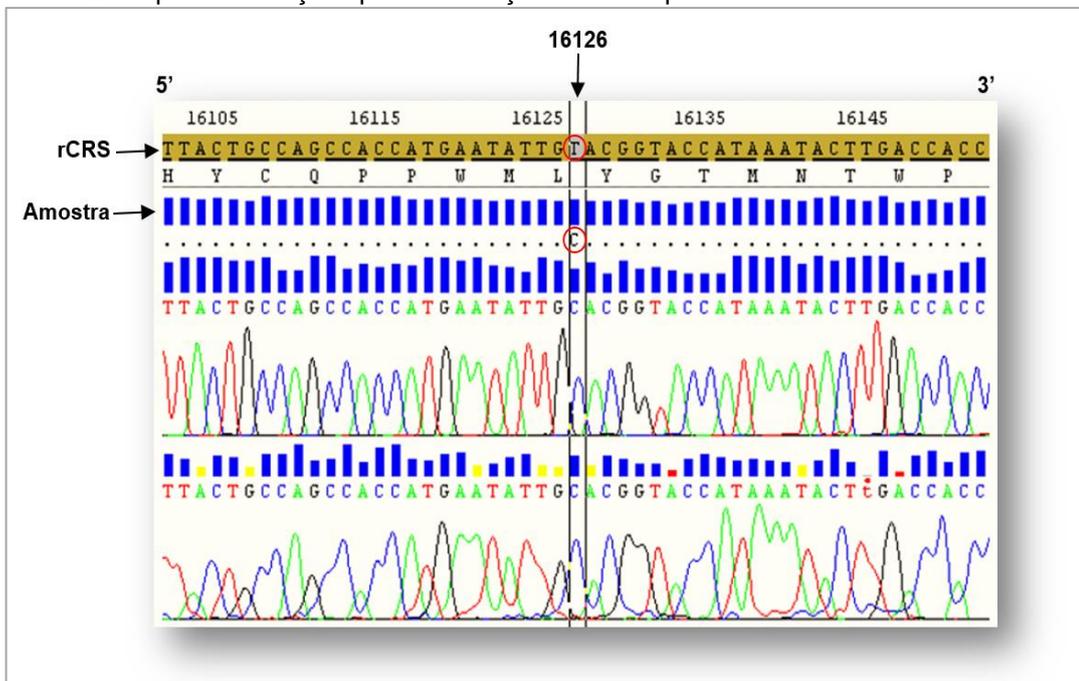
a interpretação de resultados (MORAES, 2013). No entanto, é preciso um conhecimento aprofundado das várias características do mtDNA, a fim de analisar e interpretar corretamente os resultados. Estes incluem questões como nomenclaturas, referências de bancos de dados de diversas populações, heteroplasmias (BUDOWLE et al., 2003). As primeiras recomendações quanto à interpretação dos resultados de DNA mitocondrial pela comissão de DNA da *International Society for Forensic Genetics* (ISFG). Dentre outras orientações, estão as referentes à comparação de sequências entre amostras de referência e de vestígios. Se as sequências são inequivocamente diferentes, as amostras podem ser excluídas como sendo oriundas de uma mesma pessoa. Se as sequências são as mesmas, então as amostras de referência e as questionadas (vestígios) não podem ser excluídas como potencialmente sendo da mesma pessoa (podem ser também de dois indivíduos que compartilham a mesma linhagem materna, por exemplo). Em casos onde a mesma heteroplasmia é observada tanto na amostra questionada como na amostra de referência, sua presença pode aumentar a força da coincidência. Se a heteroplasmia é observada na amostra questionada, mas não na amostra de referência ou vice-versa, não se pode excluir que sejam oriundas de uma mesma linhagem materna. Se a amostra questionada e a amostra de referência diferem por um único nucleotídeo e nenhuma evidência de heteroplasmia está presente, a interpretação dos resultados é inconclusiva.

2.3.9 Nomenclatura dos polimorfismos de mtDNA

A nomenclatura dos polimorfismos tem que estar em conformidade com as recomendações da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS, 2013). Para a leitura de sequências de mtDNA que se deseja analisar utiliza-se a nomenclatura universal que tem como base a sequência de referência revisada, *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) (Andrews e cols., 1999). Nas análises de sequências de amostras em estudo devem ser identificadas apenas as diferenças observadas após alinhamento com a rCRS, indicando a posição nucleotídica e o nucleotídeo presente nessa mesma posição. O haplótipo de cada amostra corresponde às diferenças encontradas em relação à rCRS e suas respectivas posições nucleotídicas.

Na detecção de substituições nas sequências de mtDNA relativas à rCRS, quando ocorre uma alteração de uma base nucleotídica por outra base nucleotídica numa determinada posição, apenas se aponta a posição onde se observa a alteração e o nucleotídeo que difere da rCRS. Mutações por substituição podem ser transições (substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina) ou transversões (substituição de uma purina por uma pirimidina ou de uma pirimidina por uma purina). Citando um exemplo, a rCRS apresenta um “T” (timina) na posição 16126, mas alguns indivíduos apresentaram um “C” (citosina) nessa mesma posição, constituindo uma transição. Tal polimorfismo é assinalado como 16126C. Todas as outras posições são entendidas como sendo idênticas à rCRS (BUDOWLE et al., 2003), conforme Figura 11.

Figura 11 – Exemplo de mutações por substituição e sua respectiva nomenclatura.



Fonte: presente estudo.

Na detecção de inserções, coloca-se um ponto após a última base alinhada com a rCRS e então listando as inserções com os nucleotídeos observados, precedidos de algarismos em ordem numérica (BUDOWLE et al., 2003). Exemplo, se uma citosina estiver presente após a posição 309, devido à uma inserção, esta diferença de alinhamento em relação a rCRS é descrita como 309.1C. Se uma citosina e uma timina forem inseridas, esta alteração é descrita como 309.1C e 309.2T, conforme Figura 12.

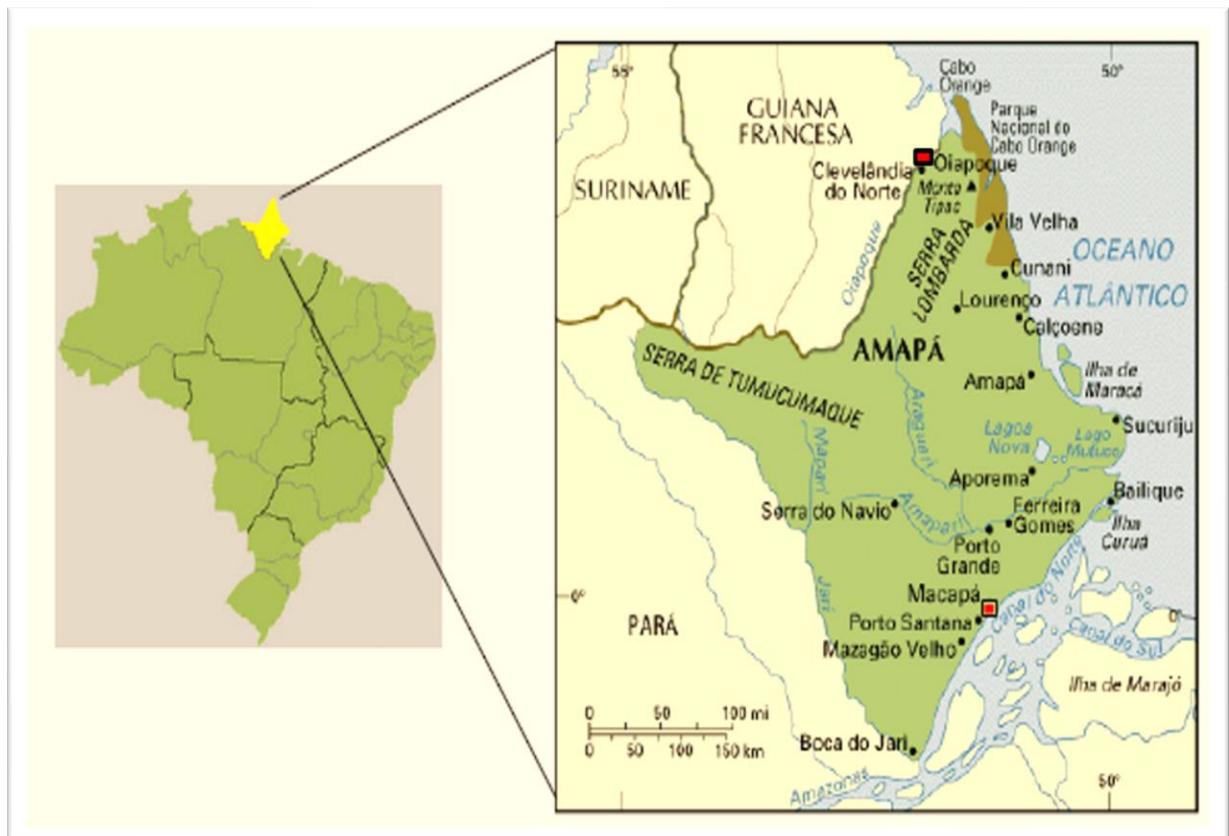
3 PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

As várias fases laboratoriais do procedimento experimental foram desenvolvidas no Instituto de Genética Forense do Maranhão (IGF-MA) e no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da Universidade Federal de Pernambuco.

