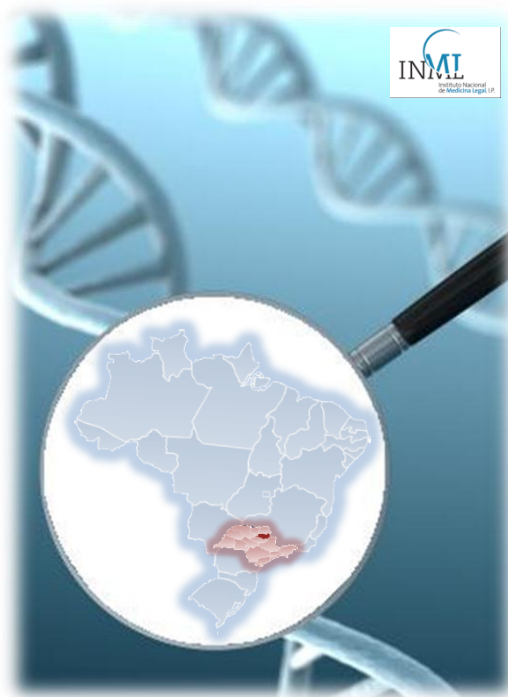


**GENÉTICA DA POPULAÇÃO DO  
ESTADO DE SÃO PAULO:  
ANÁLISE DE SNPs DO CROMOSSOMA Y**



MARTA PEDROSO MENDES SÃO BENTO

# GENÉTICA DA POPULAÇÃO DO ESTADO DE SÃO PAULO: ANÁLISE DE SNPs DO CROMOSSOMA Y



Dissertação de Mestrado em **Medicina Legal e Ciências Forenses** desenvolvida no serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicinal Legal

Marta Pedroso Mendes São Bento

Coimbra, 2009

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Sr. Professor Doutor Duarte Nuno Vieira, pela oportunidade de realizar este mestrado, bem como pela palavra de incentivo sempre presente.

Ao Sr. Professor Doutor Francisco Côrte-Real pela orientação científica e sabedoria, assim como pelo apoio e dedicação incansáveis, tendo contribuído para a minha formação científica e humana.

À Mestre Mónica Carvalho pela forma atenta com que me apoiou e orientou cientificamente, manifestando sempre uma disponibilidade, paciência e cortesia infindáveis.

À Dra. Maria João Porto por toda a orientação, estímulo e palavra amiga.

À Mestre Lisa Andrade, Dra. Virgínia Lopes, Dr. Armando Serra e Mestre Filipa Balsa pelo empenho que sempre demonstram em ajudar-me, todo o conhecimento que partilharam e dúvidas que esclareceram.

À D. Clara Oliveira, D. Luísa Baptista e D. Patrícia Cunha por toda a amabilidade, auxílio e cuidado atento.

À Mestre Ana Margarida Bento, Mestre Heloísa Afonso-Costa e Dr. Pedro Brito pelo ótimo ambiente de trabalho, valiosas sugestões, alegria e entusiasmo.

À minha mãe, ao meu pai, irmã e Piedade pelo apoio e incentivo sempre presentes.

Ao Afonso, por toda a cumplicidade e companheirismo inesgotáveis.

A todos os meus amigos, por toda a amizade e encorajamento.

A todos, um profundo e sincero Obrigado.

«O Homem, com todas as suas qualidades nobres, ainda carrega na sua estrutura corporal o selo indelével da sua origem humilde.»

Charles Darwin

# ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE .....	4
ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	6
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1. O genoma humano .....	17
1.2. O Cromossoma Y .....	21
1.3. Polimorfismos de DNA do Cromossoma Y: <i>single nucleotide Polimorphisms</i> (SNPs) – aplicações forenses .....	24
1.4. A Genotipagem de Y-SNPs: breves considerações .....	27
1.5. Árvore de haplogrupos do Cromossoma Y a partir de polimorfismos binários .....	28
1.6. Selecção de Y-SNPs .....	30
1.7. História e caracterização da população de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil .....	32
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
2.1. Colheita e armazenamento de amostras.....	38
2.2. Extracção de DNA: <i>Chelex</i> ® 100.....	39
2.3. A Genotipagem de Y-SNPs: .....	41
2.3.1 A Genotipagem de Y-SNPs: Metodologias .....	41
2.3.2 A Genotipagem de Y-SNPs: Minisequenciação com <i>SNaPshot</i> <sup>TM</sup> <i>kit</i> .....	43
2.3.2.1. Amplificação de Y-SNPs: PCR.....	49
2.3.2.2 Purificação Exo-Sap: <i>ExoSAP-it</i> ®.....	55
2.3.2.3. Reacção de minisequenciação: Extensão numa base dos <i>primers</i> ( <i>SNaPshot</i> <sup>TM</sup> ) .....	57

2.3.2.4. Purificação: tratamento com SAP.....	61
2.4. <b>Detecção e Análise do produto <i>SBE</i>: <i>ABI Prism</i><sup>®</sup> 310 e 3130 Genetic Analyzer</b> .....	63
2.4.1. Preparação das amostras para o processo de electroforese capilar nos sequenciadores <i>ABI Prism</i> <sup>®</sup> 3130 e 310 Genetic Analyzer .....	66
2.5. <b>Detecção do produto sequenciado</b> .....	68
2.6. <b>Atribuição dos haplogrupos de Y-SNPs e análise estatística</b> .....	71
<b>3. RESULTADOS</b> .....	72
3.1. Estudo <i>dos polimorfismos bialélicos do cromossoma Y</i> : análise de <i>multiplexes</i> .....	75
3.1.1. <i>Multiplex</i> 1 .....	76
3.1.2. <i>Multiplex</i> 2 .....	79
3.2. Caracterização do Haplogrupo: cálculo das frequências .....	82
3.4. Árvore filogenética .....	84
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	86
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	92
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94
<b>ANEXOS</b> .....	100
<b>Anexo I.</b> Protocolo utilizado para a Extração de DNA por <i>CHELEX</i> <sup>®</sup> 100 a partir de manchas de sangue para análise de Y-SNPs) .....	101
<b>Anexo II.</b> Protocolo de Amplificação de DNA por PCR com o <i>QIAGEN</i> <sup>®</sup> <i>Multiplex PCR kit</i> para estudo de Y-SNPs através de <i>multiplex</i> 1 e <i>multiplex</i> 2 .....	104
<b>Anexo III.</b> Protocolo de minisequenciação com <i>SNaPshot</i> <sup>™</sup> <i>Multiplex kit</i> para estudo de Y-SNPs presentes nos <i>multiplexes</i> 1 e 2 .....	106
<b>Anexo IV.</b> Tabela de Resultados .....	108
<b>ÍNDICE DE GRAVURAS</b> .....	113
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	117
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	120

## ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ddNTPs** – dideoxínucleótidos trifosfatados

**dNTPs** – desoxínucleótidos trifosfatos

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**EXO I** – *Exonuclease I*

**EXO-SAP** – *Exonuclease I* (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP)

- FRET** – *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
- HLA** – *Human Leukocyte Antigen*
- MALDI-TOF MS** – *Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*
- Mb** – Milhões de pares de bases
- MSY** – *Male Specific Y region*
- mtDNA** – DNA mitocondrial
- NRY** – *Non Recombining region of the Y chromosome*
- PAR1** – *Pseudoautosomal Region 1*
- PAR2** – *Pseudoautosomal Region 2*
- pb** – pares de bases
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction*
- SAP** – *Shrimp Alkaline Phosphatase*
- SBE** – *Single Base Extension*
- SNP** – *Single Nucleotide Polymorphism*
- SRY** – *Sex determining Region of the Y chromosome*
- STR** – *Short Tandem Repeats*
- UEPs** – *Unique Event Polymorphisms*
- YCC** – *Y Chromosome Consortium*
- Y-SNP** – *Single Nucleotide Polymorphism in the Y-chromosome*
- Y-STR** – *Short Tandem Repeats in the Y-chromosome*
- Yp** – Braço pequeno do cromossoma Y
- Yq** – Braço longo do cromossoma Y



## RESUMO

Os avanços imparáveis da ciência têm proporcionado à genética forense o recurso a inúmeras ferramentas muito diversificadas para que continue a dar resposta aos desafios cada vez mais exigentes que lhe são colocados. Neste contexto, a comunidade forense tem desenvolvido um interesse crescente nos *single nucleotide polymorphisms* (SNP) localizados na porção não recombinante do cromossoma Y. As suas características únicas, como a simplicidade (i), a abundância (ii), o padrão de herança unicamente paterna (iii), a (praticamente) inexistência de recombinação (iv), baixa taxa de mutação (v), a viabilidade de análise em sistemas *multiplex* e através de tecnologias com elevada rapidez de resposta no processamento dos dados (vi), conferem-lhe aplicações ímpares.

Uma vez que a diversidade do cromossoma Y se acumula nas linhagens masculinas, verificando-se uma especificidade populacional, os *single nucleotide polymorphisms* do cromossoma Y (Y-SNPs) permitem inferir sobre a origem de um indivíduo que possa, por exemplo, ter deixado uma amostra biológica numa cena crime. No entanto, no campo forense, mais do que um marcador de linhagem e informativo de ancestralidade, o seu estudo pode revelar-se indispensável quando as restantes metodologias já aplicadas na rotina parecem falhar ou revelar-se insuficientes e inconclusivas, designadamente em face da análise de amostras bastantes degradadas (i), no âmbito de investigações de parentesco complexas (ii) e na identificação de indivíduos em contextos de acidentes em massa (iii), podendo ter aplicação como método de exclusão simples e poderoso.

Com a publicação da primeira árvore filogenética de haplogrupos binários do cromossoma Y, em 2002, foi possível a padronização da classificação de haplogrupo e da nomenclatura aplicada, o que permitiu que a troca internacional de conhecimentos e compreensão dos estudos publicados se tornasse uma realidade. Este foi um passo importante para que, em conjunto com o conhecimento das situações excepcionais de análise deste marcador — minimizando problemas de interpretação — e aumento das bases de dados populacionais, os Y-SNPs possam ocupar a posição de marcadores de excelência nos laboratórios forenses, actualmente detida pelos *short tandem repeats* do cromossoma Y (Y-STRs).

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de obter informações relativamente à possível origem biogeográfica da população de Ribeirão Preto (no Estado de São Paulo, Brasil) e consequentes relações filogenéticas. Historicamente, a origem do povoamento do Brasil situa-se precisamente no estado de São Paulo, em 1532, com a chegada dos portugueses. A variedade étnica que caracteriza a sua população tem um contexto histórico relacionado com a vinda de grupos africanos e posteriores vagas migratórias de espanhóis, italianos, alemães e japoneses.

De acordo com os dados históricos da população, grau de polimorfismo dos marcadores e de acordo com a estratégia hierárquica da árvore de haplogrupos, 14 SNPs do cromossoma Y foram seleccionados e estudados, de modo a caracterizar a composição dos haplogrupos binários do cromossoma Y presentes na população. O DNA (ácido desoxirribonucleico) de 81 indivíduos, obtido a partir de amostras de sangue de homens não relacionados da população de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo (Brasil), foi extraído através do método de *Chelex*<sup>®</sup> 100. Para a caracterização dos haplogrupos do cromossoma Y desta população, 14 Y-SNPs foram seleccionados e estudados num sistema

hierárquico de 2 *multiplexes*, de acordo com a estratégia de genotipagem sugerida por BRIÓN *et al.* (2004), e posteriormente estudados numa reacção de amplificação, seguida da reacção de purificação através de *ExoSap-IT*<sup>®</sup> (Usb<sup>®</sup>). A reacção de minisequenciação utilizando o *SNaPshot*<sup>TM</sup> *multiplex kit* (*Applied Biosystems*) foi seguida de uma purificação SAP (*Roche*). Os produtos da reacção foram detectados por electroforese capilar, utilizando os *ABI PRISM*<sup>®</sup> 310 e 3130 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), analisando-se posteriormente os resultados através dos programas informáticos da *ABI PRISM*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*) *GeneScan*<sup>®</sup> v3.1 e *GeneMapper*<sup>®</sup> ID, v3.2, respectivamente. Um padrão interno, *GeneScan*<sup>TM</sup> 120 *LIZ Size Standard*, foi previamente adicionado e o tamanho dos fragmentos das amostras obtido por comparação, resultando a genotipagem da população em estudo. Os haplogrupos presentes foram identificados e as frequências determinadas por contagem. A nomenclatura dos haplogrupos atribuída está de acordo com os estudos do YCC (2002), JOBLING e TYLER-SMITH (2003) e KARAFET *et al.* (2008).

Os resultados obtidos apresentam-se em concordância com os dados históricos e estudos anteriores com outros marcadores — que indicam a inserção desta população no grupo das populações europeias —, uma vez que entre os mais de 11 haplogrupos identificados, 73% correspondem a haplogrupos característicos dos europeus como R1b1, J2 e I(xI2a2). Embora com numa proporção menor, também foram detectadas as contribuições africanas, asiáticas e de ameríndios, não tendo sido detectado nenhum haplogrupo em contradição com os resultados previamente esperados.

Deste modo, os dados obtidos podem tornar-se numa ferramenta útil em estudos de evolução e investigações forenses, como também no estudo da origem étnica de um indivíduo, através da análise de apenas alguns *loci* de Y-SNPs específicos para esta população.

**PALAVRAS-CHAVE:**

Cromossoma Y, SNP, *SNaPshot*<sup>TM</sup>, estudo populacional, Estado de São Paulo

## **ABSTRACT**

Non-stopping progresses in Science have been offering Forensic Genetics access to numerous very different tools, allowing it to continue responding to challenges that are more and more demanding. In this context, forensic community has developed a growing interest in single nucleotide polymorphisms (SNP), located on non-recombining portions of the Y chromosome. Unique characteristics, such as simplicity (i), abundance (ii), exclusive paternal heritage pattern (iii), (near) inexistence of recombination (iv), low mutation rate (v), viability for analysis in multiplex systems and using technologies of quick data processing (vi), allow for unequalled applications.

Since Y-chromosome's diversity accumulates in male lineages, presenting a population specificity, single nucleotide polymorphisms of the Y chromosome (Y-SNPs) allow to infer about the origin of an individual that might, for example, have left a biological sample in a crime scene. Nevertheless, in the forensic field, they are more than lineage and ancestry informative markers. Their study may become essential, when other routine methodologies applied seem to fail or prove insufficient or inconclusive, namely when facing the analysis of very degraded samples (i), in complex parental relationship investigations (ii) and in mass disaster individual identification (iii), since it may be applied as a simple and powerful exclusion method.

With the publication of the first phylogenetic tree of binary Y-chromosomal haplogroups, in 2002, the standardization of haplogroup classification and of the applied nomenclature became possible, allowing for the international exchange of knowledge, as well as the understanding of published studies. Together with the knowledge of this marker's exceptional analysis situations – minimizing interpretation problems – and the growth of population data bases, this was a major step towards Y-SNPs becoming reference markers in forensic laboratories, a position that is presently held by short tandem repeats of the Y chromosome (Y-STRs).

This study's objective was to obtain information regarding the possible biogeographic origin of Ribeirão Preto's population (in São Paulo State, Brasil) and consequent phylogenetic relationships. Historically, the origin of Brasil's settlement is precisely the São Paulo State, in 1532, with the arrival of the Portuguese. The ethnic variety that characterises its population presents an historic context related with the arrival of African groups and later migratory waves of Spanish, Italian, German and Japanese.

Based on the historical data of the population, the markers' polymorphism level and hierarchy strategy of the haplogroups tree, 14 Y-chromosome SNPs were selected, in order to characterize the composition of the binary Y-chromosome haplogroups present in the population. DNA of 81 bloodstains from non-related men of Ribeirão Preto population, in São Paulo State (Brazil), was extracted, using the Chelex® 100 method. To characterize the Y-chromosome haplogroups of this population, 14 Y-SNPs were selected and studied in a hierarchical system of 2 multiplexes, according to the genotyping strategy suggested by Brión et al. (2004), and later studied in an amplification reaction, followed by the purification reaction with ExoSap-IT® (Usb). The minisequencing reaction performed with the SNaPshot™ multiplex kit (Applied Biosystems) was followed by a SAP (Roche) purification. The reaction products were detected by capillary electrophoresis, using ABI

PRISM® 310 and 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the results were later analysed, using software ABI PRISM® (Applied Biosystems) GeneScan® v3.1 and GeneMapper® ID, v3.2, respectively. An internal pattern, GeneScan™120 LIZ Size Standard, was previously added and the size of sample fragments was obtained by comparison, resulting in the genotyping of the population being studied. The haplogroups that were present were identified and frequencies were determined by counting. Haplogroup nomenclature is in agreement with the YCC (2002), Jobling and Tyler-Smith (2003) and Karafet et al. (2008) studies.

The results obtained are in accordance with the historical data and previous studies carried out using other markers — which indicate the insertion of this population in the European population group —, once, in more than 11 haplogroups identified, 73% correspond to haplogroups that are characteristic to European, such as R1b1, J2 and I(xI2a2). Although showing a minimal participation, African, Asian and Amerindian contributions were detected, but no haplogroup was detected, contradicting previously expected results.

The results obtained may become a useful tool in evolutionary studies and forensic investigations, as well as in the study of the ethnic origin of an individual as well, through the analysis of only a few loci of Y-SNPs that are specific to this population.

**KEY-WORDS:**

Y-Chromosome, SNP, SNaPshot™, populational study, São Paulo State



Fonte: <http://www.uwlax.edu/lis/news/archivednews/2007spring/images/dna.jpg>.

## 1. INTRODUÇÃO

Definida como a ciência que aplica os conhecimentos médicos e biológicos ao serviço da Administração da Justiça – quer seja do âmbito penal, civil, do trabalho, ou da família e menores – a Medicina Legal confronta-se, actualmente, com exigências e desafios cada vez mais complexos relativamente à actividade probatória científica. Os avanços da Genética e da Biologia Molecular disponibilizaram um sistema de provas extremamente seguro, objectivo e eficaz – a prova de DNA [20].

Entre as actividades mais recorrentes desta ciência, destacam-se as perícias realizadas pela Genética e Biologia Forense, nomeadamente investigações biológicas de filiação (i), criminalística biológica (ii) e identificação individual (iii).