Todas as amostras de DNA utilizadas no presente estudo foram previamente coletadas e processadas, sendo 55 indivíduos saudáveis não relacionados (25 homens e 30 mulheres, idade média de 22,3 anos, com intervalo de 18 a 80 anos de idade), moradores da cidade de Macapá ($0^{\circ}02'20''\text{N}; 51^{\circ}03'59''\text{W}$), Estado do Amapá, Norte do Brasil (FRANCEZ et al., 2011), e 26 amostras de indivíduos saudáveis, não aparentados (somente do sexo masculino), com idade a partir de 18 anos, moradores da cidade de Oiapoque ($3^{\circ}49'29''\text{N}, 51^{\circ}49'5''\text{W}$), Estado do Amapá (Nascimento, 2017).

Figura 14 – Localização do estado do Amapá e principais municípios com destaque para Oiapoque e Macapá.



Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/brasil-mapas/mapa-do-amapa.php> (acesso em 28/06/2017).

3.2 COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética da Faculdade UNIFAP com resolução favorável, que consta no Parecer Número 2.909.054, obtendo o número de CAAE 98117518.1.0000.0003 (Anexo A).

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de DNA utilizadas no presente estudo já haviam sido extraídas conforme procedimento a seguir. Para as amostras de Macapá, após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletadas amostras de 3 mL de sangue periférico de 55 indivíduos saudáveis não aparentados. O DNA genômico foi extraído usando o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook et al. (1989), e a quantificação do DNA foi feita com um espectrofotômetro NANODROP 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Para as amostras de Oiapoque, após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados suabes com raspado da mucosa oral de 26 de indivíduos saudáveis e não aparentados. O DNA genômico foi extraído usando o protocolo baseado na lise proteica através de proteinase K e purificação através de resina do tipo Chelex®100 a 5% (*Bio Rad*).

3.4 REAÇÃO DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE): Amplificação da região D-Loop (HV1 e HV2)

As amostras de DNA extraído foram submetidas à reação em cadeia da polimerase com emprego de *primers* específicos para as regiões hipervariáveis (HV1 e HV2) do DNA mitocondrial (mtDNA), conforme protocolo abaixo:

A amplificação do DNA tem como objetivo o aumento exponencial do número de cópias de uma região específica do DNA que se pretende estudar. A amplificação é alcançada pela adição de primers específicos e complementares às extremidades 3' de cada uma das sequências que delimitam o fragmento pretendido (K. MULLIS, F. FALOONA, S. SCHARF, et al., 1986).

Para amplificar as regiões controle HV1 e HV2 do mtDNA, foram utilizados dois pares de primers (L15997 e H16391; L048 e H408) (Tabela 1). A nomenclatura dos primers utiliza a cadeia correspondente ao primer, L para leve e H para pesada,

e a posição nucleotídica na extremidade 3'. O par de primers L15997 (Forward) e H16391(Reverse) permitiu à amplificação dos fragmentos entre as posições 16024 e 16365, enquanto o par de primers L048 (Forward) e H408 (Reverse) permitiu à amplificação dos fragmentos entre as posições 73 e 340.

Para a amplificação do material foi utilizado o Big Dye™ Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para cada reação de HV1 e HV2 foram adicionados 1,5uL do primer HV1 a 0.8uM, 1,5uL do primer HV2 a 0.8uM, 5.0uL de Master Mix BigDye Direct®, 0 a 2.5uL de água livre de DNA e até 3,5uL de DNA em uma placa de 96 poços. A amplificação ocorreu a 96°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por cinco minutos, 94°C por 30 segundos, 62°C por 45 segundos, 68°C por 45 segundos e um ciclo de 72°C por 2 minutos.

Tabela 1 – Primes utilizados para amplificação.

	Primer	Orientação	Sequência
HV1	L 15997	Direto	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'
	H 16391	Reverso	5'-GAGGATGGTGGTCAAGGGAC-3'
HV2	L 48	Direto	5'-CTCACGGGAGCTCTCCATGC-3'
	H 408	Reverso	5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3'

3.5 SEQUENCIAMENTO: PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento das regiões hipervariáveis HV1 e HV2 do mtDNA tem por objetivo determinar as bases nucleotídicas características de cada posição dentro destas regiões, o método utilizado nesta etapa foi o método de Sanger (SANGER et al.,1977). As amostras de DNA mitocondrial amplificadas foram submetidas ao sequenciamento com o emprego do *kit Big Dye XTerminator® v. 3.1 (Applied Biosystems)* e de *primers* forward e reverse para as regiões hipervariáveis (HV1 e HV2) do DNA mitocondrial. Para cada reação forward e reverse foi preparado por meio da adição de 2.0uL de Master Mix de sequenciamento BigDye™ Direct Sequencing Mix e 1.0uL de BigDye™ M13Forward Primer ou 1.0uL de BigDye™ M13 Reverse Primer ao material amplificado. A reação de sequenciamento ocorreu a 37°C por 15 minutos, 80°C por 2 minutos, 96°C por 1 minuto e 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

A remoção do excesso dos dNTPs, ddNTPs e outros interferentes como primers e sais livres foi obtido por meio do kit BigDye XTerminator™, composto por

dois reagentes principais: SAM™ (agente estabilizador) e XTerminator™ (responsável pela captura e imobilização dos componentes indesejados).

A cada amostra foram adicionados 45uL de SAM™ Solution e 10uL de XTerminator™ Solution. A placa foi agitada em vortex MixMate (Eppendorf) por 30 minutos a 2.000rpm e centrifugada em centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf) a 1.000xg por 2 minutos.

3.6 GENOTIPAGEM: ELETROFORESE CAPILAR

Após a purificação dos produtos de sequenciamento foi retirado 10 ul do sobrenadante da reação de sequenciamento, para a submissão à eletroforese capilar no equipamento Genetic Analyzer® ABI3500 (Applied Biosystems), após a montagem da placa se procedeu a eletroforese de acordo com as instruções a seguir: usou-se o Dye Set Z e o padrão de instalação de sequenciamento do Kit BigDye® *XTerminator* v. 3.1 para criar as informações de calibração espectral do BigDye® Direct. Os produtos de extensão dos primers forward e reverse foram analisados com as seguintes condições: polímero POP4-, matriz capilar 36cm, modelo de corrida rapidSeq36_POP4, arquivo de mobilidade KB_3500_POP4_BDTv3direct.mob.

A eletroforese capilar possibilitou a detecção dos fragmentos e a obtenção das sequências nucleotídicas geradas das regiões hipervariáveis do mtDNA em estudo. Durante este processo, ocorreu uma migração diferencial dos fragmentos de DNA amplificados em um capilar preenchido por uma matriz viscosa (polímero), a migração é promovida pela alta voltagem aplicada entre os tampões (cátodo e ânodo), de modo que as moléculas de DNA (que apresentam carga residual negativa) se deslocam a uma velocidade dependente da massa em sentido ao pólo positivo (ânodo). Os marcadores fluorescentes dos fragmentos são detectados após a excitação das moléculas por um laser e a luz emitida em determinado comprimento de onda é capturada por um detector de fluorescência que se traduz por uma análise computacional em picos no eletroferograma.

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

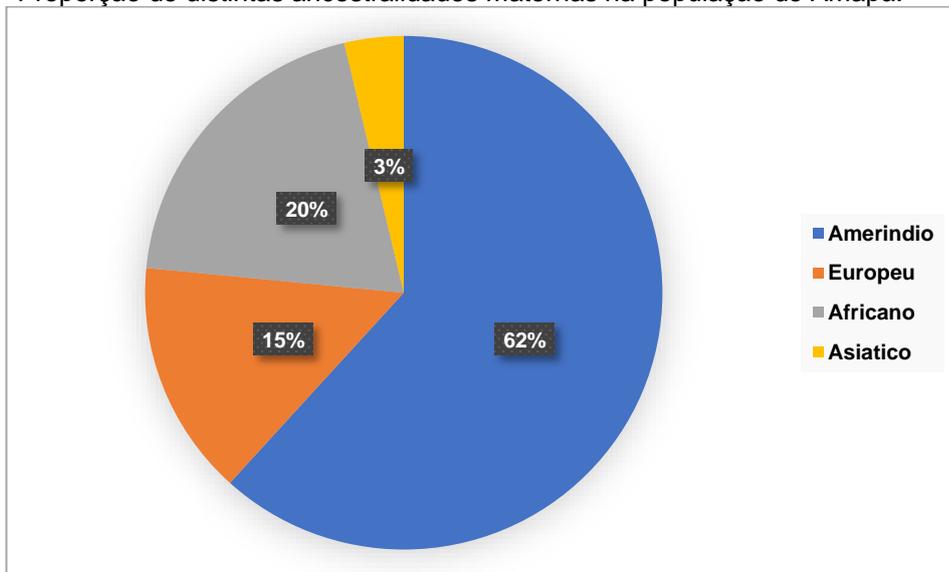
A leitura dos eletroferogramas obtidos para HV1 e HV2 foi realizada no SeqScape® v.3 (*Applied Biosystems*) por meio do alinhamento e comparação com a

Sequência de Referência (*Cambridge Reference Sequence - CRS*) descrita em Andrews et al. (1999), conforme recomendações de Wilson et al. (2002). Para garantir dados de alta qualidade, duas avaliações independentes de dados brutos foram realizadas. Os haplogrupos do DNA mitocondrial foram inferidos conforme predito na árvore filogenética obtida pelo Software EMMA (Estimating Mitochondrial Haplogroups usando a Maximum Likelihood Approach) fornecida pelo EMPOP v.3 disponível (<http://www.empop.org>). Os resultados foram plotados em um gráfico do Excel 2010.

4. RESULTADOS

Os haplótipos observados na amostra populacional do Estado do Amapá foram associadas aos respectivos haplogrupos. As proporções das distintas ancestralidades maternas foram determinadas por contagem direta, sendo tal distribuição ilustrada na Gráfico 1. A amostra estudada, composta por 81 indivíduos, foi classificada em aproximadamente 62% de origem ameríndia, 20% de origem africana, 15% de origem europeia e três amostras (3%) associadas a populações asiáticas ou eurásianas (haplogrupos M e G).

Gráfico 1 - Proporção de distintas ancestralidades maternas na população do Amapá.



Foram verificados 50 indivíduos (62%) com haplogrupos mitocondriais associados a populações ameríndias, sendo 29 indivíduos moradores da cidade de Macapá e 21 indivíduos de Oiapoque. O principal haplogrupo ameríndio observado na população estudada foi o haplogrupo C, encontrado em 23,46% das amostras do estado do Amapá, sendo evidenciado em 16,36% da população de Macapá e 38,46% da população do Oiapoque, seguido do haplogrupo A, com 18,52% no Estado. Dentre os 22 distintos sub-haplogrupos ameríndios evidenciados, o C1 foi o mais frequente, correspondendo a 8,64% da amostra populacional do Amapá.

Foram identificados 16 indivíduos (20%) com ancestralidade materna Africana na amostra investigada, sendo 14 indivíduos moradores da cidade de Macapá e dois indivíduos moradores da cidade de Oiapoque. Dentre os 15 distintos haplogrupos africanos, o L2b foi mais frequente e correspondeu a 2,47% do total de indivíduos. Os

demais haplogrupos apresentaram frequências iguais a 1,23%. Também foram observados 12 indivíduos (15%) com haplogrupos associados à ancestralidade materna Europeia, sendo 11 indivíduos moradores da cidade de Macapá e um indivíduo morador da cidade de Oiapoque. Dentre os oito haplogrupos verificados neste grupo, destacou-se o J1c2e2 (6,17%). Os demais haplogrupos apresentaram frequências iguais a 1,23%. (Tabela 2).

Tabela 2 - Haplogrupos e respectivas frequências na população do estado do Amapá, Brasil.

Haplogrupos Haplogrupos Ameríndios	Amapá		Macapá		Oiapoque	
	N	Frequência	n	Frequência	n	Frequência
A2	1	1,23%	1	1,82%	-	-
A2+(64)	3	3,70%	-	-	3	11,54%
A2+(64)+@153	3	3,70%	2	3,64%	1	3,85%
A2+(64)+16129	2	2,47%	1	1,82%	1	3,85%
A2+(64)+16189	1	1,23%	-	-	1	3,85%
A2ab	2	2,47%	2	3,64%	-	-
A2ac	2	2,47%	2	3,64%	-	-
A2ag	1	1,23%	-	-	1	3,85%
B2b+152	1	1,23%	1	1,82%	-	-
B4	6	7,41%	5	9,09%	1	3,85%
C1	7	8,64%	4	7,27%	3	11,54%
C1b2	3	3,70%	-	-	3	11,54%
C1b8	1	1,23%	1	1,82%	-	-
C1c+195	2	2,47%	1	1,82%	1	3,85%
C1d	4	4,94%	2	3,64%	2	7,69%
C1d+194	1	1,23%	-	-	1	3,85%
C1d1b	1	1,23%	1	1,82%	-	-
D1	4	4,94%	3	5,45%	1	3,85%
D1d2	1	1,23%	-	-	1	3,85%
D1e	2	2,47%	2	3,64%	-	-
D1f2	1	1,23%	1	1,82%	-	-
D4	1	1,23%	-	-	1	3,85%
Haplogrupos Africanos	N	Frequência	N	Frequência	N	Frequência
L1b	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L1c1a2	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L1c2a1a	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L1c3b1	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L2a1	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L2a1+143+16189+(16192)+@16309	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L2a1a2	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L2b	2	2,47%	1	1,82%	1	3,85%
L2c	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L3d	1	1,23%	1	1,82%	-	-
L3d1a1b	1	1,23%	1	1,82%	-	-

L3d2b	1	1,23%	-	1	3,85%
L3e1b2	1	1,23%	1	1,82%	-
L3e1d	1	1,23%	1	1,82%	-
L3e3	1	1,23%	1	1,82%	-
Haplogrupos Europeus	N	Frequênci a	n	Frequênci a	n
H	1	1,23%	1	1,82%	-
J1c	1	1,23%	1	1,82%	-
J1c2e2	5	6,17%	5	9,09%	-
J2a1a1a	1	1,23%	1	1,82%	-
J2b1c1	1	1,23%	-	-	1
K1a	1	1,23%	1	1,82%	-
R	1	1,23%	1	1,23%	-
R+16189	1	1,23%	1	1,23%	-
Haplogrupos Asiáticos	N	Frequênci a	n	Frequênci a	n
M	2	2,47%	1	1,82%	1
G1a1	1	3,85%	-	-	1

Comparando-se os percentuais de ancestralidade Ameríndia, Europeia e Africana nas amostras das duas localidades investigadas, observou-se percentuais significativamente maior de contribuição Ameríndia e menor de contribuição Europeia e Africana na cidade de Oiapoque em relação à cidade de Macapá ($\chi^2=8,3031$; GL=2, $p = 0,0157$).

Tabela 3 – Comparativo entre os percentuais de ancestralidade materna dos grupos étnicos parentais para as cidades de Macapá e Oiapoque.

Ancestralidade	Macapá (%)	Oiapoque (%)	TOTAL
Indígena	29 (53,7%)	21 (87,5%)	50 (64,1%)
Europeia	11 (20,4%)	1 (4,2%)	12 (15,4%)
Africana	14 (25,9%)	2 (8,3%)	16 (20,5%)
Total	54 (100,0%)	24 (100,0%)	78 (100,0%)

Resultados dos testes de qui-quadrado de partição ($\chi^2=8,3031$; GL=2, $p = 0,0157$). OBS: três indivíduos pertencentes aos haplogrupos M e G (associados a populações Asiáticas e Eurasianas) foram excluídos desta análise.

Tabela 4 - Proporção de ancestralidade ameríndia, europeia e africana em populações das regiões brasileiras comparativo com a população do estado do Amapá, estimadas através de estudos com mtDNA.

Ancestralidade	Amapá					Regiões Brasileiras				
	¹ Amapá (%)	¹ Macapá (%)	¹ Oiapoque (%)	² Mazagão (%)	³ Curiaú (%)	⁴ Norte (%)	⁴ Nordeste (%)	⁵ Centro-Oeste (%)	⁴ Sudeste (%)	⁴ Sul (%)
Ameríndia	50 (61,7%)	29 (52,7%)	21 (80,8%)	19 (57,6%)	22(47,3%)	26 (54%)	11 (22%)	102 (33,33%)	33 (34%)	11(22%)
Europeia	12 (14,8%)	11 (20,0%)	1 (3,8%)	1,0 (3%)	(0,0%)	15 (31%)	17 (34%)	-	31 (31%)	33(66%)
Africana	16 (19,8%)	14 (25,5%)	2 (7,7%)	13 (39,4%)	23(52,3%)	7,0 (15%)	22 (44%)	150 (49,02%)	34 (35%)	6,0 (12%)
Asiática	3 (3,7%)	1(1,8%)	2 (7,7%)	-	-	-	-	-	-	-
Outros	-	-	-	-	-	-	-	54 (17,65%)	-	-
Total	81 (100,0%)	55 (100,0%)	26 (100,00%)	33 (100%)	45 (100%)	48 (100%)	50 (100%)	306 (100%)	98 (100%)	50 (100%)

Fonte: 1. Presente Estudo; 2. Carvalho-Bruno Maia et al., 2008 (comunidade afro-descendente da Amazônia); 3. Ribeiro-dos-Santos et al. 2002 (área de quilombo); 4. Alves-Silva et al., 2000. 5. Freitas, Jorge M. et al., 2019.