A ciência forense baseia-se no princípio de sermos únicos, o que se reflecte no genoma. Assim, a informação genética de cada indivíduo, o DNA, contém, de modo codificado, todo o seu património biológico, herdado, e que lhe confere o carácter de exclusividade [5]. Consequentemente, analisando a informação presente no DNA de um indivíduo, é possível conhecer o que lhe confere unicidade e, deste modo, identificá-lo. Deste modo, a prova de DNA permite procurar e investigar essa exclusividade, esclarecendo delitos, crimes e relações humanas.

O cromossoma Y é apenas um dos 46 elementos que, no seu conjunto, caracterizam e particularizam os indivíduos do sexo masculino. Nessa medida, pode questionar-se a relevância prática do estudo de um só cromossoma que, pressupondo que a relação entre homens e mulheres seja de um para um, apenas existirá em metade da população. A sua importância descobre-se, principalmente em três razões.

Em primeiro lugar, o cromossoma Y apresenta características únicas, distintas de qualquer um dos demais cromossomas, que explicaremos melhor *infra*, e das quais destacamos, desde já, o seu modo de transmissão directamente do pai para todos os seus filhos do sexo masculino, sem alteração (excepto se ocorrerem eventos mutacionais), permitindo identificar a sua linhagem paterna (i); assim como a sua presença exclusiva no genoma masculino permitindo facilmente o estudo da porção masculina a partir de uma amostra biológica (ii). A sua singularidade torna-o uma chave de acesso a conhecimentos que, de outro modo, seriam dificilmente alcançáveis.

Por outro lado, a grande maioria dos crimes em Portugal é praticada por homens, prevalecendo, ainda, os de origem europeia [52]. Assim, o estudo do cromossoma Y poderá guarnecer os tribunais e investigadores policiais de mais uma ferramenta ao serviço da justiça.

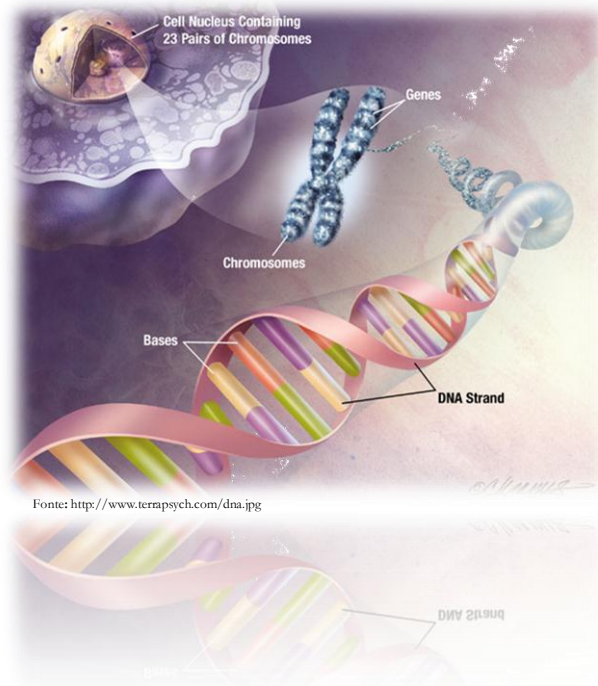
Por fim, o fluxo e movimentação de pessoas a nível global reforçam a necessidade de estudos populacionais, análise estatística dos dados e, assim, de troca dos conhecimentos entre laboratórios dos estudos do cromossoma Y.

Para que o estudo do cromossoma Y tenha valor em tribunal, tem de preencher-se um conjunto de requisitos, entre os quais a validação, pelas entidades internacionais responsáveis, das metodologias e análise estatística (i), a padronização dos procedimentos (de acordo com normas internacionais) (ii), a execução de um controlo rigoroso de



qualidade (iii) e a publicação dos resultados, para que possam ser comparados com outros previamente conhecidos (iv).

Actualmente, a prova de DNA está consolidada cientificamente e o seu valor nos tribunais não deixa lugar para dúvidas [20]. No entanto, e no que concerne o cromossoma Y, será necessário o aumento das bases de dados populacionais (i), conhecimento das situações excepcionais associadas ao seu estudo, de modo a dissipar dúvidas de interpretação (ii), aferição de metodologias e entendimento internacional sobre as mesmas, de modo a padronizar os procedimentos e estabelecer um controlo rigoroso de qualidade, especificamente para aplicação forense (iii), para que a sua análise se possa afirmar como recurso de eleição nas perícias laboratoriais de âmbito forense.

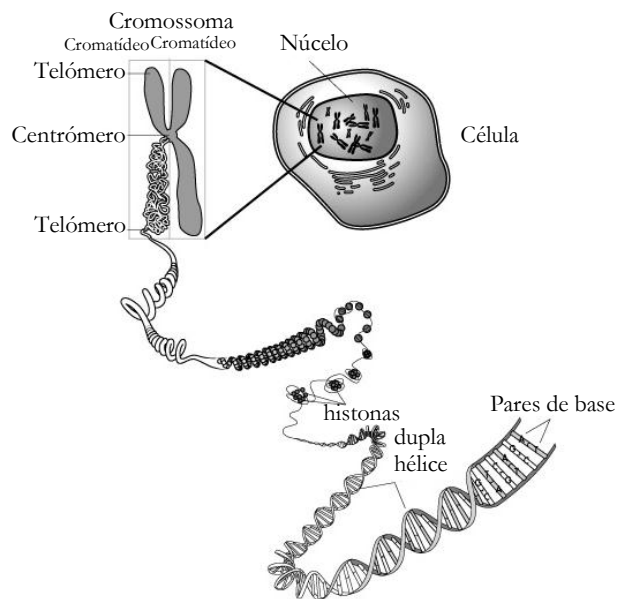


## 1.1. O GENOMA HUMANO

O Genoma Humano é a composição genética de um indivíduo, ou seja, consiste na totalidade de sequências de DNA presentes num indivíduo e que o tornam único.

A descoberta, em 1953, da estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucleico (DNA) revolucionou toda a ciência e deu início à era da Biologia Molecular. A molécula de DNA consiste em duas cadeias polinucleotídicas complementares e antiparalelas dispostas em dupla hélice. O seu estudo baseia-se no princípio de estas se poderem desenrolar e separar, por ruptura das ligações entre os pares de base Watson-Crick, através de um processo reversível – desnaturação e renaturação, respectivamente – [15].

No núcleo das células dos seres humanos, longos filamentos da molécula de DNA associam-se a proteínas básicas (histonas) — que lhes conferem protecção —, e a estrutura final resultante, que se encontra densamente enrolada e compactada, é denominada de cromossoma (Figura 1). O número e tamanho dos cromossomas são constantes nas células de um mesmo organismo — cariótipo —, mas variam entre diferentes tipos de organismos. Cada espécie armazena o seu DNA num número particular de cromossomas, de tamanho e forma características [15].



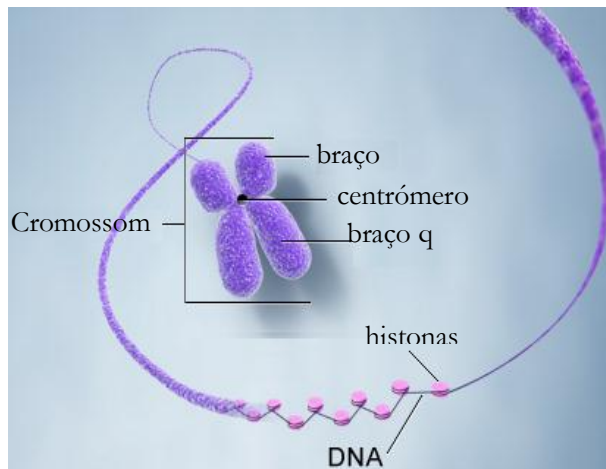
**Figura 1** – Representação ilustrativa da relação entre a dupla hélice de DNA e os cromossomas e sua localização no interior das células eucariotas.

O genoma humano distribui-se no núcleo das células sob a forma de 46 cromossomas dispostos em 23 pares, dos quais 22 são designados autossomas. Estes estão numerados de 1 a 22 por ordem decrescente de tamanho (excepto o cromossoma 21 que é mais pequeno que o cromossoma 22). O par restante é constituído pelos cromossomas responsáveis pelo sexo. Assim, os indivíduos do sexo masculino têm um cromossoma X e Y, enquanto os do sexo feminino apresentam dois cromossomas X [10]. Em geral, dentro do núcleo estão dois conjuntos completos do genoma humano<sup>1</sup>, um de origem materna, sendo o outro de origem paterna [15].

Cada cromossoma apresenta morfologicamente quatro regiões distintas: o centrómero (a região do centro do cromossoma), que se liga à nova cópia quando a célula se reproduz; o braço curto do cromossoma, localizado acima do centrómero e denominado

<sup>1</sup> As situações de excepção verificam-se nos óvulos e espermatozóides — que só têm uma cópia cada um — e dos glóbulos vermelhos, por serem anucleados, não apresentam qualquer informação cromossómica.

“p”; o braço longo abaixo do centrômero, designado “q”; os telômeros que consistem na extremidade de cada braço (Figura 2) [13].



**Figura 2** – Representação morfológica do cromossoma e sua relação com a Dupla Hélice de DNA.

Nos cromossomas, o material genético encontra-se disposto em regiões codificantes e não codificantes. Estima-se que apenas aproximadamente 5% do genoma corresponda a regiões codificantes – genes (intrões e exões) – que, apesar de mais interessantes do ponto de vista médico, apresentam pouca variabilidade entre os indivíduos (com exceção de certas regiões, como a que constituem o sistema HLA). O restante DNA, injustamente denominado de “*junk*”<sup>2</sup>, é extremamente polimórfico e variável entre os indivíduos, pelo que constitui uma ferramenta de utilidade extraordinária nas ciências forenses [13,20]. É precisamente nesta região não codificante que se restringem os estudos de DNA de âmbito forense.

Um *locus* consiste numa posição definida no cromossoma, indicando a localização de um gene ou marcador de DNA numa região desse cromossoma. Cada *locus* contém uma forma alternativa, denominada alelo. Se os alelos num determinado *locus* de cada cromossoma forem idênticos, são referidos como homozigóticos; se forem diferentes são referidos como heterozigóticos. O genótipo é a caracterização dos alelos presentes num determinado *locus*. No perfil de DNA de um indivíduo descrevem-se as combinações de genótipos obtidos em múltiplos *loci*. Assim, a tipagem de DNA consiste no processo de determinação do genótipo de vários *loci* de DNA [13].

Mais de 90% do genoma humano é composto por DNA não-codificante. As variações nestes segmentos de DNA repetitivo são tão grandes que se torna possível fazer

<sup>2</sup> É assim denominado dado não ser transcrito em RNA e não codificar nenhum gene em particular.

a identificação de um indivíduo com base na variação das suas sequências [20]. Esta pode resultar do diferente comprimento dos fragmentos repetidos — polimorfismo de repetição — ou ter lugar ao nível da sequência específica de bases — polimorfismo de sequência — [20]. Para fins de identificação humana, é importante ter marcadores de DNA que exibam grande variabilidade, que sejam polimórficos e que, no conjunto, tenham a capacidade de discriminar as amostras [13].



Fonte: [http://www.nist.gov/public\\_affairs/images/y\\_chromosome.jpg](http://www.nist.gov/public_affairs/images/y_chromosome.jpg)

## 1.2. O CROMOSSOMA Y

O cromossoma Y é um elemento do cariótipo humano dos indivíduos do sexo masculino, estando presente em todas as células nucleadas do seu organismo. Consequentemente, encontra-se nos diversos tipos de vestígios e amostras biológicas masculinas, como manchas de sangue, manchas de sémen, cabelos, pelos, dentes, entre outros [20]. No que tange ao modo de transmissão, este é peculiar já que a composição do cromossoma Y se mantém praticamente inalterada durante a sua passagem de pai para filho. Assim, quando se procede ao estudo do cromossoma Y relativamente a um suspeito, não se está simplesmente a analisar o DNA daquele indivíduo mas de todos os homens da sua linhagem paterna.

Cada cromossoma tem a sua própria história, única, que resulta de centenas de milhões de anos de evolução [48]. O cromossoma Y “conta” uma história longa, detalhada, cheia de memórias, e relativa a toda uma mesma linhagem masculina. Após ter divergido do mesmo ancestral autossômico – cromossoma não sexual – que o cromossoma X [48], o cromossoma Y foi passando de geração em geração sem se alterar (com exceção de eventos mutacionais), sendo hoje possível identificar linhagens paternas a partir da “leitura” da sua história; é por isso denominado de marcador de linhagem [13].

O cromossoma Y é o terceiro mais pequeno do cariótipo humano com pouco mais do que 50 milhões de bases (Mb) — suplantando somente os cromossomas 21 (47Mb) e 22 (49Mb) [13].

Este cromossoma tem características ímpares que o distingue dos demais cromossomas. As suas propriedades parecem quebrar todos os princípios e regras estabelecidos na “bíblia da genética humana” uma vez que: (i) não é essencial à vida de um indivíduo — dado apenas estar presente nos homens e nas mulheres não —, (ii) mais de metade da sua estrutura refere-se à região heterocromática<sup>3</sup> — localizada no braço longo (Yq) e que, por definição, não é transcrita, sendo composta unicamente por sequências de DNA altamente repetitivas — e mesmo na região eucromática apenas um pequeno número de genes é que verdadeiramente codificam proteínas (Figura 3); (iii) e uma vez que apenas cerca de 4% da sua estrutura tem possibilidade de recombinar [16,28].

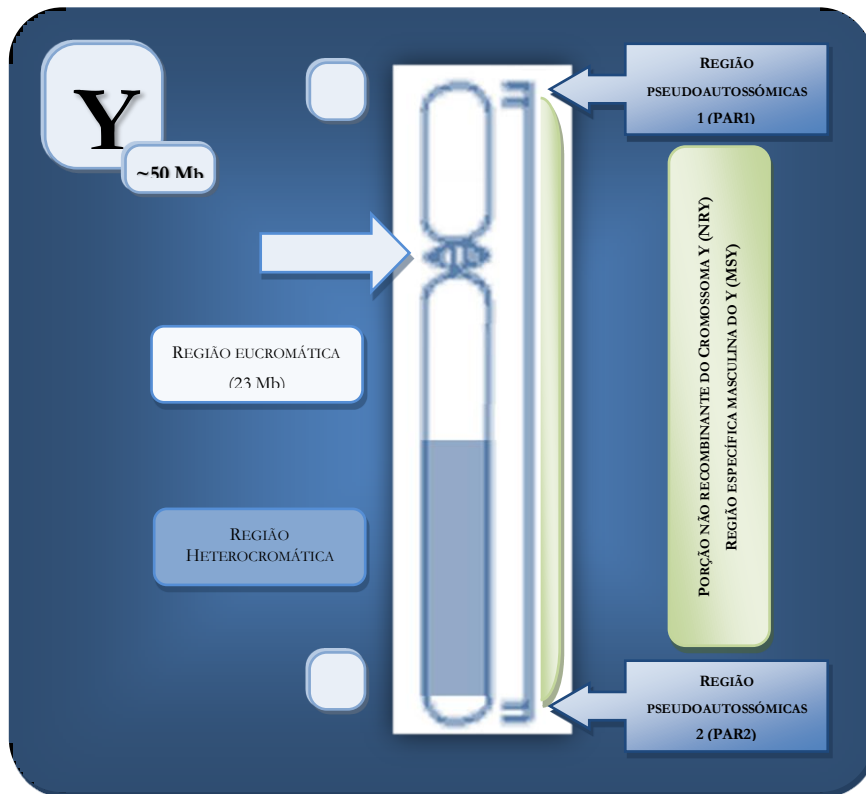
É precisamente na região eucromática que se encontra o gene exclusivo do genoma do homem e cuja presença lhe confere a sua “masculinidade”, o gene SRY. Este gene controla o desenvolvimento sexual masculino, desencadeando acontecimentos que promovem a formação de testículos masculinos a partir de tecidos embrionários indiferenciados [47], sendo responsável pela transformação do embrião num homem.

Constitutivamente haplóide, o cromossoma Y é transmitido directamente de pai para filho e, ao contrário de qualquer outro cromossoma, a sua quase totalidade escapa à recombinação meiótica [22]. Apenas as duas porções localizadas nas extremidades do cromossoma — regiões pseudoautossómicas (*PAR*) —, recombinam com as regiões homólogas do cromossoma X: a *PAR1*, localizada na extremidade do braço curto (Yp) do cromossoma Y tem aproximadamente 2,5 Mb de comprimento, e a *PAR2* — na extremidade do braço longo, tem 1 Mb de tamanho [13]. Assim, aproximadamente 95% do cromossoma — a região não recombinante (*NR*Y) ou *male specific region* (MSY), como foi

---

<sup>3</sup> Em oposição à região eucromática (23 Mb) que consiste na parte do cromossoma que é activamente transcrita.

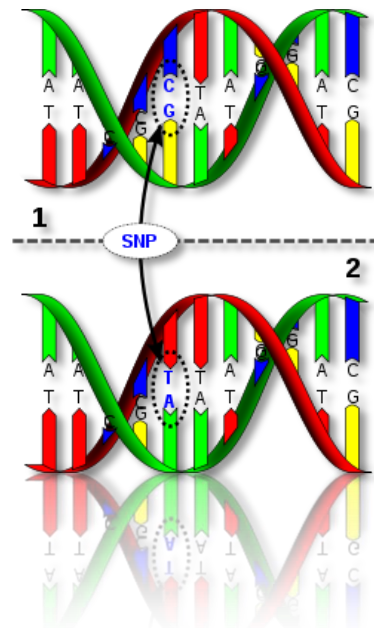
denominado mais recente por SKALETSKY *et al.* (2003) [43] — mantém-se inalterada de uma geração para a outra, pelo que a diversidade do cromossoma Y acumula-se dentro das linhagens, originando haplótipos *male-specific* que são distribuídos de modo não aleatório entre as populações humanas [22].