Todos os haplogrupos obtidos das amostras do Amapá estão listados na Tabela 2. Para os 81 indivíduos analisados, foram identificados 47 haplótipos distintos. Sendo, 32 seqüências ocorreram apenas uma vez, 2 haplótipos foram compartilhados sete vezes, 3 foram compartilhados três vezes e 4 foram compartilhados duas vezes. O haplótipo mais frequente (16126C 16223T 16298C 16325C 16227T 73G 249delA 263G 290delA 291delA) foi observado em 8,64% da amostra populacional.

Tabela 5: Diversidade de haplotipos das regiões HV1 e HV2 do DNA mitocondrial, localizado entre as posições 16024-16365 e 73-340, respectivamente em 81 indivíduos do estado do Amapá, Brasil. N = Número de indivíduos.

	HV1+HV2	HV1+HV2	HV1+HV2
	Amapá	Macapá	Oiapoque
N	81	55	26
Número de haplótipos observados	47	37	19
Número de haplótipos únicos	32	28	15

5. DISCUSSÃO

De acordo com Callegari-Jacques e Salzano (1999), dos imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1972, 58% eram europeus, 40% eram africanos e 2% eram asiáticos. O haplogrupo C foi descrito como o mais comum em outras populações da região Norte do Brasil por diferentes autores (PENA; CARVALHO-SILVA; ALVES-SILVA; PRADO, 2000)

Os resultados obtidos para as duas cidades em estudo podem ser explicados pela dinâmica de colonização do Amapá, com maior fixação de europeus e africanos nas localidades próximas ao rio Amazonas, notadamente em Macapá, capital do Estado do Amapá. Na cidade de Oiapoque, dada sua localização no extremo norte do estado, apresentou uma menor contribuição dos grupos parentais (Africanos e Europeus). De acordo com o IBGE (2018), dos 26.627 mil habitantes do município de Oiapoque, mais de 30% são indígenas, sendo este o maior percentual de indígenas dentre os municípios Amapaenses.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com outras populações, observamos que os estudos sobre evolução humana realizados através da análise do mtDNA identificaram que as linhagens matrilineares estão relacionadas com regiões geográficas específicas, o que possibilita a reconstrução da história demográfica, migrações e determinações da ancestralidade genética de indivíduos e grupos humanos (HUNEMEIER et al., 2007; BOBILLO et al., 2010; PANETO et al., 2011).

Segundo ALVES-SILVA et al., 2000 ao analisar cada região brasileira separadamente, foi observa-se a predominância da matrilinearidade ameríndia 54% na região Norte, onde a presença indígena é elevada, no Nordeste a predominância de linhagem de origem africana 44%, na região Sudeste, apresentando a distribuição destas três linhagens de forma uniforme, sendo a linhagem de origem africana um pouco mais predominante 34%, na região Sul diferente das demais regiões, apresentando uma predominância de indivíduos de origem europeia 68,3%, por ter recebido uma maior quantidade de imigrantes vindos da Europa, principalmente Alemanha, Itália e Portugal (PALENCIA et al., 2010).

As mulheres portuguesas vieram ao Brasil em menor número, mas sua presença foi notada inicialmente no século XVI. Também em meados do século XVI os africanos começaram a ser introduzidos no Brasil, trazidos como escravos. Registros históricos sugerem que entre 1551 e 1850, aproximadamente 3,5 milhões

de africanos chegaram ao Brasil (SALZANO & FREIRE-MAIA 1967; RIBEIRO 1995). Aproximadamente seis milhões de imigrantes, no século XIX, chegaram oficialmente ao Brasil (IBGE, 2000), dentre eles: portugueses e italianos, espanhóis, sírios, libaneses e japoneses (CARVALHO-SILVA et al., 2001).

Dentre os haplótipos europeus encontrados no Brasil, houve a predominância daqueles pertencentes aos haplogrupos H, T e J. Entre os haplótipos africanos, predominaram os haplogrupos L3e e L1c. Já na linhagem ameríndia foram observados haplótipos pertencentes aos haplogrupos A, B, C e D (PENA et al., 2000).

Um dos resultados mais interessantes deste estudo foi a identificação de haplogrupos asiáticos dentre as amostras estudada para o estado do Amapá. Foram identificados dois indivíduos do haplogrupo M (um na cidade de Oiapoque e um na cidade de Macapá) e um indivíduo do Haplogrupo G, na cidade de Oiapoque. Estes haplogrupos são referidos por diferentes autores como haplogrupos de origem asiática, embora não seja consenso em relação ao haplogrupo M.

O Haplogrupo M (mtDNA) está presente em todos os continentes e juntamente com seu irmão o macro-haplogrupo N é um descendente do haplogrupo L3, e todos os haplogrupos mitocondriais considerados nativos fora da África são descendentes desses dois macro-haplogrupos (METSPALU, M; et al., 2004, FREGEL, R. et al., 2015). Existem duas hipóteses da origem do haplogrupo M:

a) Hipótese asiática: todas as linhagens indígenas encontradas fora da África pertencem ao haplogrupo M ou haplogrupo N. As maiores frequências mundiais do macro-grupo M são observadas na Ásia, especificamente em Bangladesh, China, Índia, Japão, Coreia, Nepal e Tibete, onde as frequências variam de 60% a 80%. A frequência total de subclados M é ainda maior em algumas populações da Sibéria ou das Américas, mas essas pequenas populações tendem a exibir fortes efeitos de deriva genética, e frequentemente seus vizinhos geográficos exibem frequências muito diferentes. (RAJKUMAR; et al., 2005; THANGARAJ et al., 2006; MARUYAMA, S. et al., 2003).

b) Hipótese africana: De acordo com essa teoria, os haplogrupos M e N surgiram de L3 em uma população da África Oriental que fora isolada de outras populações africanas. Os membros dessa população estavam envolvidos na migração para fora da África e só possuíam linhagens M e N. Com a possível exceção do haplogrupo M1, todos os outros clados M e N na África foram perdidos pela deriva genética (QUINTANA; et al., 1999; KIVISILD, T. et al., 2003)

O haplogrupo G é encontrado no leste asiático (UMETSU, K. et al., 2005) em sua maior frequência em populações indígenas das terras ao redor do Mar de Okhotsk (Volodko, N. V. et al., 2008). É um dos haplogrupos de mtDNA mais comuns entre os povos Ainu, japoneses, mongóis e tibetanos mais comuns (assim como entre os povos da cultura pré-histórica Jomon em Hokkaido). É também encontrado em menor frequência entre muitas outras populações do leste da Ásia, Ásia Central, Bangladesh, Sri Lanka e Nepal (UMETSU, K. et al., 2005; ASARI, M. et al., 2007; RANAWEERA, L. et al., & LERTRIT, P., 2013). Porém, diferentemente de outros haplogrupos de DNA mitocondrial típicos de populações do nordeste da Ásia, como o haplogrupo A, o haplogrupo C e o haplogrupo D, o haplogrupo G não foi encontrado entre os povos indígenas das Américas, G1a foi encontrado em amostras da China (Daur, Hui, Cazaque, Sarikoli, (PENG, M-S *et al.*, 2018) coreano, Manchu, Yi, Jino, Yunnan Dai, Jiangxi Han, (Kong, Q-P *et al.*, 2011) e uma amostra da população geral da cidade de Shenyang), Tajiquistão (Pamiris) (PENG, M-S *et al.*, 2018), Japão, Coréia, Vietnã e centro da Sibéria (Yakut, Altai-kizhi).

A presença de haplogrupos asiáticos no estado do Amapá, particularmente na cidade de Oiapoque, região de fronteira com a Guiana Francesa, pode ser explicada tanto pela presença de migrantes do oriente médio (Sírios, Judeus e Libaneses) para diferentes localidades da região Norte Brasileira, bem como, pela migração no início do século XX de japoneses para a região Amazônica, a exemplo de cidades como Santarém, Igarapé Açu e Castanhal no estado do Pará, mais também pode estar associada à importante presença de asiáticos na Guiana Francesa, tendo em vista a forte presença de Chineses, Vietnamitas, Indonésios, Indianos, entre outros grupos étnicos asiáticos, que habitam este departamento ultramarino Francês.

A proporção de ancestralidade ameríndia, europeia e africana estimadas através do mtDNA para as populações miscigenadas das duas cidades estudadas foram consideravelmente distintas, Tabela 4, o que já era esperado, pois as regiões se distinguem em muitos aspectos a capital Macapá situa-se no sudeste do estado, no litoral do rio Amazonas, é uma cidade bastante miscigenada tem um enorme contingente de pessoas de outros estados da federação e dentro da área urbana tem populações remanescente de quilombos. Oiapoque localizado no extremo norte do estado do Amapá fica a 600 km da capital é uma região com contexto de fronteira internacional, a única fronteira do Brasil com a Europa, apresenta considerável

população ameríndia e intenso fluxo migratório nacional e internacional, particularmente em função da atividade de mineração de ouro nesta região.

Vale destacar que neste estudo considerou-se a população do Amapá os indivíduos de ambas as cidades investigadas (Macapá e Oiapoque), entretanto, como pode ser percebido, o perfil de haplogrupos mitocondriais observados nestas duas localidades foi muito distinto, particularmente em função de uma elevada concentração de ancestralidade ameríndia nas amostras provenientes de Oiapoque. Dada as peculiaridades da formação da cidade de Oiapoque e da marcante presença indígena nesta localidade até os dias de hoje, o que não é observado na mesma intensidade em outros municípios do Amapá. É mais provável que os resultados obtidos para a cidade de Macapá reflitam melhor o observado para o estado do Amapá, do que quando se analisa as amostras das duas localidades em conjunto. Para se chegar a um resultado mais fidedigno em relação à contribuição materna para a formação da atual população do Amapá, seria interessante se efetuar uma amostragem proporcional de todos os municípios do estado. De qualquer maneira, vale lembrar, que a população da região metropolitana de Macapá e Santana, representa mais de 80% do contingente populacional do estado do Amapá, o que permite, extrapolar os resultados obtidos para a cidade de Macapá como parâmetro para o estado como um todo.

6 CONCLUSÃO

Até ao momento, em relação à população miscigenada do estado do Amapá, especificamente as duas cidades Macapá e Oiapoque, não existiam estudos na literatura referentes a análises das regiões HV1 e HV2 do DNA mitocondrial para verificar a ancestralidade materna dessa população. Possivelmente por causa da maior complexidade do método quando comparado com a análise de DNA nuclear e por ser ainda um procedimento laborioso. Entre os 81 indivíduos analisados foram encontrados 47 haplótipos diferentes. A população do estado do Amapá apresentou percentual de origens predominantemente ameríndia (62%), seguida de africana (20%), europeia (15%) e asiática (3%). Comparando estes resultados com as outras populações das cinco regiões do Brasil reforça as diferenças entre as proporções dos haplogrupos observados, combinando com que se sabe sobre o período de colonização do Brasil, especificamente a região Norte.

A metodologia laboratorial utilizada no estudo do mtDNA mostrou-se adequada e eficiente para a realização deste trabalho, uma vez que permitiu a obtenção de sequências de alta qualidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. **DNA sequencing technologies**. Nature Education 1(1):193, 2008.
- AFONSO, C. A. **Diversidade mitocondrial no Sudão**: aplicações à genética forense e à genética populacional. 188 f. Tese (Mestrado em Medicina Legal.). Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto, Porto, 2008.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K e WALTER P. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2004.
- ALLARD, M.W. et al. **Evaluation of variation in control region sequences for Hispanic individuals in the SWGDAM mtDNA data set**. J Forensic Sci., v.51, n.5, p.566-573, 2006.
- ALMEIDA, C. S.; RAUBER, A. L. **Oiapoque, aqui começa o Brasil**: a fronteira em construção e os desafios do desenvolvimento regional. REDES: Revista do Desenvolvimento Regional, ISSN-e 1982-6745, Vol. 22, Nº. 1, 2017, págs. 474-493, 2017.
- ALONSO, A., SALAS, A., ALBARRÁN, C., ARROYO, E., CASTRO, A., CRESPILO, M., DI LONARDO, A. M., et al. **“Results of the 1999-2000 collaborative exercise and proficiency testing program on mitochondrial DNA of the GEP-ISFG: an interlaboratory study of the observed variability in the heteroplasmy level of hair from the same donor”** Forensic science international, 125(1), 1–7, 2002.
- ALVAREZ, J.C. **Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set**. Legal Medicine, v.9, n.6, p.293-304, jul.2007.
- ALVES-SILVA, J.; SILVA, S. M.; GUIMARÃES, P. E.; FERREIRA, A. C.; BANDELT, H. J.; PENA, S. D.; PRADO, V. F. **The ancestry of Brazilian mtDNA lineages**. Am J Hum Genet, v. 67, p. 444–461, 2000.
- ALVES-SILVA, J.; SILVA, S. M.; GUIMARÃES, P. E.; FERREIRA, A. C.; BANDELT, H. J.; PENA, S. D.; PRADO, V. F. **The ancestry of Brazilian mtDNA lineages**. Am J Hum Genet, v. 67, p. 444–461, 2000.
- ANDERSON, S. et al. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome**. Nature, v. 290, p.457-465, 1981.
- ANDREWS, RICHARD. **Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA**. Nature Genetics, v.23, p.146-147, 1999.
- ASARI, M., UMETSU, K., ADACHI, N., AZUMI, J., SHIMIZU, K., & SHIONO, H. **Utility of haplogroup determination for forensic mtDNA analysis in the Japanese population**. Legal Medicine, 9(5), 237–240, 2007.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York, Chapman & Hall. xiv+511p, 1994.

BALOGH, M. K., BURGER, J., BENDER, K., SCHNEIDER, P. M., & Alt, K. W. **“STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper”** Forensic Science International, 137(2-3), 188–195, 2003.

BANDELT, H. J.; ACHILLI, A.; KONG, Q. P.; SALAS, A.; LUTZ-BONENGL, S.; SUN, C.; ZHANG, Y. P.; TORRONI, A.; YAO, Y. G. **Low "penetrance" of phylogenetic knowledge in mitochondrial disease studies.** Biochem Biophys Res Commun, v. 333, n. 1, p. 122-130, 2005.

BEDOYA, G.; MONTOYA, P.; GARCÍA, J.; SOTO, I.; BOURGEOIS, S.; CARVAJAL, L.; LABUDA, D.; ALVAREZ, V.; OSPINA, J.; HEDRICK, P.W.; RUIZ-LINARES, A. **Admixture dynamics in Hispanics:** a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. Proc Natl Acad Sci USA 103:7234–7239, 2006.

BEHAR, DM; VILLEMS R; SOODYALL, H; BLUE-SMITH, J; PEREIRA, L; METSPALU, E; SCOZZARI, R; MAKKAN, H; TZUR, S; COMAS, D; BERTRANPETIT, J; QUINTANA-MURCI, L; TYLER-SMITH, C; WELLS, RS; ROSSET, S; GEOGRAPHIC CONSORTIUM. **The dawn of human matrilineal diversity.** Am J Hum Genet 82:1-11, 2008.

BENDALL, K. E.; MACAULAY, V. A.; BAKER, J. R.; SYKES, B. C. **Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region.** American Journal of Human Genetics, v. 59, p. 1276–1287, 1996.

BENDALL, K. E.; SYKES, B. C. **Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region.** American Journal of Human Genetics, v. 57, p. 248–256, 1995.

BETHELL, L. **Nota sobre as populações americanas às vésperas das invasões europeias.** In: Bethell L (ed) América Latina colonial. São Paulo – SP: Editora Universidade de São Paulo, 1997.

BOBILLO M.C, ZIMMERMANNB., SALA A., HUBER G., ROCK A., BANDELT H.J., 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. Jul; 124(4):263-8, 2010.

BOGENHAGEN D. AND CLAYTON D.A. **The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells.** Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. J Biol Chem. 249:7991-7995, 1974.

BRANDSTÄTTER, A.; PARSON, W. **Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts—a matter of the amplification strategy?** International Journal of Legal Medicine, v. 117, p. 180–184, 2003.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. **Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.** P.N.A.S., v. 76, p. 1982–1987, 2003.

BUDOWLE, B., ALLARD, M. W., WILSON, M. R., & CHAKRABORTY, R. **Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations** Annual review of genomics and human genetics, 4, 119–141, 2003.

BUTLER, J. M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing pp.405-444**. Academic Press, Virginia, 2011.

BUTLER, J. M. **Advanced Topics in Forensic DNA typing: Methodology**. San Diego: Academic Press; cap. 14, p. 405-456, 2012.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA typing;Biology, technology and genetics of STR markers**. 2.ed. Elsevier. 660p, 2005.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SALZANO, F. M. **Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects**. Ciênc Cult, v. 51, p. 166–174, 1999.

CALLOWAY, C. D.; REYNOLDS, R. L.; HERRIN, G. L.; ANDERSON, W. W. **The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age**. American Journal of Human Genetics, v. 66, p. 1384–1397, 2000.

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

CARRACEDO A., SANCHEZ-DIZ P. **Forensic DNA-typing technologies: a review**. *Methods Mol Biol*; 297:1-12, 2005.

CARRACEDO, A.; BÄR, W.; LINCOLN, P.; MAYR, W.; MORLING, N.; OLAISEN, B.; SCHNEIDER, P.; BUDOWLE, B.; BRINKMANN, B.; GILL, P.; HOLLAND, M.; TULLY, G.; WILSON, M. **DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing**. *Forensic Sci Int*, v. 110, p. 79–85, 2000.