**Figura 3** – Representação esquemática da estrutura do cromossoma Y.

Assim, é precisamente a exceção às regras que o transformam numa ferramenta soberba na investigação da evolução humana recente, a partir de uma perspectiva masculina, e desempenha um papel importante, mas especializado, na genética médica e forense. Nesta última, e considerando as suas particularidades, o cromossoma Y tem vindo a afirmar-se como ferramenta relevante. Assim, o estudo dos seus marcadores poderá ter aplicação em investigações forenses de (i) paternidade — em particular quando o filho é do sexo masculino e o pai não pode ser incluindo no trio de análise, dispondo-se apenas de indivíduos da mesma linhagem masculina; (ii) acidentes de massa e/ou desaparecimentos — em que amostras da linhagem paterna servem de amostras controlo —; (iii) agressão sexual; mas também no (iv) estudo das migrações humanas e história evolutiva — dada a quase inexistente recombinação neste cromossoma.





Fonte: [https://sites.google.com/a/luther.edu/genetics/\\_/rsrc/1236044497909/students/tyler-best/tyler-best-personal-genomics/SNP.png](https://sites.google.com/a/luther.edu/genetics/_/rsrc/1236044497909/students/tyler-best/tyler-best-personal-genomics/SNP.png)

### 1.3. POLIMORFISMOS DE DNA DO CROMOSSOMA Y: *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs)* – APLICAÇÕES FORENSES

Estudar as populações de modo a identificar o que as distingue é fundamental para que possamos compreender a sua história. Na sequência desta análise, é possível aumentar a informação das bases de dados populacionais de referência, que são imprescindíveis para uma interpretação correcta e adequada dos resultados [10]. Assim, para se conhecerem as variações que naturalmente ocorrem nas sequências é necessário estudar os polimorfismos de DNA. A variação mais comum no genoma humano é denominada *single nucleotide polymorphisms* (SNP).

A região MSY (*male-specific*) do cromossoma Y, por compreender muitos marcadores repetitivos (STR) e de sequência (SNP), representa uma ferramenta preciosa quer para fins de estudos de evolução humana quer de identificação forense [32]. Assim, fundamentalmente dois grandes grupos de marcadores genéticos têm sido utilizados no estudo da diversidade do cromossoma Y: os *loci* bi-alélicos (que apresentam 2 alelos possíveis) e os *loci* multi-alélicos. O resultado da tipagem dos primeiros é classificado em haplogrupos, sendo o dos segundos em haplótipos [13]. Dentro dos UEPs (*unique event polymorphisms*)— como são frequentemente designados dada a sua baixa taxa de mutação ( $\sim 10^{-8}$  por geração)—, encontram-se os *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) do cromossoma Y [22].

Os SNPs existem no cromossoma Y como por todo o restante genoma humano, correspondendo a 90% de todos os seus polimorfismos. Também denominados de marcadores bialélicos, os SNPs consistem na variação de um único par de bases no DNA genómico num determinado *locus* para o qual existem duas bases diferentes, alternativas (alelos), em indivíduos normais da mesma população, em que o alelo menos frequente tem uma abundância igual ou superior a 1% [11].

Estes marcadores revelam a sua singularidade fundamentalmente ao apresentarem (i) uma grande simplicidade, (ii) baixa taxa de mutação, (iii) herança unicamente paterna, (iv) falta de recombinação, (v) abundância no genoma, (vi) possibilidade de análise em sistemas *multiplex* e (vii) através de tecnologias com elevada rapidez de resposta no processamento dos dados [4, 40].

Em particular, relativamente ao estudo dos SNPs do cromossoma Y (Y-SNPs), o que é indicado como uma vantagem, pode igualmente ser uma grande limitação. Assim, a presença de apenas duas formas de alelos, em conjunto com a ausência de recombinação e a distribuição altamente específica, torna os Y-SNPs pouco discriminatórios, obrigando à análise de um grande número de SNPs do cromossoma Y [4].

Os SNPs desde sempre têm sido utilizados em antropologia molecular para fornecer informações de padrões de migração específicas dos homens no passado e na origem e diversidade de populações específicas [9], em estudos evolutivos [27], de evolução humana, padrões migratórios, estudos de associação [40], revelando-se indicadores fiáveis da ancestralidade biogeográfica humana em virtude da sua baixa taxa de mutação [14].

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, e dada a sua abundância e distribuição, os SNPs têm despertado o interesse em diversas áreas entre as quais a ciência forense, sendo hoje largamente utilizados como marcadores genéticos em estudos

populacionais e podendo ser aplicados na genética forense [29]. Nesta, mostram-se essenciais quando as técnicas implementadas na rotina falham ou não se obtêm resultados conclusivos ou satisfatórios, tendo-se revelado uma excelente ferramenta da exclusão [22]. Deste modo, e atendendo às suas características únicas, o estudo dos Y-SNPs tem tido aplicação em situações singulares e muito específicas. Dentro destas, podem revelar-se essenciais no *screening* de amostras em casos de abuso sexual, assim como fornecer evidências da linhagem masculina em casos de paternidade complexos, em que o pretense pai, por exemplo, está ausente [9]. Do mesmo modo, pode revelar-se muito útil na análise de uma amostra recolhida numa cena crime, por exemplo, que se apresenta degradada, representando uma enorme dificuldade para uma correcta tipagem, dada a fragmentação da região de DNA de interesse. No entanto, com a tipagem de SNPs nestas circunstâncias invulgares e exigentes, tem-se tornado possível obter resultados [33].

Assim, e dado que as metodologias aplicadas no estudo dos SNPs permitem fornecer informações a partir de fragmentos pequenos de *template* intacto, o estudo dos SNPs tem sido aplicado no estudo de amostras antigas, apresentando moléculas de DNA fortemente degradado e em pequenas quantidades [36].

Os sistemas baseados em Y-SNPs permitem inferir a etnicidade ou a ancestralidade geográfica de um indivíduo a partir de uma amostra de DNA, dado que a transmissão parental da informação genética do cromossoma Y pode ser detectada através do estudo da linhagem masculina. No entanto, uma vez que esta não é específica de um indivíduo, apresenta a limitação de não permitir uma identificação individual [13]. Por outro lado, pode ser bastante útil, ajudando a limitar a lista de suspeitos quando não se consegue correspondência das amostras das cenas crime com os perfis das bases de dados [14,36]. Outra limitação destes marcadores poderá sentir-se numa dificuldade na análise de misturas [19].

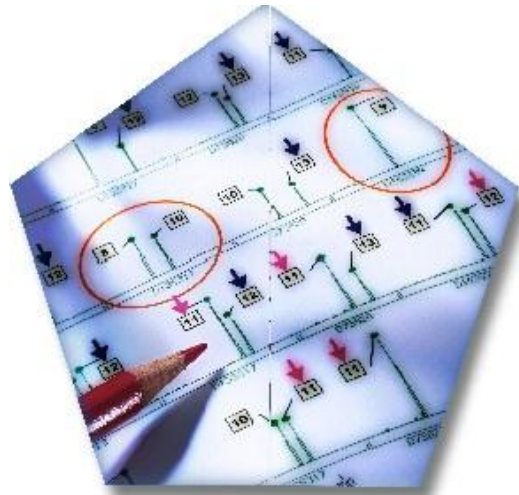
Assim, apesar dos Y-STRs serem os marcadores de preferência nos laboratórios forenses, um interesse crescente no Y-SNPs é evidente, tendo-se já tornado uma técnica frequente na maioria dos laboratórios envolvidos em casos forenses e análises de parentesco [6], estando mesmo instalada a discussão quanto à possibilidade dos SNPs ocuparem o lugar de eleição da rotina dos laboratórios forenses.



Fonte: <http://www.bio-teck.com/images/dna1.jpg>

#### 1.4. A GENOTIPAGEM DE Y-SNPs: BREVES CONSIDERAÇÕES

Dadas as características particulares dos marcadores bialélicos da região não codificante do cromossoma Y, já anteriormente mencionadas neste trabalho, o sucesso da sua aplicação depende fundamentalmente da técnica escolhida para o seu estudo. Várias têm sido as metodologias desenvolvidas nos últimos anos para a genotipagem de Y-SNPs com diferentes abordagens quer na reacção de detecção quer no princípio de discriminação dos alelos [9, 43, 45]. Como refere SOBRINO *et al.* (2005) [43], uma metodologia forense ideal para esta genotipagem deve apresentar uma boa capacidade para reacção em *multiplex*, elevada precisão, sensibilidade e tempo de resposta na recolha e processamento dos dados, com baixo custo. Muito provavelmente, a grande diversidade de técnicas desenvolvidas por diferentes laboratórios tem atrasado o seu aperfeiçoamento e optimização, pelo que, infelizmente, não é ainda exequível o protocolo ideal. Contudo, considerando o objectivo do presente estudo, o seu contexto forense, e de acordo com vários estudos previamente publicados, a minisequenciação por extensão de uma única base nucleotídica, com detecção por fluorescência através da aplicação com o kit comercial *SNaPshot<sup>TM</sup> Multiplex kit* da *Applied Biosystems* tem-se revelado a tecnologia mais adequada, sendo actualmente a mais utilizada nos laboratórios forenses.



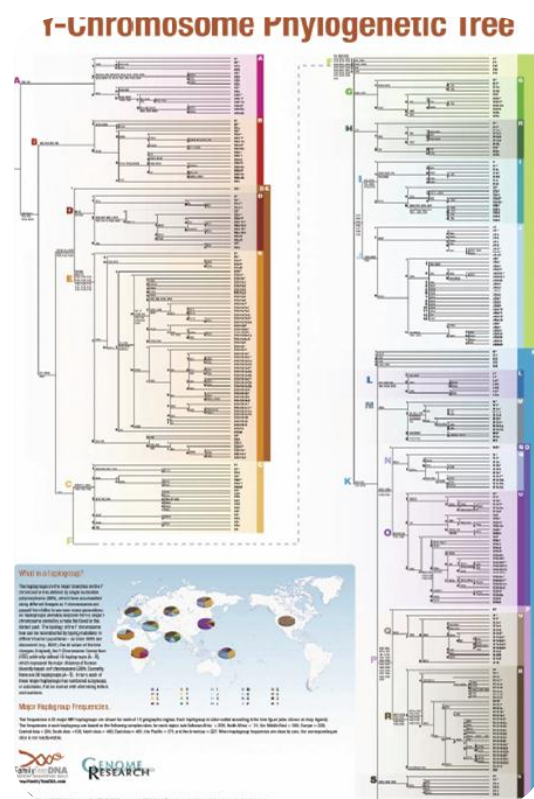
Fonte: [www.microsynth.ch/.../Diverses/genotyping.html](http://www.microsynth.ch/.../Diverses/genotyping.html)

### 1.5. ÁRVORE DE HAPLOGRUPOS DO CROMOSSOMA Y A PARTIR DE POLIMORFISMOS BINÁRIOS

A especificidade populacional dos polimorfismos binários permitem retirar inferências quanto à origem da população de qualquer amostra masculina de interesse para fins forenses [22, 44]. Os resultados das tipagens de Y-SNPs são classificados em haplogrupos (Hg) [13]. A análise de haplogrupos do cromossoma Y definidos por SNPs tem-se tornado numa abordagem comum para o estudo da origem das populações humanas modernas e como avaliação da variabilidade existente entre elas [17].

Para ser possível a sua compreensão e correcta interpretação é imprescindível uma uniformização da nomenclatura e do modo de apresentação dos resultados. Neste sentido, um grupo internacional de cientistas — *Y Chromosome Consortium* (YCC) —, definiram uma terminologia, uma estratégia e unificaram um sistema hierárquico com base nos marcadores binários da região não recombinante do cromossoma Y de distribuição de haplogrupos — a “árvore” dos haplogrupos do cromossoma Y. Publicada em Fevereiro de 2002 na *Genome Research* [38], foi ligeiramente alterada em Agosto de 2003 por JOBLING e TYLER-SMITH [19], tendo a última alteração sido publicada por KARAFET *et al.* (2008) [24] [13].

O modelo revisto da “árvore” de YCC, apresenta actualmente (Figura 5) 311 haplogrupos, com os maiores haplogrupos (designados de A a T) baseados no estudo de aproximadamente 600 polimorfismos binários [42].



**Figura 4** – Modelo revisto do sistema hierárquico com base nos marcadores binários da região não recombinante do cromossoma Y de distribuição de haplogrupos do YCC proposto por KARAFET *et al.* (2008).

Uma nomenclatura unificada e universal, de fácil compreensão, permite não só a validação de estudos, como permite a comparação, intercâmbio e compreensão dos estudos publicados por laboratórios de todo o mundo e a elaboração de bases de dados [13]. Deste modo, e em conjunto com a possibilidade de aplicação de kits comerciais – que permitem uma maior rapidez de processamento e uniformização da metodologias e interpretação de resultados –, torna-se possível o aumento da informação contida nas bases de dados para poder fortalecer a estimativa estatística e maximizar os resultados obtidos.

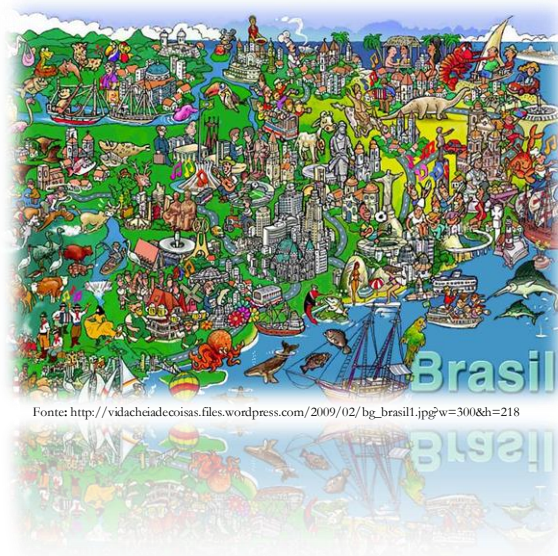


## 1.6. SELECÇÃO DE Y-SNPs

Apesar do interesse nos SNPs do cromossoma Y ser relativamente recente é já aceite pela comunidade científica que a caracterização dos haplogrupos, a partir da análise de Y-SNPs, de uma amostra de um indivíduo masculino permite inferir relativamente à origem geográfica da sua linhagem masculina, entre outras aplicações [27, 22, 9].

Num estudo, a escolha dos Y-SNPs é de importância crucial, não se revelando, no entanto, um processo fácil [5]. A presença quase exclusiva em continentes específicos da maioria dos haplogrupos pertencentes a cada um dos maiores *clades* da “árvore” [2, 7, 34] em conjunto com a necessidade de serem mais informativos, impõe a análise de um maior número de Y-SNPs. Neste contexto, e de modo a viabilizar o estudo de Y-SNPs no âmbito forense, BRIÓN *et al.* (2004, 2005) [3,6] procedeu ao seu agrupamento hierárquico por multiplexes. Deste modo, é evitada a tipagem desnecessária de Y-SNPs, minimizando gastos e rentabilizando tempo, recursos e amostra. Através da análise hierárquica da “árvore”, seguindo os seus ramos, BRIÓN *et al.* (2004, 2005) acredita ser possível a atribuição de haplogrupos a partir do estudo de apenas um ou dois *multiplexes* de Y-SNPs.





### **1.7. HISTÓRIA E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE RIBEIRÃO PRETO, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL**

A história de Ribeirão Preto é naturalmente indissociável da do Estado (Estado de São Paulo) e país a que pertence (Brasil).

O Estado de São Paulo é um dos vinte e dois estados federados que separam política e administrativamente o Brasil. Com uma área de 239 177 km<sup>2</sup>, o Estado de São Paulo apresenta-se limitado geograficamente a Norte pelo Estado de Minas Gerais, a Nordeste pelo Estado do Rio de Janeiro, a Este pelo oceano Atlântico, a Sul pelo Estado

do Paraná e a Oeste pelo Estado de Mato Grosso (Figura 5). Com cerca de 37 032 403 habitantes, é o estado mais populoso do Brasil e apresenta-se dividido em 645 municípios. Entre estes encontra-se o município de Ribeirão Preto [16, 55, 59].

Localizado no interior do Estado de São Paulo (Figura 6), com uma população estimada de 563 107 habitantes, é o nono município mais populoso [55].



Figura 5 – Mapa político do Brasil.

A história do Estado de São Paulo está inevitavelmente relacionada com a história do Brasil. Este país da América do Sul deve a sua descoberta à expedição do português Pedro Álvares Cabral, em 22 de Abril de 1500. O território do actual estado de São Paulo era habitado por vários grupos linguístico-culturais de nativos indígenas. Em 1501, teve início o descobrimento do litoral paulista com a expedição exploradora portuguesa. A população passou a ser constituída por nativos indígenas e por um número reduzidíssimo de portugueses, franceses e espanhóis em feitorias comerciais estabelecidas numa dezena de pontos do litoral. Apenas a 21 de Janeiro de 1532, com a fundação de S. Vicente, no litoral de São Paulo, começou o povoamento efectivo do Brasil pela coroa portuguesa. Teve então início uma agricultura de subsistência, baseada na mão-de-obra indígena escravizada que formou a economia da região [59].

Em meados do primeiro século da colonização, o tráfico de escravos levou à introdução na população de negros africanos. Durante os três primeiros séculos de colonização, o número de índios e mamelucos superou muito o dos europeus. A imigração portuguesa intensificou-se no século XVI, devido ao regime de capitanias hereditárias e à ocupação efectiva do território pelo governo-geral, e mais ainda no final da segunda metade século XVII com a descoberta de minas de ouro [16, 59].

Com a chegada da família Real portuguesa ao Brasil, em 1808, teve lugar uma série de reformas e alterações que vieram beneficiar e contribuir para o grande desenvolvimento de São Paulo.

Assim, na passagem do século XVIII para o XIX, verificou-se uma mudança da economia paulista com a grande expansão dos cafezais, o que levou a uma série de grandes transformações infraestruturais que, em simultâneo com a abolição da escravatura em 1888, levariam à chegada em massa de imigrantes europeus. Além de terem resolvido o problema de mão-de-obra da lavoura cafeeira, estes imigrantes permitiram uma maior ocupação do interior do estado. Entre estes, predominaram os italianos, portugueses, espanhóis, alemães e japoneses [16, 59].



**Figura 6** – Esquema representativo da localização de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo e deste no Brasil.