CARVALHO, BRUNO MAIA; MARIA CÁTIRA, BORTOLINI; SIDNEY EMANUEL BATISTA DOS SANTOS AND ÂNDREA KELLY CAMPOS RIBEIRO-DOS-SANTOS. **Mitochondrial DNA mapping of social-biological interactions in Brazilian Amazonian African-descendant populations**, *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1, 12-22, 2008.

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.

CHAN DC. **"Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development"**. *Cell* 125 (7): 1241-1252, 2006

CHEN, Y.S.; TORRONI, A.; EXCOFFIER, L.; SANTACHIARA-BENERECETTI, A.S.; WALLACE, D.C. **Analysis of mtDNA Variation in African Populations Reveals the Most Ancient of All Human Continent-Specific Haplogroups**.*American Journal of Human Genetics* 57: 133-149,1995.

COBLE, M. D., et al. **Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis.** PLoS One, 4(3): 4838, 2009.

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

CUMMINS, J. M.; WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. **Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo.** Zygote, v. 6, n. 3, p. 213222, Aug 1998.

DIMAURO S.; SCHON E.A. **Mitochondrial respiratory-chain diseases.** N Engl J Med 348: 2656-68, 2003.

DIMAURO, S., & DAVIDZON, G. **“Mitochondrial DNA and disease”** Annals of medicine, 37(3), 222–32, 2005.

ESTEVEZJ. **The Sanger (chain-termination) method for DNA sequencing.** Website last modified on December 19, 2012. Disponível em: 15 abr. 2019 <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-sequencing.svg?uselang=pt-br>>

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION - FBI. **Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation.** Forensic Science Communications, v. 5, n. 2, 2003. Disponível em:< <https://archives.fbi.gov/archives/aboutus/lab/forensic-science-communications/fsc/april2003/swgdammitodna.htm> >. Acessado:12 nov. 2018.

FINSTERER J. **Mitochondriopathies.** Eur J. Neurol 11:163-86, 2004.

FOSWIKI. **Human mtDNA migrations. 2016.** Disponível em: <<http://www.mitomap.org/foswiki/pub/MITOMAP/MitomapFigures/WorldMigrations2012.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

FRANCEZ, P. A. C.; RODRIGUES, E. M. R.; FRAZÃO, G. F.; BORGES, N. D.R. and SANTOS, S. E. B. **Allelic frequencies and statistical data obtained from 12 codis STR loci in an admixed population of the Brazilian Amazon, Ribeirão Preto, Genetics and Molecular Biology, 34, 1, 35-39, 2011.**

FREGEL, R., CABRERA, V., LARRUGA, J. M., ABU-AMERO, K. K., & GONZÁLEZ, A. M. **Carriers of Mitochondrial DNA Macrohaplogroup N Lineages Reached Australia around 50,000 Years Ago following a Northern Asian Route.** PLOS ONE, 10(6), e0129839, 2015.

FREITAS, JORGE M.; FASSIO, LEVY H.; BRAGANHOLI, DANILO F.; CHEMALE, GUSTAVO, **Mitochondrial DNA control region haplotypes and haplogrupo diversity in a sample from Brasília, Federal District, Brazil. FSI: Genetics, vol.40, pp. 228-230, 2019.**

GARRIDO, R.G & RODRIGUES, E.L. **Ciência Forense: da cena do crime ao laboratório de DNA. - 1ª Edição, Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014.**

GILES, R.E., BLANC, H., CANN, H.M., WALLACE, D.C. **Inheritance of Human Mitochondrial DNA**. Proceeding of the National Academy of Science USA, 77: 6715-6719, 1980.

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

GONZÁLEZ, A. M., LARRUGA, J. M., ABU-AMERO, K. K., SHI, Y., PESTANO, J., & CABRERA, V. M. **Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa**. BMC Genomics, 8(1), 223, 2007.

GUSMÃO, L.; ALVES, C. - **Marcadores dos cromossomas sexuais**. Revelância na identificação genética. Em PINHEIRO, M. F. (Ed.) - Genética forense: perspectivas da identificação genética. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2010. p. 103–138.

HANDLEY, L.J.L.; MANICA, A.; GOUDET, J. and BALLOUX, F. **Going the distance: Human population genetics in the clinal world**. Trends Genet 23:432-439, 2007.

HARRISON, R. G. **Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology**.Tree 4:6-11, 1989.

HOLLAND, M. M.; CAVE, C. A.; HOLLAND, C. A.; BILLE, T. W. **Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks**. Croatian Medical Journal, v. 44, p. 264-272, 2003.

HOLLAND, M. M.; FISHER, D. L.; MITCHELL, L. G.; RODRIGUEZ, W. C.; CANIK, J. J.; MERRIL, C. R.; WEEDN, V. W. **Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from The Vietnam War**. J Forensic Sci, v. 38, p. 542-553, 1993.

HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. **Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework**. Forensic Sci. Rev., v. 11, p. 22-50, 1999.

HOLLAND, MM; et al. **Mitochondrial DNA sequence analysis of human remains**. Crime lab Digest, 22: 109, 1995.

HUDJASHOV, G.; KIVISILD, T.; UNDERHILL, P. A.; ENDICOTT, P.; SANCHEZ, J. J.; LIN, A. A.; SHEN, P.; OEFNER, P.; RENFREW, C.; VILLEMS, R. **Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis**. Proc Natl Acad Sci US A, v. 104, n. 21, p. 8726-8730, 2007.

HUNEMEIER T., CARVALHO C., MARRERO A. R., SALZANO F.M., JUNHO PENA S.D., BORTOLINI M.C. **Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data**. Am J Phys Anthropol. Jun;133(2):854-67, 2007.

IBGE. (2000). **BRASIL: 500 anos de povoamento**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico 2018**. Disponível em: < [http:// www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ap/oiapoque.html?](http://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ap/oiapoque.html?) >. Acessado em 06 mai. 2019

IRWIN, J.; SAUNIER, J.; NIEDERSTA"TTTER, H.; STROUSS, K.; STURK, K.; DIEGOLI, T.; BRANDSTA"TTTER, A.; PARSON, W.; PARSONS, T. **Investigation of point heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from over 5000 global population samples**. *J Mol Evol*, v. 68, p. 516–527, 2009.

IVANOV, P. L. et al. **Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II**. *Nat. Genet.*, v.12, n. 4, p. 417-20, 1996.

JOBLING, M.A., HURLES, M. E., TYLER-SMITH, C. **Human evolutionary genetics:origins, peoples and disease**. Garland Science.4-17p, 2004.

Johnson, A., & Johnson, K. A. (2001) **"Fidelity of nucleotide incorporation by human mitochondrial DNA polymerase"** *The Journal of biological chemistry*, 276(41), 38090–6.

KIVISILD, T., ROOTSI, S., METSPALU, M., MASTANA, S., KALDMA, K., PARIK, J., VILLEMS, R. **The Genetic Heritage of the Earliest Settlers Persists Both in Indian Tribal and Caste Populations**. *The American Journal of Human Genetics*, 72(2), 313–332, 2003.

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

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.

KLUG, Willian et al. **Conceitos de Genética**. São Paulo: Artmed, 2010. 863p

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.

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., SUN, C., WANG, H.-W., ZHAO, M., WANG, W.-Z., ZHONG, L., ZHANG, Y.-P. **Large-Scale mtDNA Screening Reveals a Surprising Matrilineal Complexity**

in East Asia and Its Implications to the Peopling of the Region. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1): 513–522, 2011.

LADOUKAKIS E. D.; AND ZOUROS E., “**Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: Rules and exceptions,**” *J. Biol. Res.*, vol. 24, pp. 1–7, 2017.

LEMBRING, M, "**Application of Mitochondrial DNA Analysis in Contemporary and Historical Samples,**" Uppala Universitet, vol. 62, 2013.

LEVIN, B.C.; HANCOCK, D.K.; HOLLAND, K.A.; CHENG, H.; RICHIE, K.L. **Human mitochondrial DNA -Amplification and Sequencing Standard Reference Materials – SRM 2392 and SRM 2392-I.** NIST SP 260-155, NIST, Gaithersburg, MD, 2003.

LEWIS R. **Genética Humana: Conceitos e Aplicações.** 5^a ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan; 2004. p.

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 Sci. Int.*, v. 113, p. 97-101, 2000.

TANAKA, M.; AND OZAWA, T., “**Strand Asymmetry in Human Mitochondrial DNA Mutations,**” *Genomics*, vol. 22, pp. 327-335, 1994.

MACAULAY V. P.; CARRACEDO A. **The Making of the African mtDNA Landscape.** *Am J Hum Genet*, 71: 1082-1111, 2002.

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

MARQUES, M.C. **Interpretation guidelines of mtDNA control region sequence electropherograms in forensic genetics.** *Methods Mol Biol.*, v.830, p.301-319, 2012.

MARUYAMA, S., MINAGUCHI, K., & SAITOU, N. **Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic analysis of mtDNA lineages in the Japanese population.** *International Journal of Legal Medicine*, 117(4), 218–225, 2003.