Foi precisamente neste ambiente que, no final do século XVIII e início do século XIX, teve início o grande movimento de povoamento de Ribeirão Preto, com a ocupação dos primeiros habitantes: mineiros incentivados na procura de novos locais para desenvolver uma nova actividade, a agropecuária. Esta deslocação, em conjunto com a chegada da linha férrea a Mogiana (1883), impulsionou a expansão da cultura cafeeira, criando a imediata necessidade de mão-de-obra. Desta resultou uma explosão no crescimento da população com grande contribuição de escravos que chegaram a totalizar 15% da população [16, 57, 60].

O final do século XIX e início do século XX marcou um período de transformações mundiais. Guerras e revoluções resultavam em desemprego e fome na Europa. A informação de uma terra nova e cheia de oportunidades chegava além-mar, o que levou a uma grande onda de imigração europeia, contribuindo para o branqueamento da população que se miscigenara no período colonial, principalmente com o índio. Só com o ciclo do café houve uma mestiçagem apreciável com o negro, antes escassa. Verificou-se

também uma migração de brancos e negros de Minas Gerais e do Noroeste, em busca de trabalho [10].

Assim, após assinatura, a 13 de Maio de 1888, da Lei Áurea, o governo da província de São Paulo passou a estimular a vinda de imigrantes europeus, provocando em Ribeirão Preto um grande aumento populacional, muito maior do que o registado nos outros municípios da região durante esse período, podendo a contribuição estrangeira chegar a 63% da população. Nesta, a grande percentagem refere-se a italianos, seguidos, com uma tributo significativamente menor, portugueses, espanhóis e também austríacos. A mentalidade empreendedora destes revolucionou Ribeirão Preto, transformando-o num centro de comércio e indústria [60].

Na primeira metade do século XX, Ribeirão Preto continuou a atrair imigrantes nacionais e internacionais, sendo de destacar chegada de um número muito significativo de japoneses. Também é expressiva a vinda de árabes, especialmente sírios-libaneses. O município também atraiu durante esse século pessoas de todo o estado de São Paulo e de todo o Brasil, sendo os mais numerosos, de acordo com o censo 2000, os mineiros, paranaenses e baianos [57, 58, 60].

Assim, no início do século XX a maioria absoluta do Estado de São Paulo era composta por italianos, seguidos dos portugueses, espanhóis, alemães, japoneses e outros, o que vinha ao encontro da ideologia dominante da época, que acreditava que o desenvolvimento e modernização da sociedade seriam produto do crescimento da população branca em detrimento dos negros e índios [59].

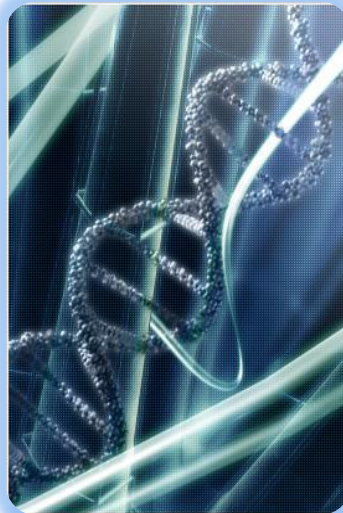
Hoje, o Brasil, como todos os outros países da América do Sul, tem uma população heterogénea do ponto de vista étnico, embora com predominância do tipo físico europeu e da cultura ocidental. A base da mistura cultural paulista é o Mundo. No início da imigração, homens e mulheres de mais de 60 países estabeleceram-se em São Paulo em busca de oportunidades. Hoje estima-se que São Paulo seja a terceira maior cidade italiana do mundo, a maior cidade japonesa fora do Japão, a terceira maior cidade libanesa fora do Líbano, a maior cidade portuguesa fora de Portugal e a maior cidade espanhola fora de Espanha. A mistura de raças, etnias e culturas acentuou-se com o passar do tempo e marcou profundamente a vida cultural, social e económica da cidade e do estado [55].

Muito embora a revelação de *Alex Jeffreys*, *DNA fingerprinting*, tenha sido inovadora e absolutamente marcante, foi fundamentalmente após a divulgação da técnica desenvolvida por *Kary Mullis*, Reacção de Polimerase em Cadeia (PCR), que o estudo do DNA teve a sua explosão, com aplicações revolucionárias não só na genética forense como também na genética clínica e populacional. A análise de vestígios biológicos obtidos a partir de cenas crime, assim como de amostras biológicas em investigação biológica de paternidade e acidentes de massa, tornou-se verdadeiramente uma realidade. Desde então, bases de dados para fins criminais foram e continuam a ser desenvolvidas, assim como bases de dados populacionais que, em conjunto com as técnicas padronizadas e os kits comerciais, transformaram o DNA numa peça indispensável para um correcto funcionamento de algumas áreas da justiça e medicina.

Ultrapassados os maiores obstáculos, os cientistas e investigadores forenses tornaram-se mais exigentes e são confrontados com outros desafios continuamente. Assim, surgem novas abordagens e/ou procedimentos para dar resposta aos problemas, quando as já implementadas na rotina não conseguem dar resposta.

Antes de se proceder à análise do DNA de uma amostra biológica, esta tem que ser recolhida, o seu DNA isolado dos restantes componentes e processado correctamente de acordo com o objectivo do estudo. Todas as precauções e cuidados devem ser considerados em todas as etapas do processamento da amostra, uma vez que são vitais para a obtenção de resultados e interpretação fiel dos dados alcançados, podendo mesmo, caso não se verifiquem, comprometer o sucesso da investigação, seja ela criminal, de filiação ou mesmo um estudo populacional [13].

Assim, ao ser colhida, a amostra deve ser devidamente identificada, preservada e transportada (se necessário) antes de se proceder a qualquer tipo de análise de DNA no laboratório. No âmbito de amostras para fins forenses, deve igualmente ter-se sempre presente o cumprimento da cadeia de custódia, sob pena de comprometer a sua validade em tribunal.



Fonte: [http://www.if-test.com/images/self\\_promo\\_skyscraper.jpg](http://www.if-test.com/images/self_promo_skyscraper.jpg)

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, o processamento das amostras envolveu as seguintes fases:

- .1. Colheita e armazenamento
- .2. Extração de DNA
- .3. Minisequenciação
- .4. Separação e detecção do produto minisequenciado
- .5. Designação de haplogrupos e análise estatística

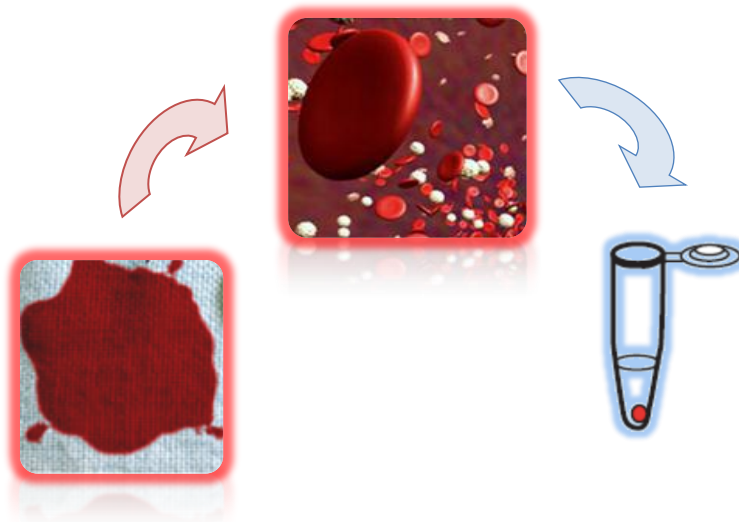


Fonte: <http://www.consumergenetics.com/images/3-step-blood-collection.png>,  
<http://www.whatman.com/References/FTAforBloodDNA%20DataSheet%20FINAL%203.25.10%20LR.pdf> e  
[http://www.securityandsafetysupply.com/media/department\\_supplies\\_images/images4-4980a\\_sml.jpg](http://www.securityandsafetysupply.com/media/department_supplies_images/images4-4980a_sml.jpg)

## 2.1. COLHEITA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Neste estudo, 81 indivíduos do sexo masculino, saudáveis e não relacionados, da população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil) consentiram a colheita de uma amostra sanguínea, a qual foi colocada em tecido de algodão branco, formando uma mancha de sangue. Posteriormente, para se evitar a degradação das amostras que pode inviabilizar a obtenção de resultados, a mancha de sangue foi completamente seca ao ar livre antes de ser acondicionada em envelopes de papel e enviada para o laboratório do Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, onde foi armazenada em local seco, aguardando análise.

Nas etapas de colheita, secagem, acondicionamento e armazenamento das amostras, tomaram-se todas as precauções de modo a manter a sua integridade biológica, evitando igualmente a sua contaminação, através da utilização de luvas de látex descartáveis durante o seu manuseamento e do cumprimento de todas as normas de boa conduta laboratorial [13].



Fonte: [http://www.dna.gov/rawmedia\\_repository/56020491\\_46f2\\_455a\\_a3c9\\_adfe6d83e412](http://www.dna.gov/rawmedia_repository/56020491_46f2_455a_a3c9_adfe6d83e412) e <http://www.assureimmune.com/portugues/img/img-bank-services3.jpg> e <http://www.whatman.com/References/FTAforBloodDNA%20DataSheet%20FINAL%203.25.10%20LR.pdf>

## 2.2. EXTRACÇÃO DE DNA: *CHELEX® 100*

Quando se pretende estudar o DNA de uma determinada amostra biológica, este não está isolado e purificado, pronto a ser analisado. Pelo contrário, encontra-se no interior do núcleo de células, associado a outros seus constituintes, nomeadamente proteínas que o envolvem (protegendo-o do ambiente celular) e que, por sua vez, podem inibir a sua capacidade de análise [13].



Dadas as características específicas dos marcadores bialélicos e natureza particular dos casos forenses em que se verifica a necessidade de recorrer ao estudo daqueles, a eliminação de qualquer elemento contaminante que possa interferir com a análise do DNA é crucial para o seu sucesso. De facto, a amplificação por reacção de polimerase em cadeia (PCR) constitui uma técnica de grande sensibilidade, pelo que a presença de contaminantes na amostra pode interferir no emparelhamento do *primer* com o DNA molde ou no próprio funcionamento da *DNA polimerase*. Nessa medida, para se proceder à análise do DNA da nossa amostra, é necessário separá-lo dos restantes constituintes celulares [56], podendo utilizar-se para o efeito diversos métodos de extracção de DNA.

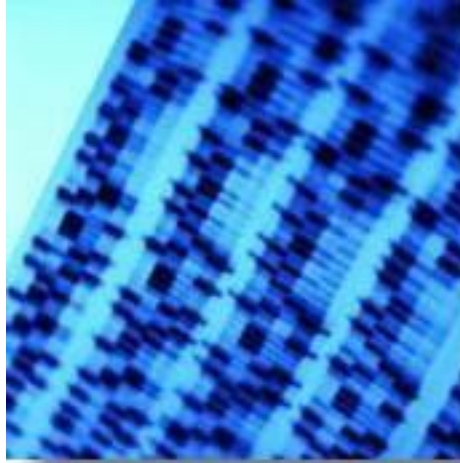
Neste estudo foi utilizado o método de extracção por *Chelex*® 100 (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*). Após a sua introdução na comunidade forense, em 1991, o *Chelex*® 100 ganhou desde logo uma enorme aceitação [12]. Para tal, contribuíram várias características deste método, sendo de realçar a sua capacidade de inactivar a acção de contaminantes e inibidores, como grupos heme e outras proteínas, e de possibilitar a desnaturação da molécula de DNA de cadeia dupla. Sendo esta etapa de análise forense de DNA a mais susceptível de contaminação, a aplicação de um método simples, rápido e que utiliza um só tubo para todo o processo de extracção (diminuindo o potencial de contaminação laboratorial da amostra) foi um factor essencial para a sua aceitação [13].

O *Chelex*® 100 [54] é uma resina quelante trocadora de iões que é adicionada sob a forma de suspensão às amostras [40]. É composto por copolímeros de estireno-divinilbenzeno com iões iminodiacetato emparelhados. Estes actuam como grupos quelantes, ligando-se a iões metálicos polivalentes (como magnésio) que degradam o DNA [10]. A consequente ausência de magnésio da reacção inactiva as nucleases<sup>1</sup>, protegendo assim as moléculas de DNA. O pH de 10-11 da solução de *Chelex*® 100 e a exposição das amostras a temperaturas de 100°C levam ao rompimento da membrana celular, desnaturação das moléculas de DNA de cadeia dupla, e destruição de proteínas celulares [46].

Depois de se proceder à secagem das manchas de sangue por exposição ao ar livre, conforme anteriormente referido, foi possível iniciar o processo de extracção de DNA, através do protocolo de extracção por *Chelex*® 100 apresentado em anexo (anexo I).

---

<sup>1</sup> Nucleases são enzimas responsáveis pela degradação do DNA por ruptura das suas ligações fosfodiéster.



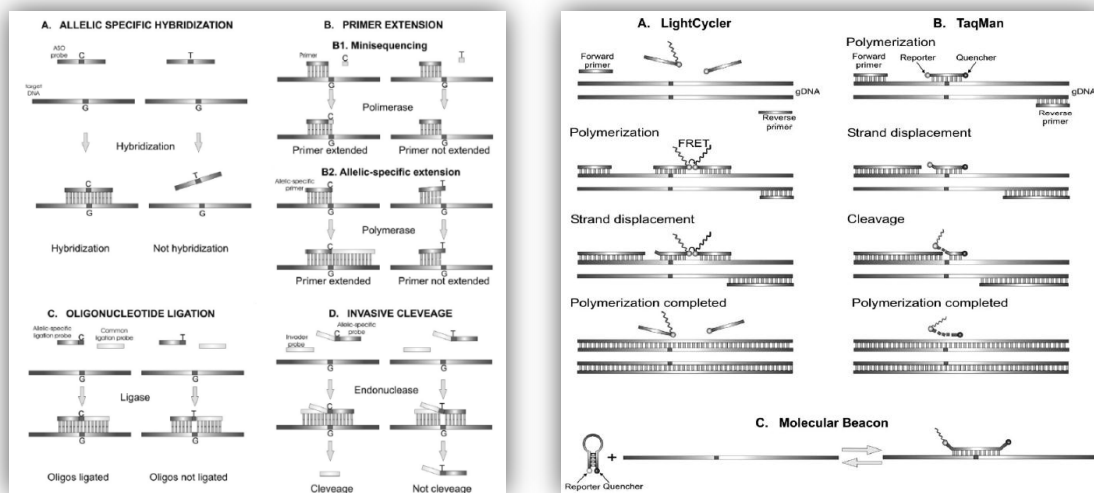
Fonte: [http://www.orlandoinvestigations.com/images/dna\\_lab\\_testing\\_167.jpg](http://www.orlandoinvestigations.com/images/dna_lab_testing_167.jpg)

## 2.3 A GENOTIPAGEM DE Y-SNPs

### 2.3.1 A GENOTIPAGEM DE Y-SNPs: METODOLOGIAS

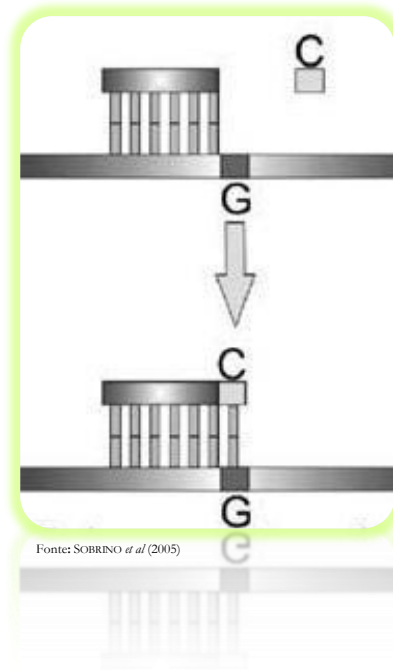
Nos últimos anos, com o despertar do interesse crescente da comunidade científica em geral, e forense em particular, para o estudo dos Y-SNPs, muitas têm sido as tecnologias desenvolvidas, com diversificados métodos para discriminação dos alelos e plataformas de detecção [43]. Apesar de ainda nenhuma ter alcançado o consenso geral e a escolha da técnica a utilizar revelar-se cada vez mais difícil [24], o *SNaPshot<sup>TM</sup> Multiplex kit* da *Applied Biosystems* tem-se revelado a tecnologia mais adequada, sendo actualmente a mais utilizada nos laboratórios forenses.

A generalidade das metodologias para genotipagem de SNPs pode basear-se, para a discriminação alélica, em quatro princípios de mecanismo molecular diferentes: hibridação de alelos específica (i), extensão de *primer* (ii), ligação oligonucleotídica (iii) ou por clivagem invasiva (iv) (Figura ). Do mesmo modo, várias são as plataformas disponíveis para a sua detecção, entre as quais: através de reacção de fluorescência (por electroforese e *arrays*), luminescência, espectrometria de massa, FRET, entre outras (Figura 7). Entre os métodos mais populares para genotipagem de Y-SNPs destacam-se: pirosequenciação [2, 19, 31] (i), SNaPshot (ii), *Biplex invader*, baseada em *microarray* (como os *micro chips*) [3] ou *TaqMan* com detecção a partir de PCR em tempo real [25], electroforese ou por MALDI-TOF MS [29, 43].



**Figura 7** – Representação esquemática das principais metodologias para o estudo de SNPs.

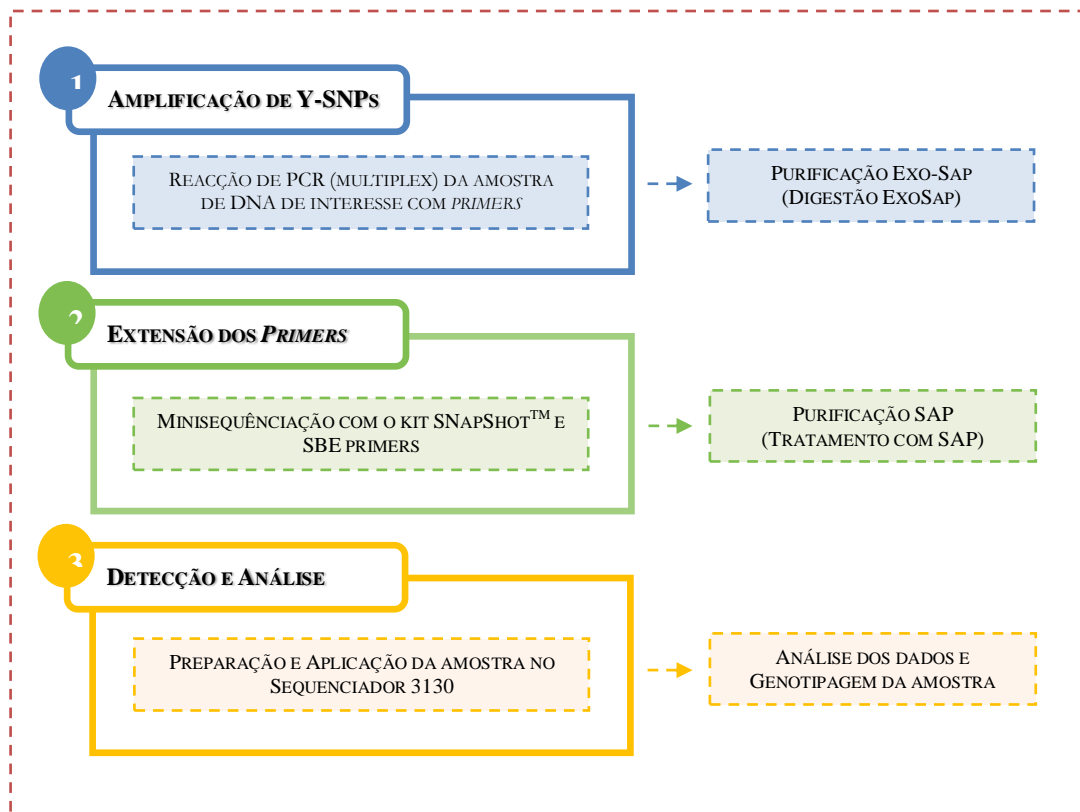
Assim, vários são os sistemas de genotipagem e detecção de SNPs disponíveis actualmente para o estudo e detecção de SNPs. Todas elas apresentam inúmeras vantagens e desvantagens, não existindo, ainda uma unanimidade científica internacional, apesar do número crescente de estudos comparativos [35]. Deste modo, torna-se muito importante que, no momento da selecção do método a aplicar para análise dos Y-SNPs, se tenham presentes as características singulares destes marcadores, que os tornam únicos, e confirmar que o método se encontra adaptado à sua peculiar aplicabilidade. Assim, e para que seja possível a sua inclusão na rotina forense, idealmente aquele deverá apresentar elevada eficiência na análise de uma quantidade ínfima de DNA, assim como boa capacidade para *multiplex*, sensibilidade, rigor, automatização, elevada capacidade de tempo de resposta no processamento dos dados e uma boa relação custo-eficiência [9, 21, 22, 29].



### 2.3.2 A GENOTIPAGEM DE Y-SNPs: MINISEQUENCIAÇÃO COM *SNAPSHOT™ KIT (APPLIED BIOSYSTEMS)*

À semelhança de outros estudos previamente publicados e tendo já sido comprovada a sua adequação para a análise de Y-SNPs [22], neste trabalho a metodologia escolhida foi a genotipagem por minisequenciação através do *SNaPshot™ Multiplex kit (Applied Biosystems)*. A reacção de extensão a partir de uma base nucleotídica de um primer oligonucleotídico através de didesoxirribonucleosídeos trifosfatados (ddNTPs) marcados, seguida de detecção electroforética por fluorescência, tem-se revelado uma técnica simples,

eficiente, requerendo os instrumentos que estão normalmente disponíveis num laboratório forense [26], perfeitamente adaptada à análise de amostras muito degradadas ou com pequenas quantidades de DNA [22,26]. Outra característica de extrema importância na aplicação desta técnica no âmbito forense, é a sua capacidade de *multiplex*, uma vez que será necessária para a análise de genotipagem de um maior número de marcadores [5, 6,23,31], dado o grau de polimorfismo e capacidade de discriminação destes marcadores.



**Figura 8** – Esquema geral do estudo de Y-SNPs por genotipagem através do *ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex kit* (*Applied Biosystems*).

Este não será ainda o método ideal para a genotipagem de Y-SNPs, uma vez que será necessário melhorar alguns aspectos como, *v.g.*, por exemplo a morosidade que a optimização do desenho e concentração de *primers* para todas as reacções de amplificação envolvidas para cada conjunto de SNPs pode apresentar, as dificuldades que se verificam na detecção, análise e interpretação de misturas [37,39], e o facto de os dados relativos à distribuição de haplogrupos e suas frequências nas populações serem ainda escassos. No entanto, actualmente a tecnologia de minisequenciação, principalmente através deste kit de genotipagem da *Applied Biosystems*, é o método mais utilizado nos laboratórios forenses [37].

Deste modo, a estratégia de genotipagem (representada na Figura 8) decorre em várias fases. A primeira consiste numa reacção de amplificação por PCR dos *multiplexes*

definidos, de acordo com a abordagem desenvolvida por BRIÓN *et al.* (2004) [3], seguida de uma purificação do produto amplificado por acção de *ExoSap-IT*<sup>®</sup> (Usb<sup>®</sup>) para remoção dos desoxirribonucleotídeos trifostatados (dNTPs) e *primers* não incorporados. Posteriormente, tem lugar a reacção de minisequenciação através do *ABI Prism*<sup>®</sup> *SNaPshot*<sup>™</sup> *Multiplex kit* (*Applied Biosystems*), verificando-se a extensão do *primer* numa única base (SBE – *single base extension*) na presença de 4 ddNTPs marcados com fluorescência, tendo os ddNTPs não incorporados sido removidos por tratamento enzimático utilizando a SAP (*Roche*<sup>®</sup>). Finalmente, a detecção por fluorescência dos produtos SBE teve lugar por electroforese capilar no *ABI Prism*<sup>®</sup> *3130 Genetic Analyzer* e *ABI Prism*<sup>®</sup> *310 Genetic Analyzer* [11,18].

**Tabela II.1** – Relação dos SNPs do cromossoma Y aplicados neste estudo, sua distribuição por multiplex [de acordo com BRIÓN *et al.* (2004)], indicação da sua alteração nucleotídica no caso de mutação, e respectiva detecção.

Y-SNP	Multiplex	Detecção	Mutação
SRY1532	<i>Multiplex 1</i>	A — G	A → G
M213		A — G	T → C
M9		C — G	C → G
M70		T — G	A → C
M22		A — G	A → G
Tat		A — G	T → C
92R7		TC — T	G → A
M173		A — C	A → C
P25		C — A C	C → A
M170	<i>Multiplex 2</i>	T — G	A → C
M62		A — G	T → C
M172		T — G	T → G
M26		C — T	G → A
M201		G — T	G → T

De acordo BRIÓN *et al.* (2004) com este autor, respeitando a estratégia hierárquica da “árvore” [19,20,38], considerando os dados históricos e estudos anteriormente publicados relativos à população em estudo [38] e de acordo com a sua localização na respectiva árvore, foram escolhidos 14 Y-SNPs: SRY1532, M213, M9, M70, M22, TAT,

92R7, M173, P25, M170, M62, M172, M26 e M201 (Tabela II.1), distribuídos por 2 *multiplexes*, para se identificarem os principais haplogrupos da população de Ribeirão Preto, do Estado de São Paulo, Brasil, e deste modo, caracterizá-la, tornando-a numa ferramenta credível em investigações forenses.

Apesar de se basearem no mesmo princípio e esquema geral de processamento de amostras, os protocolos experimentais podem variar entre os *multiplex* utilizados. Esta variação, que se verificou no presente estudo, está principalmente relacionada com a diferente composição nucleotídica dos polimorfismos em análise, assim como dos diversos *primers* que intervêm nas várias reacções. Na Figura 9 está representado o protocolo experimental utilizado para o estudo dos Y-SNPs que compõem o *multiplex* 1: SRY1532, M213, M9, M70, M22, TAT, 92R7, M173 e P25, e na Figura 10 o equivalente para *multiplex* 2: M170, M62, M172, M26 e M201.

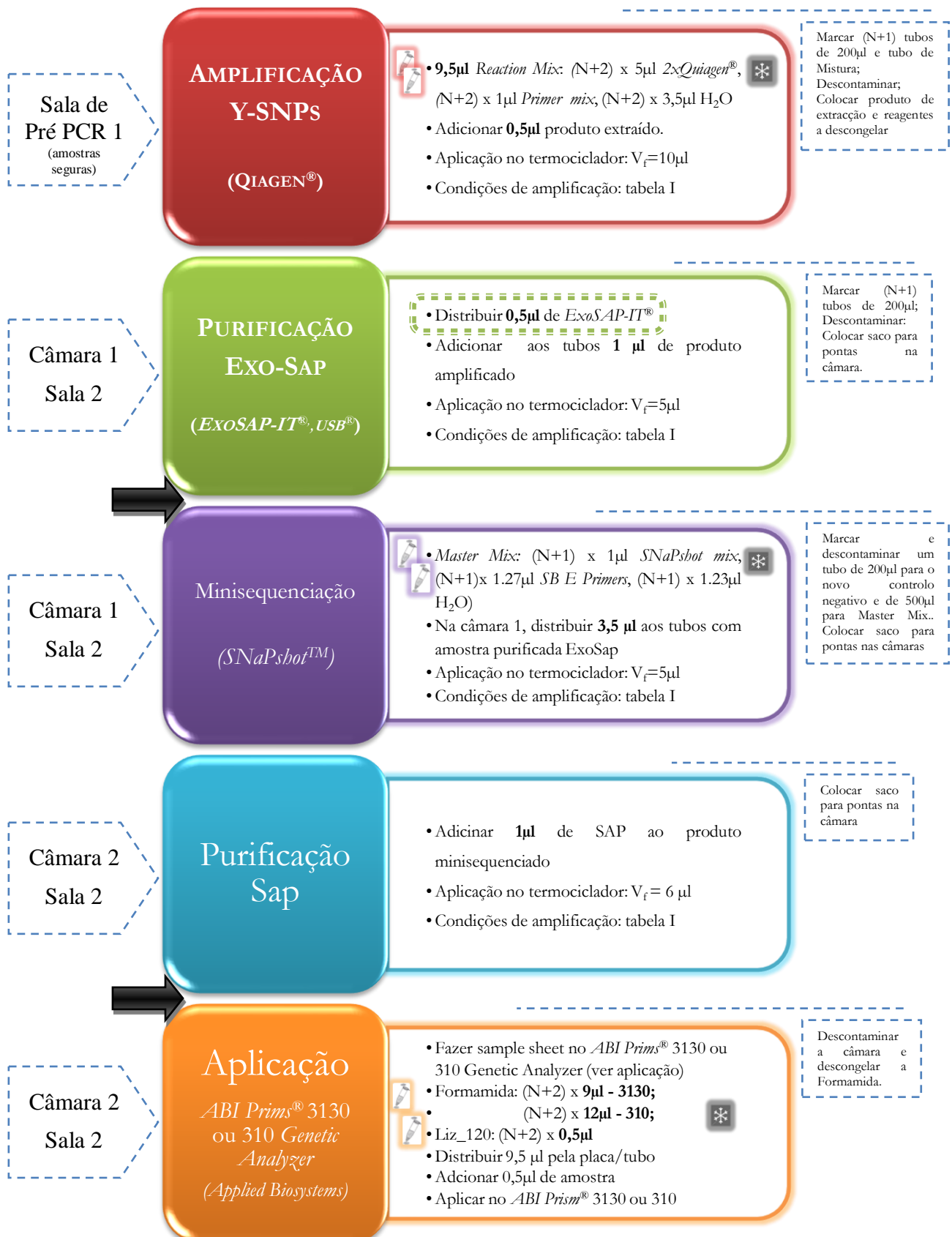
**MULTIPLEX1**

Figura 9 – Protocolo experimental para estudo de Y-SNPs para *Multiplex 1*.

\* - reagente congelado; - processo de *vortex* e *spin* fundamentais; - possível interromper a sequência de reacções



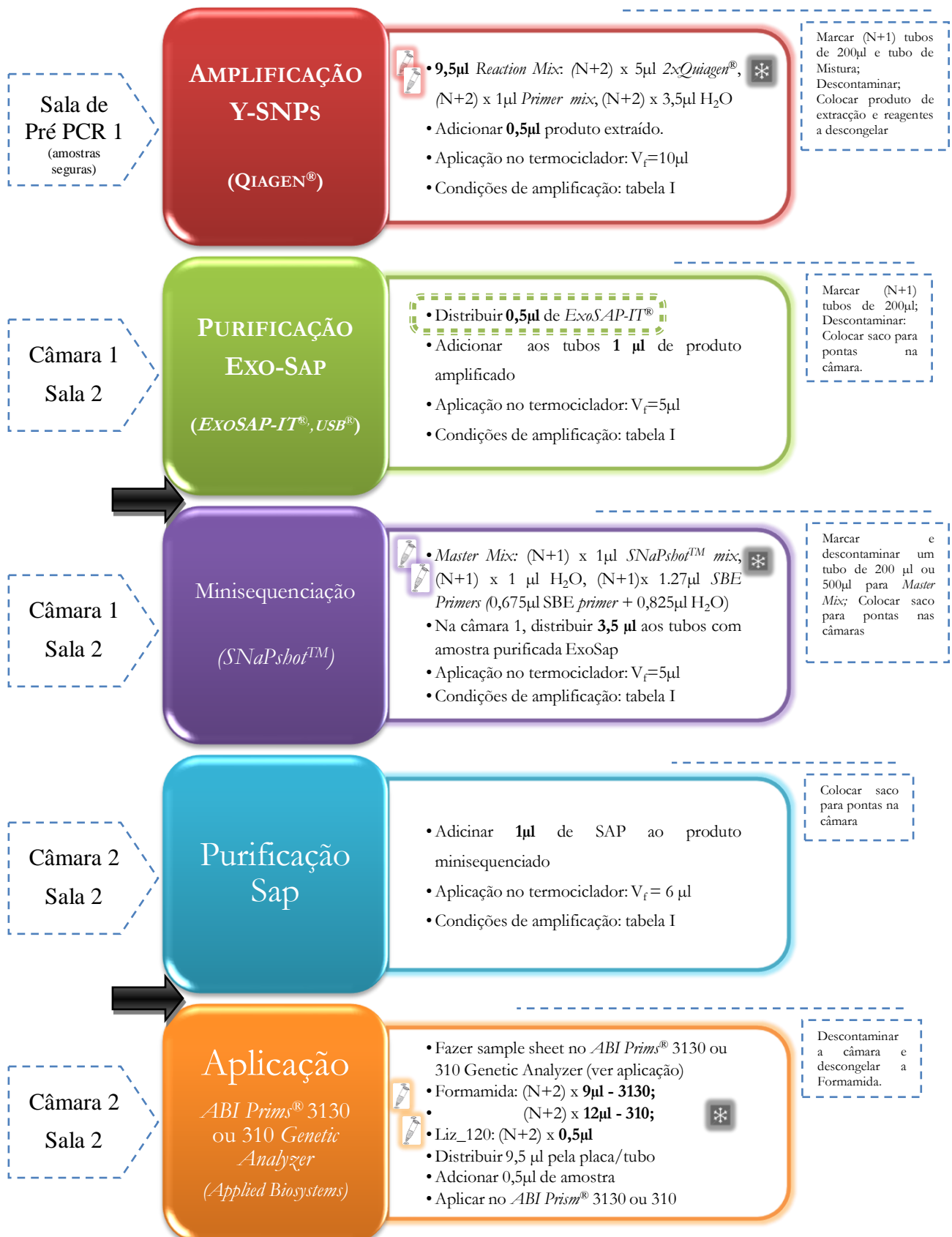
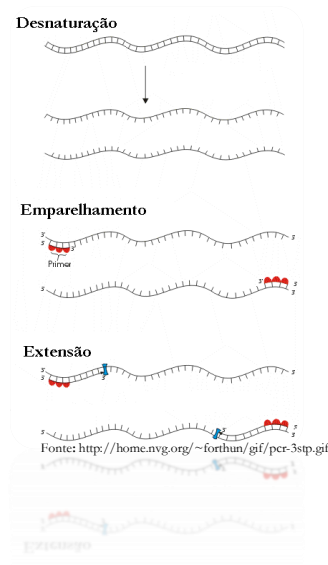
**MULTIPLEX 2**

Figura 10 – Protocolo experimental para estudo de Y-SNPs para Multiplex 2.

\* - reagente congelado; - processo de *vortex* e *spin* fundamentais; - possível interromper a sequência de reacções



### 2.3.2.1. AMPLIFICAÇÃO DE Y-SNPs: PCR

Após extração do DNA, a amostra está pronta para ser estudada. A detecção de Y-SNPs no genoma humano implica uma prévia amplificação da região que flanqueia o local variável [37]. Assim, neste trabalho, a primeira etapa para a genotipagem de Y-SNPs consistiu numa reacção *multiplex* de amplificação por PCR, da sequência em torno do local polimórfico de cada Y-SNP em estudo [10]. Após obtenção dos pequenos fragmentos, estes serviram de molde para as reacções seguintes, dando continuidade ao seu processamento, de acordo com a metodologia escolhida.

Nos anos oitenta, teve lugar uma grande descoberta ao nível da biologia molecular com a apresentação, em 1985, por Kary B. Mullis, de uma nova tecnologia de amplificação de DNA, conhecida por PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction* – “Reacção de Polimerização em Cadeia”) que logo se tornou num método indispensável em áreas tão vastas como desde a arqueologia até à prática diária de diagnóstico médico. Dada a sua capacidade de gerar milhões de cópias de uma sequência específica de DNA em apenas algumas horas, a partir de uma amostra de DNA ínfima ou mesmo degradada, a PCR revolucionou a ciência forense de tal modo que se pode afirmar ser o marco de uma nova era. Nos laboratórios forenses, é frequente que as amostras a processar se apresentem muito degradadas, contaminadas ou com quantidades muito pequenas de material. Até então, o seu estudo não era possível ou de extrema dificuldade. Assim, a técnica de PCR veio permitir a análise destas amostras, conferindo aos laboratórios as valências para que estes possam contribuir positivamente nas investigações forenses, fornecendo resposta credível às solicitações dos tribunais e elementos de investigação criminal.