MELTON, T. **Mitochondrial DNA heteroplasmy.** *Forensic Science Reviews*, v. 16, p. 1-20, 2004.

METSPALU, M; KIVISILD, T; METSPALU, E; PARIK, J; HUDJASHOV, G; KALDMA, K; SERK, P; KARMIN, M; BEHAR, DM; GILBERT, M THOMAS P; ENDICOTT, PHILLIP; MASTANA, SARABJIT; PAPIHA, SURINDER S; SKORECKI, KARL; TORRONI, ANTONIO; VILLEMS, RICHARD. "**Most of the extant mtDNA boundaries in South and Southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans**" *BMC Genetics*. 5: 26, 2004.

METSPALU, M; KIVISILD, T; METSPALU, E; PARIK, J; HUDJASHOV, G; KALDMA, K; SERK, P; KARMIN, M; BEHAR, DM; GILBERT, M THOMAS P; ENDICOTT, PHILLIP; MASTANA, SARABJIT; PAPIHA, SURINDER S; SKORECKI, KARL; TORRONI, ANTONIO; VILLEMS, RICHARD. **"Most of the extant mtDNA boundaries in South and Southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans"**. BMC Genetics. 5: 26, 2004.

MICHAELS GS, HAUSWIRTH WW AND LAIPIS PJ. **Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells**. Dev Biol 94: 246-251, 1982.

MIN-SHENG PENG, WEIFANG XU, JIAO-JIAO SONG. **"Mitochondrial genomes uncover the maternal history of the Pamir populations."** European Journal of Human Genetics, 2018.

MONNAT, R. J., LOEB, L.A. Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82 2895–99, 1985.

MORAIS, P.D. and MORAIS, J.D. **O Amapá em Perspectiva: uma Abordagem histórico-geográfica**. JM Editora Gráfica, Macapá, 2005.

MORAIS, P.J.S. **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de Cabo Verde residentes em Lisboa**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular da Saúde) - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Escola Superior de Saúde Egas Moniz: Portugal, 2013.

MORITZ, C.; T. E. DOWLING & W. M. BROWN. **Evolution of animal mitochondrial DNA**. Relevance for population biology and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 269-292, 1987.

NARDIN R.A.; JOHNS D.R. **Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease**. Muscle Nerve 24: 170-91, 2001.

NAUE J.; HÖRER S.; SÄNGER, T., et al., **"Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA,"** Mitochondrion, vol. 20, pp. 82–94, 2015.

NONIN-LECOMTE S.; DARDEL F.; AND LESTIENNE P., **"Self-organisation of an oligodeoxynucleotide containing the G- and C-rich stretches of the direct repeats of the human mitochondrial DNA,"** Biochimie, vol. 87, pp. 725–735, 2005.

NUSSBAUM, R.; MCINNES, R.; WILLARD, H. - **Human Genetic Diversity: Mutation and Polymorphism**. Em NUSSBAUM, R.; MCINNES, R.; WILLARD, H. (Eds.) - Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 8 a edição. Canadá: Elsevier, 2015. p. 43–55.

OLIVEIRA MC e MENCK CFM. **Biologia Molecular e Evolução**. Universidade de São Paulo – USP. Holos Editora, 2002.

PAKENDORF, B.; STONEKING, M. **Mitochondrial DNA and human evolution**. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v. 6, p. 165-183, 2005.

PAKENDORF, B.; STONEKING, M. **Mitochondrial DNA and human evolution**. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, v. 6, p. 165-183, 2005.

PALENCIA, L.; VALVERDE, L.; ALVAREZ, A.; CAINÉ, L. M.; CARDOSO, S.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; PINHEIRO, M. F.; DE PANCORBO, M. M. **Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input**. *Int J Legal Med*, v. 124, n. 4, p. 331-336, 2010.

PANETO G.G., KOHNEMANN S., MARTINS J. A., CICARELLI R.M., PFEIFFER H. **A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups**. *Mitochondrion*. Mar;11(2):296-302, 2011.

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.

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.

PARSON, T.J. et al. **EMPOP – the mtDNA population database-concept for a new generation, high-quality mtDNA database**. *Forensic Genetics*, v.10, p.106-108, 2004.

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

PARSON, W.; GUSMAO, L.; HARES, D. R.; IRWIN, J. A.; MAYR, W. R.; MORLING, N.; POKORAK, E., PRINZ, M.; SALAS, A.; SCHNEIDER, P. M.; PARSONS, T. J. **DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing**. *Forensic Science International: Genetics*, v. 13, p. 134-142, 2014.

PENA, S. D. J. **Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA**. In: *Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação*. Parcerias Estratégicas, v. 20, p. 447 - 460, 2005.

PENA, S. D. J.; CARVALHO-SILVA, D. R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V. F.; SANTOS, F. R. **Retrato Molecular do Brasil**. *Ciência hoje*, v. 27, n. 159, p. 16 a 25, 2000.

PENG, M.-S., XU, W., SONG, J.-J., CHEN, X., SULAIMAN, X., CAI, L., ZHANG, Y.-P. **Mitochondrial genomes uncover the maternal history of the Pamir populations**. *European Journal of Human Genetics*, 26(1), 124–136, 2017.

PIKO L. AND MATSUMOTO L. **Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg.** Dev Biol 49: 1-10, 1976.

PINHEIRO, M. F. - **Algumas perspectivas da identificação genética.** Em PINHEIRO, M. F. (Ed.) - Genética forense: perspectivas da identificação genética. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2010. p. 17–78.

PRIETO, L., MONTESINO, M., RODR GUEZ-MONGE, A., RIVAS, E., & SALAS, A. **“Measuring by fragment analysis the proportion of length variants in samples carrying length heteroplasmy at the homopolymeric C-stretch in mitochondrial HVII region”** International Congress Series, 1261, 103–105, 2004.

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.

QUINTANA-MURCI, L., SEMINO, O., BANDELT, H.-J., PASSARINO, G., MCELREAVEY, K., & SANTACHIARA-BENERECETTI, A. S. **Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa.** Nature Genetics, 23(4), 437–441, 1999.

RAJKUMAR, R., BANERJEE, J., GUNTURI, H., TRIVEDI, R., & KASHYAP, V. **Phylogeny and antiquity of M macrohaplogroup inferred from complete mt DNA sequence of Indian specific lineages.** BMC Evolutionary Biology, 5: 26, 2005.

RAMOS A.; SANTOS C.; MATEIU, L. et al., **“Frequency and Pattern of Heteroplasmy in the Complete Human Mitochondrial Genome,”** PLoS One, vol. 8, pp. 19–21, 2013.

RANAWEERA, L., KAEWSUTTHI, S., WIN TUN, A., BOONYARIT, H., POOLSUWAN, S., & LERTRIT, P. **Mitochondrial DNA history of Sri Lankan ethnic people: their relations within the island and with the Indian subcontinental populations.** Journal of Human Genetics, 59(1), 28–36, 2013.

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

RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K.; PEREIRA, J. M. LOBATO, M.R.L.; CARVALHO B. .M; GUERREIRO, J. F.; BATISTA-DOS-SANTOS, S. E. **Dissimilarities in the processo of formation of Curiaú, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the amazon Region.** Am j Hum Biol 14:440-447, 2002.

RICHARDS M.; MACAULAY V.; HICKEY E., et al., **“Tracing european founder lineages in the near eastern mtDNA pool,”** Am. J. Hum. Genet., vol. 67, pp. 1251–1276, 2000.

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

RICOY-CAMPO J. R. AND CABELLO A. **Mitocondriopatias**. Rev Neurol 37: 775-779, 2003.

ROBERTS, K., & CALLOWAY, C. “**Characterization of mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in blood tissue and hair as a function of hair morphology**” Journal of forensic sciences, 56(1), 46–60, 2011.

ROCHA, R. A. “**Domínio**” e “**posse**”: as fronteiras coloniais de Portugal e da França no Cabo Norte (primeira metade do século XVIII). Tempo, 23(3), 529–545, 2017.

ROMANI, C. **A história entre o oficial e o lendário**: interações culturais no Oiapoque. Antíteses, v. 3 n. 5, p.145-169, 2010.

ROMERO P, FERNÁNDEZ V, SLABAUGH M, SELEME N, REYES N, GALLARDO P, HERRERA L, PEÑA L, PEZO P. **Pan-American mDNA haplogroups in Chilean patients with Leber's hereditary optic neuropathy**. M. Molecular Vision, Mar 14;20:334-40. PMID:24672219, 2014.

SALAS, A., RICHARDS, M., DE LA FE, T., LAREU, M. V., SOBRINO, B., SÁNCHEZ-DIZ, P., MACAULAY, V., et al. “**The making of the African mtDNA landscape**” American journal of human genetics, 71(5), 1082–111, 2002.

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.

SALAS, A.; LAREU, 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.

SALZANO, F. M.; FREIRE-MAIA, N. **Populações Brasileiras, Aspectos Demográficos, Genéticos e Antropológicos**. Companhia Editora Nacional. São Paulo, 1967.