A PCR consiste num processo enzimático, no qual uma região específica do DNA é replicada sucessivamente para originar muitas cópias de uma sequência particular [SAIKI *et al.* (1988), REYNOLDS *et al.* (1991)]. Para que possa ser aplicada, esta metodologia apresenta como requisitos a presença, em simultâneo, de uma amostra de DNA com a região polimórfica (com extremidades de sequências conhecidas) (i), pares de *primers*<sup>2</sup> e desoxinucleótidos trifostatos (dNTPs) (ii), uma *DNA polimerase* termoestável a temperaturas superiores a 72°C (*Taq polimerase*) (iii), bem como uma solução tampão adequada, contendo iões de Mg<sup>2+</sup> (iv), e um termociclador (v). Neste último, a amostra é submetida a sucessivos ciclos de amplificação nas mesmas condições. Cada ciclo tem início assim que é atingida a temperatura de desnaturação da molécula de DNA de interesse, na qual a dupla cadeia se separa em duas cadeias simples por ruptura das ligações de hidrogénio e outras forças que estabilizam a dupla hélice. Nesta forma de cadeia simples, o DNA pode actuar como molde na fase de síntese. Seguidamente, a temperatura é reduzida para a temperatura de emparelhamento e a molécula de DNA mantém-se desnaturada, uma vez que as cadeias complementares estão a uma concentração muito baixa. Pelo contrário, os pares de pequenos oligonucleótidos complementares às extremidades 3' do segmento de DNA de interesse, que se encontram a elevadas concentrações, emparelham com as

---

<sup>2</sup> *Primers* são pequenas sequências de ácidos nucleicos (oligonucleótidos) com o grupo hidroxilo 3' livre. São complementares à extremidade 3' do segmento de DNA-alvo a amplificar, com o qual estabelecem ligações de hidrogénio entre os pares de bases (hibridizam), flanqueando essa região de interesse, e funcionam como ponto de partida para a adição de nucleótidos para que a cadeia molde seja copiada por uma *DNA polimerase*.

respectivas sequências complementares no DNA de interesse. Os oligonucleótidos emparelhados delimitam assim a região a ser amplificada e servem depois como iniciadores na síntese da nova cadeia de DNA. A fase de síntese de DNA tem início à temperatura de alongação, na presença de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) e da *Taq polimerase*<sup>3</sup>. Esta *DNA polimerase* termoestável a elevadas temperaturas estende a nova cadeia de DNA a partir da extremidade 3' dos *primers* por polimerização de dNTPs, na direcção 3' para 5' do fragmento molde restrito [12].

Após a síntese estar completa, toda a mistura é novamente aquecida para desnaturar as novas cadeias de DNA, iniciando-se mais um ciclo de desnaturação-emparelhamento-síntese. Este ciclo é repetido várias vezes no termociclador, automaticamente.

Para que a PCR seja bem sucedida, os *primers* devem ser desenhados de modo a que a sua sequência seja complementar (e não idêntica) à sequência da região da molécula de DNA que flanqueiam, mas não complementares entre si. De igual modo, devem ser desenhados de forma a maximizar a estabilidade da ligação ao DNA molde e com as extremidades 3' de um par na direcção uma da outra. A termoestabilidade da *Taq polimerase* e as temperaturas precisas utilizadas nas fases de aquecimento e arrefecimento de cada ciclo da reacção são igualmente determinantes para o êxito da amplificação.

Apesar de inovadora, esta nova metodologia apresenta algumas limitações que podem dificultar a análise ou mesmo inviabilizar a obtenção de resultados. Entre estas, é de destacar o problema da contaminação da amostra. Assim, se a PCR for contaminada por DNA estranho, este pode emparelhar com os *primers*, mesmo que só parcialmente, e ser amplificado, impedindo que estes se liguem ao DNA alvo e diminuindo a eficácia da reacção.

Com a reacção de polimerização em cadeia é possível a amplificação simultânea de mais do que uma região específica da molécula de DNA, através da adição de mais do que um par de *primers* à mistura da reacção. Para que este PCR *multiplex*<sup>4</sup> funcione apropriadamente, é preciso ter em atenção algumas características de compatibilidade dos *primers*, nomeadamente, as temperaturas de emparelhamento dos pares de *primers* que devem ser semelhantes [10].

---

<sup>3</sup> *Taq polimerase* é uma *DNA polimerase I* isolada a partir da bactéria *Thermus aquaticus*, organismo que vive em fontes termais a altas temperaturas. Esta enzima é termoestável, sendo resistente à temperatura aplicada durante cada ciclo de PCR para desnaturar o DNA por tratamento com calor. A termoestabilidade da *Taq polimerase* é um requisito essencial na metodologia de PCR.

<sup>4</sup> A PCR *multiplex* é uma técnica para a amplificação simultânea de múltiplos alvos de DNA, utilizando múltiplos pares de primers na mesma reacção de PCR.

A PCR tem sido simplificada nos últimos anos pela disponibilidade de *kits* comerciais de amplificação contendo uma mistura de PCR pré-feita dos componentes necessários para a amplificação. A *QIAGEN*<sup>®</sup> desenvolveu um desses *kits* de amplificação de PCR, o *QIAGEN*<sup>®</sup> *Multiplex PCR kit*, utilizado neste estudo. Os elementos que compõem este *kit* estão descritos na Tabela II.2 [49] e não incluem os *primers*, uma vez que não são fornecidos com o kit comercial. Os *primers* utilizados nesta etapa de processamento estão caracterizados na Tabela II.3, de acordo com o estudo de BRIÓN *et al.* (2004) [3]. Cada *primer* apresenta-se na mistura com uma concentração de 2 $\mu$ M (0,2 $\mu$ M na reacção), de acordo com instruções do fabricante.

**Tabela II.2** – Composição do *QIAGEN*<sup>®</sup> *Multiplex PCR kit*.

<b><i>QIAGEN</i><sup>®</sup> <i>Multiplex PCR kit</i></b>	
2x <i>QIAGEN</i> <sup>®</sup>	<i>HotStarTaq DNA Polymerase</i>
<i>Multiplex PCR</i>	<i>QIAGEN</i> <sup>®</sup> <i>Multiplex PCR Buffer</i>
<i>Master Mix</i>	dNTP <i>Mix</i>
<i>Q-Solution</i>	
Água <i>RNase-free</i>	

O protocolo de amplificação de DNA por PCR com o *Qiagen*<sup>®</sup> *Multiplex kit* utilizado para o estudo de Y-SNPs através da análise dos *multiplexes* 1 e 2 apresenta-se descrito em anexo (anexo 1). O termociclador utilizado neste estudo foi o *GeneAmp*<sup>®</sup> *PCR System 2700* da *Applied Biosystems* (Figura 11), com programa de PCR representado na Tabela II.4.



**Figura 11** - Termociclador *GeneAmp*<sup>®</sup> *PCR System 2700* da *Applied Biosystems*.

**Tabela II.3** – Caracterização dos *primers* utilizados na amplificação de Y-SNPs, distribuídos por *multiplex* (de acordo com Brión *et al.* 2004).

SNP	Primer (5'→3')		Tamanho (pb)	
	Directo ( <i>Forward</i> )	Reverso ( <i>Reverse</i> )		
<b>92R7</b>	TGCATGAACACAAAGACGTA	GCATTGTAAATATGACCAGC	55	MULTIPLEX 1
<b>M70</b>	TCATAGCCCACTATACTTTGGAC	CTGAGGCTGGACTATAGGG	81	
<b>M22</b>	GCTGATAGTCCTGGTTTCCTA	TGAGCATGCCTACAGCAGAC	106	
<b>Tat</b>	GACTCTGAGTGTAGACTTTGTGA	GAAGGTGCCGTA AAAAGTGTGAA	112	
<b>P25</b>	GGACCATCACCTGGGTAAGT	AGTGCTTGTC CAAGGCAGTA	121	
<b>SRY1532</b>	TCCTTAGCAACCATTAATCTGG	AAATAGCAAAAACTGACACAAGGC	167	
<b>M173</b>	GCACAGTACTCACITTAGGTTTGC	GCAGTTTTCCAGATCCTGA	172	
<b>M213</b>	GGCCATATAAAAAACGCAGCA	TGAATGGCAAATTGATTCCA	208	
<b>M9</b>	GCAGCATATAAAAACTTTCAGG	AAAACCTAACTTTGCTCAAGC	340	
<b>M201</b>	TCAAATTTGTGACACTGCAATAGTT	CATCCAACACTAAGTACCTATTACGAA	144	
<b>M26</b>	AGCAGAAGAGACCAAGACAGC	GACGAAATCTGCAGCAAAAA	147	
<b>M170</b>	TGCAGCTCTTATTAAGTTATGTTTCA	CCAATTACTTTCAACATTTAAGACC	158	
<b>M172</b>	TCCTCATTACCTGCCTCTC	TCCATGTTGGTTTGGAACAG	187	
<b>M62</b>	ACTAAAAACACCATTAGAAACAAAGG	CTGAGCAACATAGTGACCCC	309	

**Tabela II.4** – Condições de PCR para a amplificação dos *multiplexes*.

	TEMPERATURA	DURAÇÃO	DESCRIÇÃO
	95°C	15 min	incubação inicial <sup>5</sup>
35 Ciclos	94°C	30 seg.	Desnaturação
	60°C	1 min e 30 seg	Emparelhamento
	72°C	1 min	Extensão
	72°C	10 min	extensão final
	4°C	+ ∞	etapa final

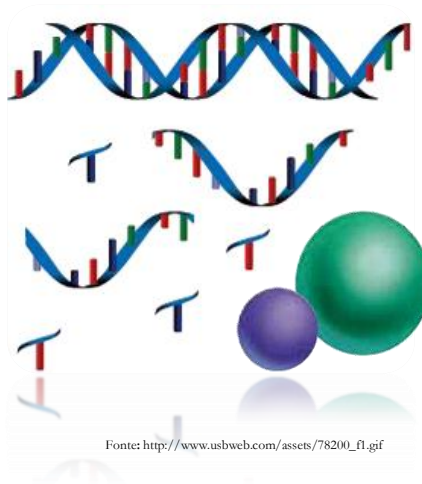
Para evitar problemas de contaminação, as fases que envolvem a pré-PCR e PCR são efectuadas em salas/câmaras diferentes. Deve também ter-se o cuidado de não expor as amostras à luz depois de amplificadas (dado que os fluorocromos<sup>6</sup> ligados aos *primers* são fotossensíveis) e de as armazenar logo depois de retiradas do termociclador a uma

<sup>5</sup> A enzima *HotStarTaq DNA Polymerase* é fornecida no kit em estado inactivo. O programa do termociclador inclui uma incubação inicial de 15 minutos a 95°C para permitir a sua activação.

<sup>6</sup> Fluorocromo é uma molécula com capacidade de fluorescência.

temperatura entre 2 a 6°C, se por um período inferior a 2 semanas, ou entre -15 a -25°C, se por um período superior a duas semanas.

As amostras estão agora prontas para continuar as fases seguintes de processamento.



#### 2.3.2.2. PURIFICAÇÃO EXO-SAP: *EXOSAP-IT*<sup>®</sup> (USB<sup>®</sup>)

Dada a natureza delicada das aplicações forenses dos Y-SNPs, tendo lugar principalmente quando as metodologias já estabelecidas na rotina não permitem resultados conclusivos (como, por exemplo, a análise de amostras fortemente degradadas, ou com quantidades ínfimas de amostra) o modo como as amostras são processadas pode comprometer o sucesso dos resultados. Assim, problemas como contaminação, amplificação e minisequenciação inespecíficas, revelam-se fatais para o estudo destes polimorfismos.



Após a reacção de amplificação por PCR, encontram-se em solução (juntamente com os fragmentos de interesse, os restantes componentes e reagentes intervenientes na PCR) *primers*, dNTPs, enzima e componentes do tampão [27]. Assim, antes de iniciar a reacção de minisequenciação, de modo a evitar a participação dos *primers* e dNTPs não incorporados nas reacções seguintes, e com o intuito de obter o produto específico a partir da extensão do *primer*, o produto amplificado é purificado através da acção conjunta de duas enzimas: Exonuclease I (Exo I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), ambas já disponíveis em conjunto em *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (usb<sup>®</sup>) [7, 33, 37]. A enzima Exo I degrada os *primers* de cadeia simples e qualquer DNA “estranho” de cadeia simples. Por outro lado, a SAP desfosforila os dNTPs que permanecem em solução [57] (Figura 12). A *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (usb<sup>®</sup>) é adicionada directamente aos produtos de amplificação e, dado que é activa nos tampões normalmente utilizados para PCR, após a sua adição, é apenas necessária a sua incubação a 37°C durante 15 minutos e posterior inactivação durante 15 minutos a 80°C, de acordo com as indicações do fabricante [57].

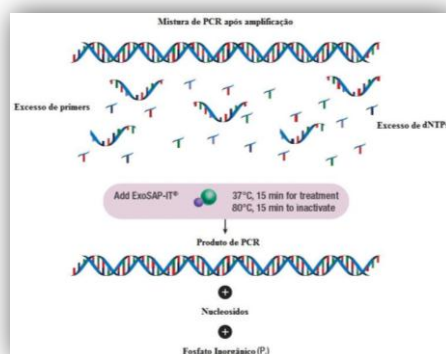
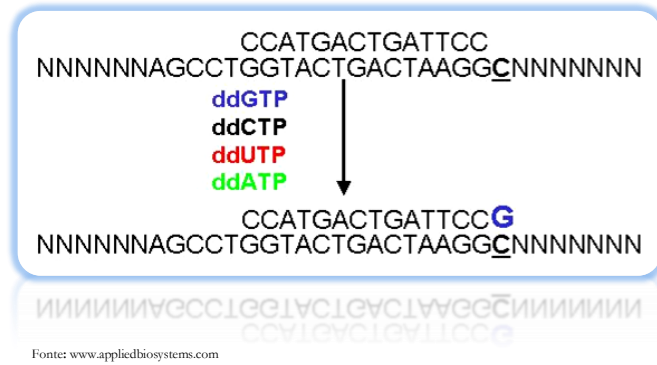


Figura 12 – Esquema de acção de *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (usb<sup>®</sup>).

Assim, após reacção de PCR, 0,5 µl de *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (usb<sup>®</sup>) foram adicionados a 1 µl de produto amplificado, e posteriormente colocados no termociclador *GeneAmp*<sup>®</sup> PCR *System 2700* da *Applied Biosystems* (Figura 11), com o programa indicado na Tabela II.5. Ao fim de 30 minutos, haviam sido removidos os *primers* e inactivados os dNTPs não incorporados.

Tabela II.5 – Programa do termociclador para purificação *Exo-Sap*.

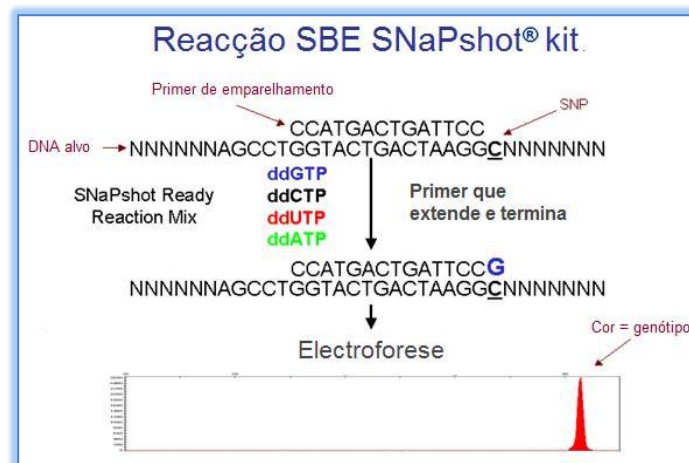
TEMPERATURA	DURAÇÃO
37°C	15 min
85°C	15 min



### 2.3.2.3. REACÇÃO DE MINISEQUENCIAÇÃO: EXTENSÃO NUMA BASE DOS *PRIMERS* (SNAPSHOT™)

A introdução de kits comerciais foi um marco importante na investigação forense, tendo permitido não só uma uniformização dos procedimentos, como comparação de resultados entre laboratórios e a elaboração de sistemas de validação inter-laboratoriais, fundamental para funcionamento da Genética Forense nos dias de hoje. O desenvolvimento de kits comerciais para o estudo de SNPs, em conjunto com o aumento da informação disponível (como por exemplo dados populacionais da frequência e distribuição destes marcadores), irá afirmar os Y-SNPs como possíveis marcadores de eleição nos laboratórios forenses.

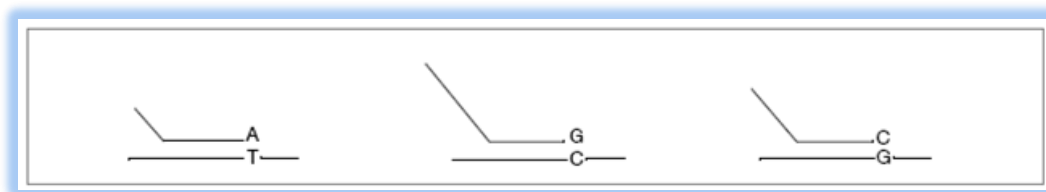
O *SNaPshot<sup>TM</sup> Multiplex kit* (Applied Biosystems) [49] é uma tecnologia com várias aplicações, entre as quais a genotipagem de Y-SNPs por minisequenciação seguida de detecção electroforética por fluorescência [29,5]. O princípio do seu funcionamento consiste na extensão dideoxi, por uma *DNA polimerase*, de uma única base complementar ao local polimórfico [37], a partir de um primer, não marcado, que emparelha com o DNA alvo imediatamente adjacente ao SNP, a qual foi antecedida de uma amplificação por PCR (Figura 13).



**Figura 13** – Esquema geral do processo de minisequenciação por aplicação do *SNaPshot<sup>TM</sup> Multiplex kit* (Applied Biosystems).