SALZANO, F. M; FREIRE-MAIA, N. **Problems in Human Biology**. A. Study of Brazilian Populations. Wayne State University Press, Detroit, 200 pp, 1970.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74(12): 5463-5467, 1977.

SANTOS F.R. **A colonização da terra dos Tucujús**. História do Amapá, 1º grau, 2ª edição. Editora Valcan, Macapá, 1994.

SANTOS, Lilian Gomes & SANTOS, Rodrigo da Silva. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, n.15; p. 1729, 2012.

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

SARNEY, JOSÉ & COSTA, PEDRO. **Amapá**: a terra onde o Brasil começa. Brasília-DF, Senado Federal, 1998.

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

SCHWARTZ, M., & VISSING, J. **“Paternal inheritance of mitochondrial DNA”** *New England Journal of Medicine*, 347(8), 576–580, 2002.

SCHWARTZ, M.; VISSING, J. **Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA.** *The New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 8, p. 576-578, ago. 2002.

SHITARA, H.; HAYASHI, J. I.; TAKAHAMA, S.; KANEDA, H.; YONEKAWA, H. **Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids:** segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics*, v. 148, n. 2, p. 851-857, Feb 1998.

SHITARA, H.; KANEDA, H.; SATO, A.; INOUE, K.; OGURA, A.; YONEKAWA, H.; HAYASHI, J. I. **Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis.** *Genetics*, v. 156, n. 3, p. 1277-1284, Nov 2000.

SMITH DG, MALHI RS, ESHLEMAN J, LORENZ JG, KAESTLE FA. **Distribution of mtDNA haplogroup X among Native North Americans.** *Am J Phys Anthropol.*:110:27-84. 1999.

SMITH, L. M.; FUNG, S.; HUNKAPILLER, M.W.; HUNKAPILLER, T. J.; HOOD, L.E. **The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus:** synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Reserarches*, v. 13, n. 7, p. 2399-412, 1985.

SNUSTAD, D.P. & SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética – 2ª edição, Rio de Janeiro:** Guanabara Koogan S.A., 2001.

SOUZA CFM. **Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial.** Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

STONEKING, Mark. **Human origins:** The molecular perspective. *Nature*, v. 9, p. S46 - S50, 2008.

SHIYU LUO, C. ALEXANDER VALENCIA, JINGLAN ZHANG, NI-CHUNG LEE, JESSE SLONE, BAOHENG GUI, XINJIAN WANG, ZHUO LI, SARAH DELL, JENICE BROWN, STELLA MARIS CHEN, YIN-HSIU CHIEN, WUH-LIANG HWU, PI-CHUAN FAN, LEE-JUN WONG, PALDEEP S. ATWAL., AND TAOSHENG HUANG. **Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans.** *PNAS*, v. 15, n. 51, pp. 13039-13044; 2018.

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

TAYO, Bamidele et al. **Genetic Background of patients from a University Medical Center in Manhattan: Implications for Personalized Medicine.** Plos One, v. 6, maio, 2011.

THANGARAJ, K., CHAUBEY, G., SINGH, V., VANNIARAJAN, A., THANSEEM, I., REDDY, A. G., & SINGH, L. **In situ origin of deep rooting lineages of mitochondrial Macrohaplogroup 'M' in India.** BMC Genomics, 7(1), 151, 2006.

TORRONI, A HUOPONEN K, FRANCALACCI P, PETROZZI M, MORELLI, SCOZZARI R, OBINU D, SAVONTAUS ML, WALLACE, D.C. **Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations.** Genetics 144: 1835-1850,1996.

TORRONI, A SCHURR, T.G., YANG, C.C., SZATHMARY, E.J., WILLIAMS, R.C., SCHANFIELD, M.S., TROUP, G.^a, KNOWLER, W.C., LAWRENCE, D.N., WEISS, K.M. & WALLACE, D.C. **Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the amerindian and the Nadene populations were founded by two independent migrations.** Genetics 130: 153-162,1992.

TORRONI, A., ACHILLI, A., MACAULAY, V., RICHARDS, M., & BANDELT, H. J. **“Harvesting the fruit of the human mtDNA tree”** Trends in genetics: TIG, 22(6), 339–45, 2006.

TORRONI, A.; ACHILLI, A.; MACAULAY, V.; RICHARDS, M.; BANDELT, H. J. **Harvesting the fruit of the human mtDNA tree.** Trends Genet, v. 22, n. 6, p. 339-345, 2006.

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.; 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.; SCHURR, T. G.; CABELL, M. F.; BROWN, M. D.; NEEL, J. V.; LARSEN, M.; SMITH, D. G.; VULLO, C. M.; WALLACE, D. C. **Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs.** Am J Hum Genet, v. 53, n. 3, p. 563-590, 1993.

TULLY, G.; BARRITT, S. M.; BENDER, K.; BRIGNON, E.; CAPELLI, C.; DIMOSIMONIN, N.; EICHMANN, C.; ERNST, C. M.; LAMBERT, C.; LAREU, M. V.; LUCES, B.; MEVAG, B.; PARSON, W.; PFEIFFER, H.; SALAS, A.; SCHNEIDER, P. M.; STAALSTROM, E. **Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts.** Forensic Sci Int, v. 140, p. 1–11, 2004.

TULLY, L. A.; PARSONS, T. J.; STEIGHNER, R. J.; HOLLAND, M. M.; MARINO, M. A.; PRENGER, V. L. **A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region.** *American Journal of Human Genetics*, v. 67, p. 432–443, 2000.

UMETSU, K., TANAKA, M., YUASA, I., ADACHI, N., MIYOSHI, A., KASHIMURA, S., OSAWA, M. **Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations.** *ELECTROPHORESIS*, 26:91–98, 2005.

UNDERHILL, P. & KIVISILD, T. **“Use of y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations”** *Annual review of genetics*, 41, 539–64, 2007.

V. MACAULAY, M. RICHARDS, AND B. SYKES, **“Mitochondrial DNA recombination - no need to panic,”** *P Roy Soc L. B Bio*, vol. 266, pp. 2037–2039, 1999.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. **Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation.** *Hum Mutat*, v. 30, p. 386–394, 2009.

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.

VIGILANT L, STONEKING M, HARPENDING H, HAWKES K, WILSON AC. **African populations and the evolution of human mitochondrial DNA.** *Science*, v. 253, p. 1503- 1507, 1991.

VOLODKO, N. V., STARIKOVSKAYA, E. B., MAZUNIN, I. O., ELTSOV, N. P., NAIDENKO, P. V., WALLACE, D. C., & SUKERNIK, R. I. **Mitochondrial Genome Diversity in Arctic Siberians, with Particular Reference to the Evolutionary History of Beringia and Pleistocenic Peopling of the Americas.** *The American Journal of Human Genetics*, 82(5), 1084–1100, 2008.

WALLACE D.C. **A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine.** *Annu Rev Genet* 39: 359-407, 2005.

WALLACE, D. C.; YE, J. H.; NECKELMANN, S. N.; SINGH, G.; WEBSTER, K. A.; GREENBERG, B. D. **Sequence analysis of human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations.** *Curr Genet*, v. 12, p. 81–90, 1987.

WALLACE, D.C et al. **Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease.** *Gene [S.I.]*. v.238, n.1, p. 211-30, sep 30, 1999.

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.; CANN, R.L. **The Recent African Genesis of Humans.** Scientific American, v. 266, April. 1992.

WILSON, M. R.; ALLARD, M. W.; MONSON, K.; MILLER, K. W. P.; BUDOWLE, B. **Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region.** Forensic Science International, v.129, p. 35–42, 2002.

WILSON, M. R.; DIZINNO, J. A.; POLANSKEY, D.; REPLOGLE, J.; BUDOWLE, B. **Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis.** Int J Legal Med, v. 108, p. 68-74, 1995.

ANEXO A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

CERTIFICADO

Título da Pesquisa: ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO DNA MITOCONDRIAL HUMANO (HV1, HV2 E HV3) NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO AMAPÁ : ASPECTOS POPULACIONAIS E FORENSES.

Pesquisador Responsável: RAFAEL LIMA RESQUE

CAAE: 98117518.1.0000.0003

Submetido em: 11/09/2018

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPA

Situação da Versão do Projeto: Parecer Consubstanciado Emitido (Aprovado)

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Certificamos que o Projeto cadastrado está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Humana, adotados pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em reunião realizada em 21/09/2018.

Macapá, 21 de setembro de 2018


Prof.^a. Dra. Raphaelle Souza Borges

Coordenadora - CEP-UNIFAP

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa/PROPESPG

Portaria nº 051/2015

Raphaelle Souza Borges
Comitê de Ética em Pesquisa
Portaria 051/2015

Universidade Federal do Amapá
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP - UNIFAP
Rod. JK km 2, Marco Zero CEP 68908-130 – Macapá – AP - Brasil
Email: cep@unifap.br