Os *primers* são desenhados para emparelhar com a sequência adjacente ao local do SNP. Uma vez posicionado com a sua extremidade 3' a um par de base a montante do polimorfismo relevante (local do Y-SNP), o *primer* emparelhado, não marcado, é estendido numa base por adição do ddNTP complementar (Figura 13). Cada um dos quatro ddNTPs apresenta-se marcado com fluorescência com um fluorocromo distinto, que emite um comprimento de onda diferente que é traduzido numa cor específica para cada base [29]. Deste modo, o resultado consiste em fragmentos que apresentam o mesmo comprimento, diferindo apenas na cor. Para ser possível a análise simultânea de vários Y-SNPs – multiplex – é necessário que os produtos de extensão difiram entre si no seu comprimento, de tal modo que a diferença de tamanho seja detectada e distinguida durante a electroforese [50]. A mobilidade dos oligonucleótidos por electroforese capilar é determinada pelo tamanho, composição nucleotídica e fluorocromo [50]. Assim, para garantir que os *primers* apresentam comprimentos diferentes, pode verificar-se a necessidade de adição de caudas de sequências não homólogas ou emparelháveis — como cauda poli (dT), poli (dA), poli (dC) ou poli (dGACT) — à extremidade 5' dos *primers* (Figura 14), de modo a produzir

moléculas com diferentes tamanhos e prevenindo a sobreposição de marcadores [37,49]. Posteriormente, os produtos da minisequenciação são separados electroforeticamente num sequenciador capilar automatizado de DNA [37].



**Figura 14** – Primers emparelhados ao template e estendidos aos quais foram adicionadas caudas.

Este *kit* da *Applied Biosystems*, que deve ser armazenado a  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-25^{\circ}\text{C}$  num congelador de temperatura constante, é composto por *SNaPshot<sup>TM</sup> Multiplex Ready Reaction Mix* — onde se encontram concentrados num único tubo a enzima *AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polimerase*, tampão da reacção e os ddNTPs marcados com fluorescência (Tabela II.6) — e por dois controlos: *SNaPshot Multiplex Control Primer Mix* e *SNaPshot Multiplex Control Template* [49].

**Tabela II.6** – Distribuição dos fluorocromos pelos ddNTPs e indicação da cor atribuída na sua análise.

ddNTP	FLUOROCROMO	COR DOS DADOS ANALISADOS
<b>A</b>	dR6G <sup>TM</sup>	Verde
<b>C</b>	dTAMRA <sup>TM</sup>	Amarelo <sup>7</sup>
<b>G</b>	dR110 <sup>TM</sup>	Azul
<b>T</b>	dROX <sup>TM</sup>	Vermelho
<i>size standard</i>	LIZ <sup>TM</sup>	Laranja

Após verificada a inactivação dos dNTPs e remoção dos *primers* não incorporados por acção da *ExoSAP-IT<sup>®</sup> (UBS<sup>®</sup>)*, teve início a reacção de minisequenciação como descrito no protocolo apresentado em anexo (anexo II).

Os *primers* utilizados para a reacção de minisequenciação (ou SBE *primers*), apresentam-se descritos na Tabela II.7 (e de acordo com BRIÓN *et al.* (2004) [3]). O programa utilizado no termociclador *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700* da *Applied Biosystems* (Figura 11) consta na Tabela II.8.

<sup>7</sup> Para melhor visualização, a sua cor de representação nos electroforegramas é o preto.

**Tabela II.7** – Caracterização dos SBE *primers* aplicados na reacção de minisequenciação dos Y-SNPs em estudo.

SNP		SBE <i>primers</i>	Tamanho (pb)	Conc. (μM)	
<b>M22</b>	<i>For</i>	CCGCCATTCTGGTGGCTCT	20	0.09	MULTIPLY 1
<b>P25</b>	<i>For</i>	CCCCCCTCTGCCTGAAACCTGCCTG	26	0.15	
<b>92R7</b>	<i>Ver</i>	CCCGCATGATGAACACAAAAGACGTAGAAG	28	0.20	
<b>SRY1532</b>	<i>For</i>	CCCCCTTGTATCTGACTTTTTCACACAGT	30	0.15	
<b>M70</b>	<i>Ver</i>	CCCCCCTAGGGATTCTGTGTGGTAGTCTTAG	34	0.15	
<b>M173</b>	<i>For</i>	CCCCCCCCCTTACAATTCAAGGGCATTAGAAC	34	0.20	
<b>Tat</b>	<i>Ver</i>	CCCCCCCCCCCCCCCCCTCTGAAATATTAATTTAAAACAAC	42	0.20	
<b>M213</b>	<i>Ver</i>	CCCCCCCCCCCCCCCCCTCAGAACTTAAAAATCTCGTTAC	45	0.36	
<b>M9</b>	<i>For</i>	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGAAACGGCCTAAGATGGTTGAAT	48	0.25	
<b>M170</b>	<i>Ver</i>	ACACAACCCACACTGAAAAAA	22	0.45	MULTIPLY 2
<b>M62</b>	<i>Ver</i>	CCCCCCCCAATGTTTGTGGCCATGGA	27	0.50	
<b>M172</b>	<i>For</i>	CCCCCCCCCCCCCAAACCCATTTTGATGCTT	32	0.10	
<b>M26</b>	<i>Ver</i>	CCCCCCCCCCCCCATAGGCCATTAGTGTTCCTG	37	0.25	
<b>M201</b>	<i>For</i>	CCCCCCCCCCCCCGATCTAATAATCCAGTATCAACTGAGG	42	0.05	

**Tabela II.8** – Programa de PCR para a minisequenciação através de *SNaPshot™ kit*.

	TEMPERATURA	DURAÇÃO
25 Ciclos	96°C	10 seg.
	50°C	5 seg.
	60°C	30 min
	4°C	+ ∞



Fonte: [http://www.physorg.com/newman/gfx/news/2006/2-down\\_ent.jpg](http://www.physorg.com/newman/gfx/news/2006/2-down_ent.jpg)

#### **2.3.2.4. PURIFICAÇÃO: TRATAMENTO COM SAP**

Durante o processamento de uma amostra, todas as etapas são importantes e directamente relacionadas com a obtenção e sucesso dos resultados, uma vez que são sequenciais e o produto final de uma é o ponto de partida de outra. Assim, para uma correcta genotipagem dos Y-SNPs, após finalizada a reacção de minisequenciação, torna-se necessário que os [F]ddNTPs não incorporados sejam removidos de modo a evitar a sua co-migração com o fragmento de interesse e, assim, originar fluorescência estranha, criar uma genotipagem incorrecta ou mesmo impossibilitá-la [22, 29, 49].

Neste contexto, ao produto resultante da reacção de SBE é aplicado um tratamento enzimático através de acção da SAP que catalisa a remoção dos grupos 5' fosforil dos ddNTPs não incorporados [29,50]. Esta modificação dos ddNTPs altera o padrão de migração dos que não se encontram incorporados, que, deste modo, deixam de interferir [30].

Dado que a enzima *SAP* é completa e totalmente inactivada por tratamento com calor a 65°C durante 15 minutos, todo o procedimento relacionado com a acção enzimática pode ter lugar num só tubo.

Assim, após reacção de minisequenciação, 1 µl de *SAP* (Roche®) foi adicionado ao produto de SBE, e posteriormente colocados no termociclador *GeneAmp® PCR System 2700* da *Applied Biosystems* (Figura 11) com o programa indicado na Tabela II.9.

Terminada a purificação enzimática por acção da SAP, a amostra encontra-se pronta para a separação electroforética num sequenciador capilar automatizado de DNA e detecção por fluorescência [43]. Se esta não tiver lugar nas 24 horas seguintes, as amostras — que se devem permanecer a 4°C — devem ser armazenadas a -20°C.

**Tabela II.9** – Condições de PCR para a acção enzimática da enzima *SAP*.

TEMPERATURA	DURAÇÃO
37°C	60 min
85°C	15 min



Fonte: <http://www.bristol.ac.uk/news/2009/6394.html/2009-06-05.1681948413/image>,  
[https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/310\\_014.jpg](https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/310_014.jpg) e  
[https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/AB-091304-539\\_s\\_3130.jpg](https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/AB-091304-539_s_3130.jpg)

#### 2.4. DETECÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS SBE: *ABI PRISM® 310 E 3130 GENETIC ANALYZER (APPLIED BIOSYSTEMS)*

Na sequência da minisequenciação por acção de *SNaPshot™ kit* coexistem muitos fragmentos de Y-SNPs que necessitam ser separados, distinguidos e identificados. Encontram-se disponíveis diversas plataformas de separação e detecção de Y-SNPs, entre as quais a separação por electroforese capilar nos sequenciadores automáticos da *Applied Biosystems: ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer* e *ABI Prism® 310 Genetic Analyzer*, utilizados neste estudo.



Desde a introdução em 1995 pela *Perkin-Elmer Applied Biosystems*, o *ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer*, e mais tarde o *ABI Prism<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer*, tornaram-se elementos indispensáveis nos laboratórios forenses. Instrumento de um e quatro capilares, respectivamente, dispõem de detecção por fluorescência multicolor e proporcionam um funcionamento automatizado sem necessidade de vigilância, bem como análise automatizada dos seus resultados através da utilização de *software* adequado [49].

Relativamente a outros métodos de separação e detecção, estas duas plataformas da *Applied Biosystems*, enquanto instrumentos de electroforese capilar, apresentam inúmeras vantagens, sendo de destacar, no âmbito forense, a sua grande sensibilidade e capacidade de análise simultânea de vários sistemas, com múltiplos parâmetros, e complexidade — como se verifica na detecção e separação dos produtos resultantes da minisequenciação *multiplex* marcados com diferentes fluorocromos, permitindo que apenas seja consumida durante o processamento e análise da amostra uma quantidade ínfima de amostra de DNA, que pode ser novamente testada. Isto constitui uma grande vantagem na resolução de casos com interesse forense em que se dispõe apenas de pequenos vestígios. Do mesmo modo, a rapidez do processo de injeção da amostra, bem como informação resultante que se apresenta logo disponível num formato electrónico após a corrida ter terminado, tornam este instrumento indispensável para os estudos forenses.

Os *ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer* e *ABI Prism<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer*, possibilitam o armazenamento da informação electroforética à medida que decorre a migração das amostras, tendo lugar a detecção por laser, devido à fluorescência emitida pelo componente marcado. Cada produto SBE apresenta uma base nucleotídica complementar ao local polimórfico dos Y-SNPs em estudo, marcada com fluorescência. Assim, a fluorescência emitida por cada ddNTP apresenta diferentes comprimentos de onda a que corresponde uma cor específica para cada base [35]. Consequentemente, a determinação da base nucleotídica presente no locus polimórfico tem lugar através da determinação da cor, tamanho e localização do pico que é gerado a partir da fluorescência emitida, durante a sequenciação electroforética.

Para uma análise bem sucedida e robusta do produto final, um quinto marcador com fluorescência deve ser adicionado. Deste modo, paralelamente à migração das amostras em estudo, um padrão interno de tamanho conhecido (*internal size standard*), foi adicionado a cada amostra. Este, *GeneScan<sup>®</sup> 120 LIZ size standard* (utilizado neste trabalho), que também migra, é reconhecido pelo *software*, servindo para construir curvas de calibração. Deste

modo, é possível eliminar automaticamente as variações da mobilidade electroforética, as quais podiam conduzir a uma genotipagem errada [50].

O estudo dos produtos resultantes do *SNaPshot™ Multiplex kit* por electroforese capilar em ambas as plataformas requer a presença de *software* específico: o *software* *ABI Prism® 310 Data Collection* (referido de agora em diante como *Data Collection*) e *ABI Prism® GeneScan® Analysis Software* (denominado a partir de agora por *GeneScan® Analysis*) para a electroforese capilar no *ABI Prism® 310 Genetic Analyzer* e o *ABI Prism® 3130 Data Collection software* e *ABI GeneMapper ID* no *ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer*. O *Data Collection* define os filtros virtuais que correspondem a diferentes comprimentos de onda para a recolha das emissões de fluorescência a partir dos fluorocromos. Após a detecção de fluorescência automatizada nos sequenciadores e o *software* de *análise* interpreta os resultados, calculando o tamanho ou quantidade dos fragmentos de DNA a partir da intensidade de fluorescência em cada momento de recolha de dados [50].

A recolha de dados e funcionamento das plataformas em questão são controlados por uma série de etapas e procedimentos que estão agrupados e aos quais nos referimos como ‘módulo’. Do mesmo modo, é igualmente necessário definir a matriz, que será fundamental para uma separação correcta das cores nos electroforegrama. Neste estudo, o módulo padrão (*module standard*), matriz e polímero utilizados para genotipagem de Y-SNPs foi o SNP36\_POP4 na plataforma *ABI Prism® 3130* e GS STR POP4 para o *ABI Prism® 310*, através do filtro E5, a matriz DS-02 (dR110, dRGG, dTAMRA, dROX, LIZ) (Tabela V) e o polímero POP4.

Antes de iniciar o processo de electroforese capilar nos sequenciadores automáticos nos sistemas *ABI Prism® 310* e *ABI Prism® 3130* as amostras têm de ser preparadas para análise.



Fonte: [http://humods.com/uploaded\\_images/DNA-assembly-fab-717561](http://humods.com/uploaded_images/DNA-assembly-fab-717561), <http://www.dps.state.ak.us/CrimeLab/Images/DNA/3130insideThumb.jpg> e [http://humods.com/uploaded\\_images/nano-replaces-chemo-717245](http://humods.com/uploaded_images/nano-replaces-chemo-717245)

#### **2.4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O PROCESSO DE ELECTROFORESE CAPILAR NOS SEQUENCIADORES *ABI PRISM® 3130 E 310 GENETIC ANALYZER.***

As amostras apenas se encontram preparadas para o processo de electroforese capilar a ter lugar nos *ABI Prism® 310 Genetic Analyser* e *ABI Prism® 3130 Genetic Analyser*, com uma solução desnaturante – Hi-Di™ Formamida – que ajuda a quebrar as ligações de hidrogénio entre as cadeias complementares dos produtos de PCR. Ao adicionar a Formamida às amostras nesta fase, está-se igualmente a diluir os sais, o que facilita o processo de injeção da amostra. Um padrão interno é igualmente adicionado a cada

amostra (com o objectivo de permitir a atribuição de tamanho). O *GeneScan*<sup>®</sup> 120 LIZ *size standard* foi especificamente desenhado para aplicação com o *SNaPshot*<sup>™</sup> Multiplex Kit tendo sido utilizado neste estudo. A amostra é de seguida aquecida e desnaturada, para separar as duas cadeias de cada produto SBE, e depois introduzida no instrumento para análise. A Tabela II.10 apresenta o protocolo de preparação das amostras para electroforese capilar nos sequenciadores automáticos *ABI Prism*<sup>®</sup> 310 *Genetic Analyzer* e *ABI Prism*<sup>®</sup> 3130 *Genetic Analyzer* [51].

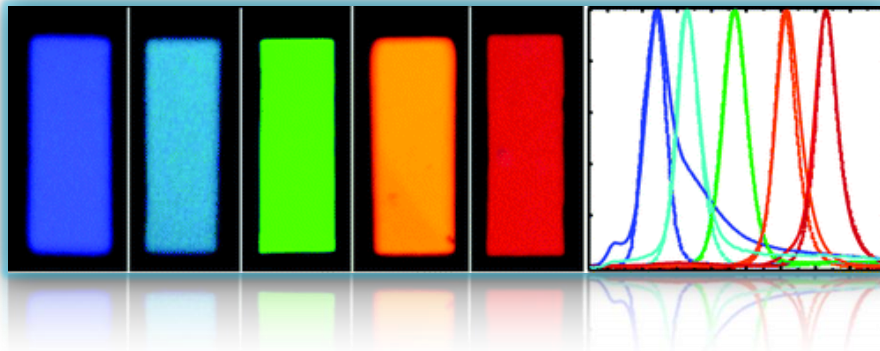
**Tabela II.10** - Protocolo de preparação das amostras para a electroforese capilar nos sequenciadores automáticos *ABI Prism*<sup>®</sup> 310 *Genetic Analyzer* e *ABI Prism*<sup>®</sup> 3130 *Genetic Analyzer*

	<i>ABI Prism</i> <sup>®</sup> 3130 <i>Genetic Analyzer</i>	<i>ABI Prism</i> <sup>®</sup> 310 <i>Genetic Analyzer</i>
1.	Num tubo de 500 µl, adicionar (N + 2) x 9 µl de Hi-Di Formamida <sup>8</sup> e (N + 2) x 0,5 µl de <i>GeneScan</i> <sup>®</sup> 120 LIZ <i>size standard</i> ;	Num tubo de 500 µl, adicionar (N + 2) x 12 µl de Hi-Di Formamida e (N + 2) x 0,5 µl de <i>GeneScan</i> <sup>®</sup> 120 LIZ <i>size standard</i> ;
2.	Tapar o tubo, agitar suavemente no <i>vortex</i> de 3 a 5 segundos e centrifugar a mistura <sup>9</sup> ;	
3.	Distribuir 9,5 µl da mistura por N poços da placa;	Distribuir 12,5 µl da mistura por N tubos;
4.	Adicionar 0,5 µl de produto SBE (aos poços ou tubos);	
5.	Caso se verifique a existência de bolhas, proceder a um <i>spin</i> rápido na centrífuga de placas;	Tapar cada tubo com um septo, agitar no <i>vortex</i> e centrifugar;
6.	Desnaturar durante 5 min a 95°C no termociclador	
7.	Aplicação no sequenciador automático	

Após definição dos componentes de análise no sequenciador automático as amostras devem ser colocadas no suporte de 48 posições e este colocado no tabuleiro do sequenciador *ABI Prism*<sup>®</sup> 310 *Genetic Analyzer* ou colocar a placa no tabuleiro do sequenciador *ABI Prism*<sup>®</sup> 3130 *Genetic Analyzer*, e dar início ao processo de electroforese.

<sup>8</sup> A elevada concentração de formamida ajuda a desnaturar as cadeias de DNA, especialmente depois de serem induzidas à separação pelo aquecimento a 95°C. A formamida é uma solução desnaturante que ajuda a quebrar as ligações de hidrogénio entre as cadeias complementares dos produtos de PCR. Previamente armazenada no frigorífico, esta deve ser aplicada à temperatura ambiente, devendo ter-se o cuidado de a retirar do frigorífico um pouco antes da sua utilização.

<sup>9</sup> Caso se verifique necessário, armazenar a mistura de 2°C a 6°C até pronta a utilizar.



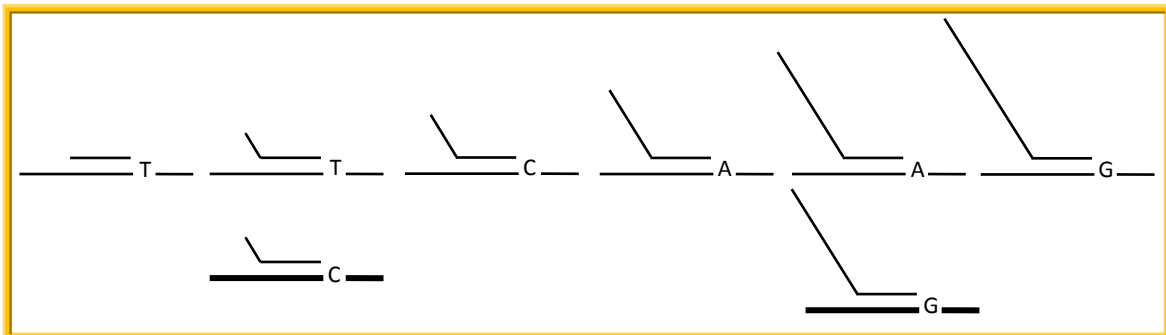
Fonte: [http://pubs.acs.org/appl/literatum/publisher/achs/journals/content/nalefd/2009/nalefd.2009.9.issue-7/nl9002969/production/images/medium/nl-2009-002969\\_0004.gif](http://pubs.acs.org/appl/literatum/publisher/achs/journals/content/nalefd/2009/nalefd.2009.9.issue-7/nl9002969/production/images/medium/nl-2009-002969_0004.gif)

## 2.5. DETECÇÃO DO PRODUTO SEQUENCIADO

Os produtos da minisequenciação marcados com fluorocromos são detectados e separados por electroforese capilar, através dos instrumentos *ABI Prism<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer* e *ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer*. O processo de recolha de dados é efectuado num electroforegrama. A informação dos fragmentos tem de ser convertida em pares de bases que permitirá a comparação dos dados entre laboratórios, indicação no relatório ou mesmo introdução em base de dados de DNA para comparação com outras amostras.

Os dados da amostra recolhidos pelos *ABI Prism<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer* e *ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer*, através do *software Data Collection<sup>®</sup> (Applied Biosystems)*, apresentam-se sob a forma de fragmentos, denunciando, através da sua coloração, a identidade da base nucleotídica complementar ao local polimórfico do marcador em estudo e, conseqüentemente, dando a conhecer o mesmo. Estes picos estão presentes num electroforegrama, onde são representados em função da intensidade do sinal de fluorescência por tempo de passagem no detector (Figura 15) [13].

### 1. AMPLIFICAÇÃO POR PCR

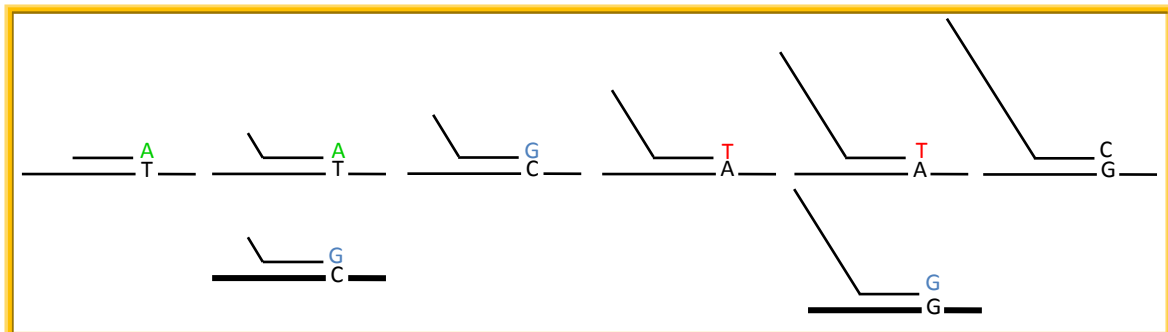


### 2. MINISEQUÊNCIAÇÃO COM *SNaPshot<sup>®</sup> MULTIPLEX KIT*

ddGTP  
ddCTP  
ddTTP  
ddATP

↓

ENZIMA E  
SONDAS SRF



### 3. ELECTROFORESE

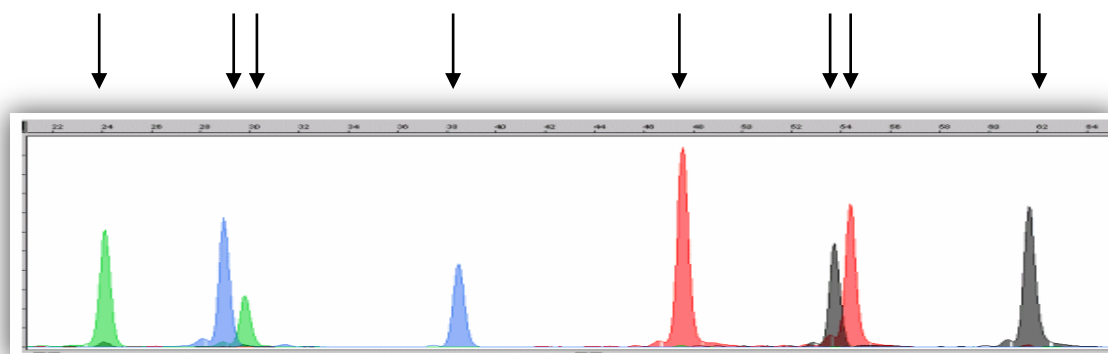


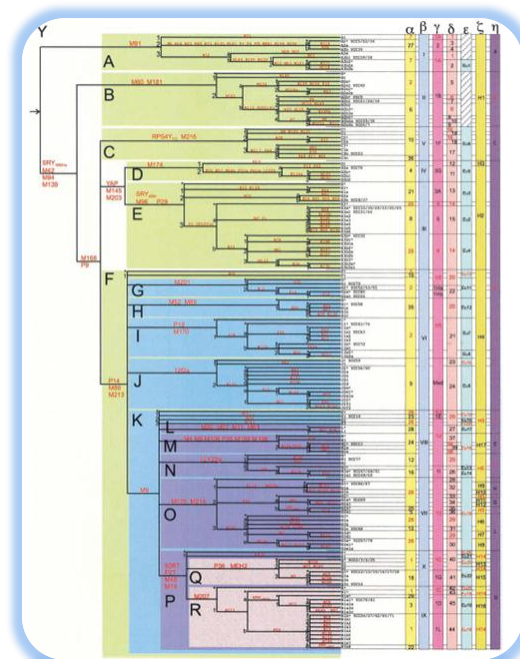
Figura 15 – Sistema de minisequênciação através do *SNaPshot<sup>™</sup> Multiplex kit (Applied Biosystems)*.

A cada um dos 4 nucleótidos está associado um fluorocromo: A (verde), G (azul), C (amarelo), e T (vermelho). Assim, a presença de um pico azul no electroforegrama indicaria que o G (ddGTP) havia sido incorporado pela polimerase no local do SNP (Tabela II.5) [13; 49]. No sistema de minisequenciação, cada fragmento é caracterizado pela cor do pico — que permite identificar o nucleótido do *locus* de interesse —, e tamanho — uma vez que são adicionadas caudas 5' para diferenciar os marcadores de SNP dos seus vizinhos — [40,50].

Através da aplicação do *software* de análise, as várias cores dos fluorocromos para cada pico no espectro são separadas (por meio de uma matriz), a variação nucleotídica é identificada — a partir da associação específica de uma cor a uma base — sendo-lhes atribuído tamanho. O tamanho dos fragmentos de DNA, representados por picos nos electroforegramas (em termos de pares de base), pode ser determinado relativamente ao padrão interno, previamente misturado com as amostras de DNA. Este conjunto de fragmentos de DNA de tamanho conhecido estão marcados com um quinto fluorocromo diferente de modo a ser distinguido, no espectro, dos fragmentos de DNA de tamanho desconhecido corrige as diferenças que possam ter lugar em cada corrida [13]. No caso do *SNaPshot™ kit* e do *ABI Prism® 310 e 3130 Genetic Analyzers*, o padrão interno é o *GeneScan®-120 LIZ (Applied Biosystems)*. Concebido para atribuir tamanho aos fragmentos de DNA que se situem entre os 15 a 120 nucleótidos, contém 9 fragmentos de DNA de cadeia simples, cujo tamanho varia a partir de 15 pb até 120 pb (15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110 e 120 nucleótidos) marcados com o fluorocromo laranja (Figura 16) [51].



**Figura 16** — Representação dos fragmentos do padrão interno *GeneScan®-120 LIZ* (Applied Biosystems).



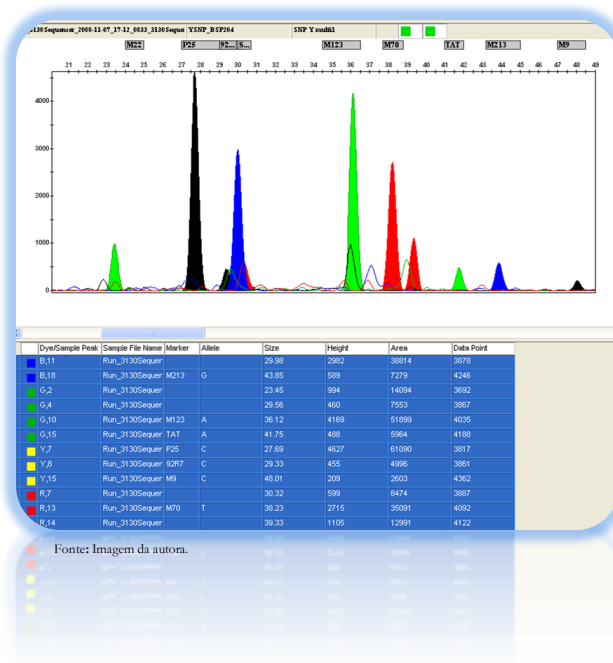
Fonte: YCC (2002).

## 2.6. ATRIBUIÇÃO DOS HAPLOGRUPOS DE Y-SNPs E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após identificada a variação nucleotídica dos Y-SNP em estudo, e de acordo com a árvore do YCC actualizada [24], definiu-se o haplogrupo de cada amostra da população em estudo.

As frequências dos haplogrupos foram determinadas por contagem directa e a sua nomenclatura encontra-se de acordo com os estudos de YCC (2002) [44], JOBLING e TYLER-SMITH (2003) [23] e KARAFET *et al.* (2008) [24].

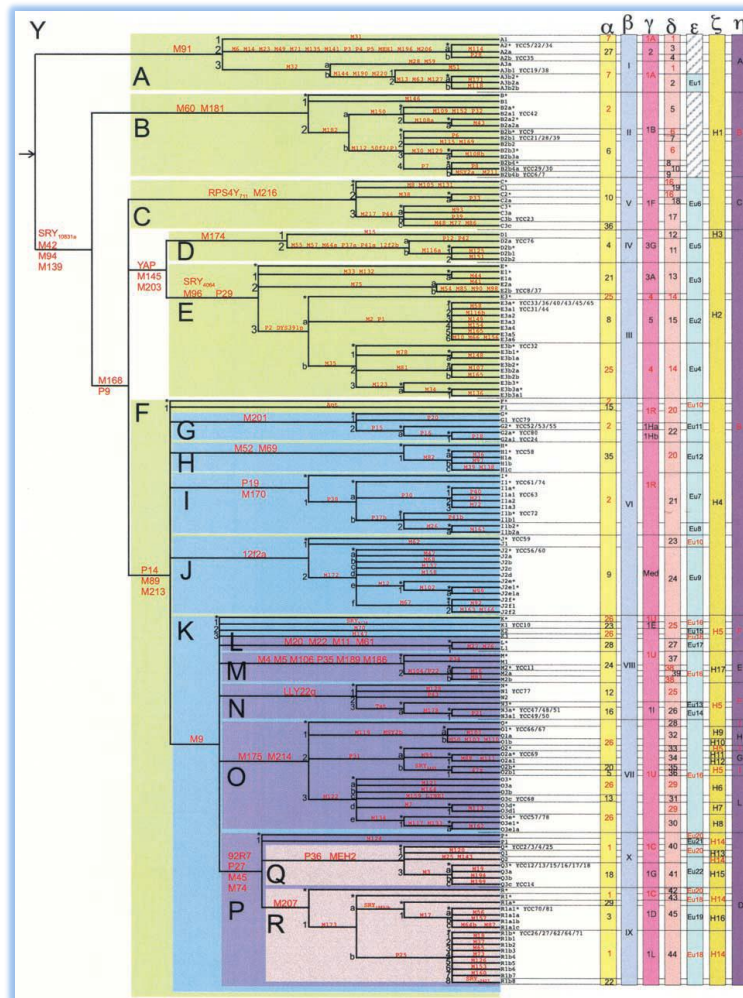




### 3. RESULTADOS

Concluídas as etapas de extracção de DNA de manchas de sangue, a minisequenciação por extensão de uma só base do *primer* — com *SNaPshot<sup>®</sup> Multiplex kit* (*Applied Biosystems*), utilizando ddNTPs marcados com fluorescência conhecida, precedida de uma amplificação por PCR —, seguida de separação do produto obtido e consequente detecção por electroforese capilar no *ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer* *ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer* e (*Applied Biosystems*), os dados recolhidos foram analisados, comparados com o padrão interno de tamanho conhecido (*internal size standard*) e foi identificada a base presente no locus polimórfico de cada marcador bialélico do cromossoma Y em estudo.

Deste modo, foi possível determinar a variação nucleotídica presente e, por análise comparativa com a árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano proposta pelo *Y CHROMOSOME CONSORTIUM* (YCC) [44] (Figura 17) e com a árvore revista por KARAFET *et al.* (2008) [24] (Figura 18), identificar o haplogrupo do cromossoma Y de cada indivíduo da população em estudo (Tabela IV.1 - Anexo IV). A análise dos vários polimorfismos dos indivíduos de uma população permite a caracterização dos seus haplogrupos.



**Figura 17** – Árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano proposta pelo *Y CHROMOSOME CONSORTIUM* (YCC).

Na amostra de 81 indivíduos aparentemente saudáveis, não relacionados, da população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil) em estudo, foram identificados e analisados os polimorfismos presentes nos 14 Y-SNPs estudados, atribuídos os seus haplogrupos, tendo-se igualmente determinado as suas frequências na população. Os resultados obtidos neste estudo, por indivíduo, encontram-se na Tabela IV.1 - Anexo IV.

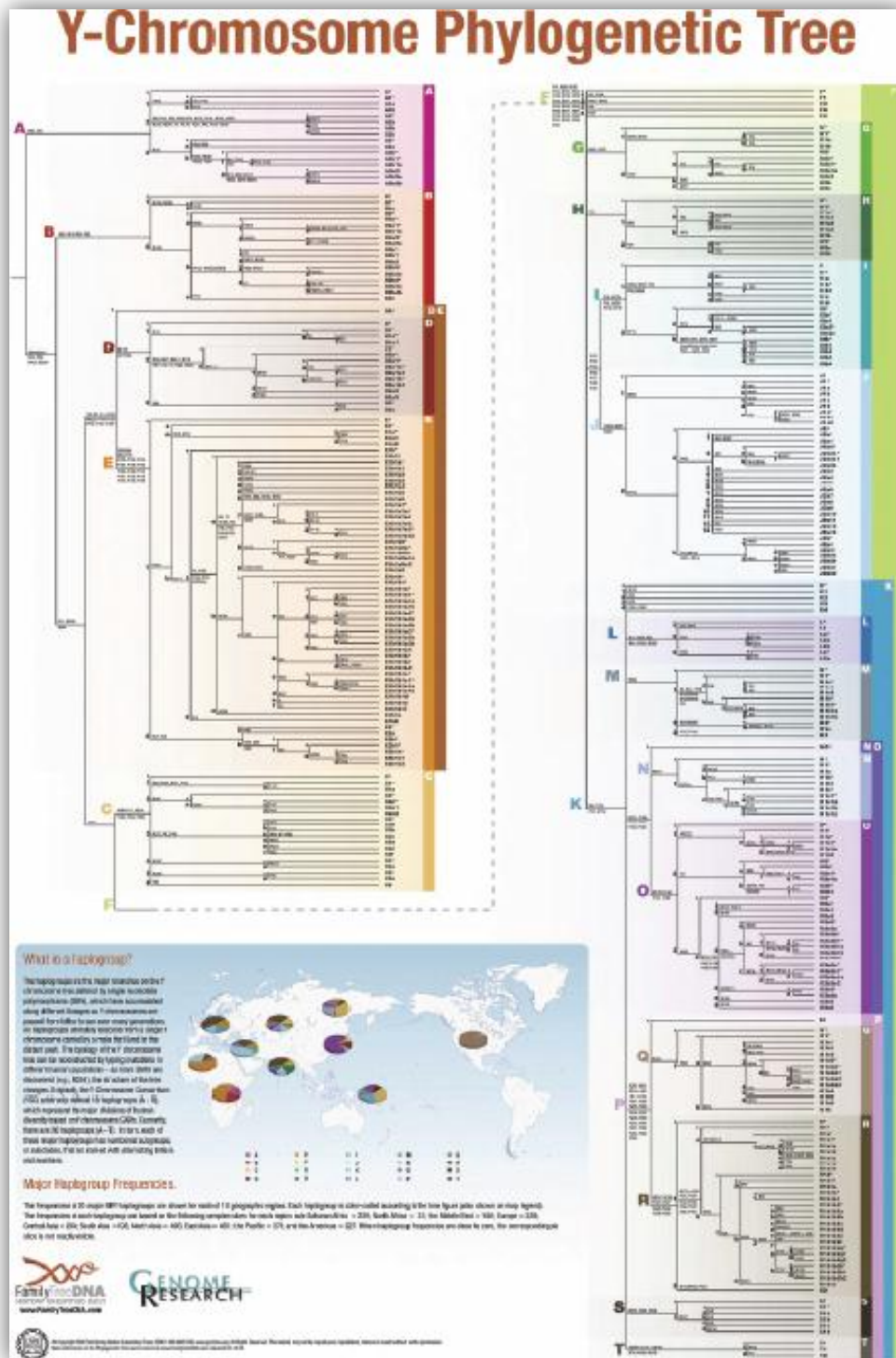
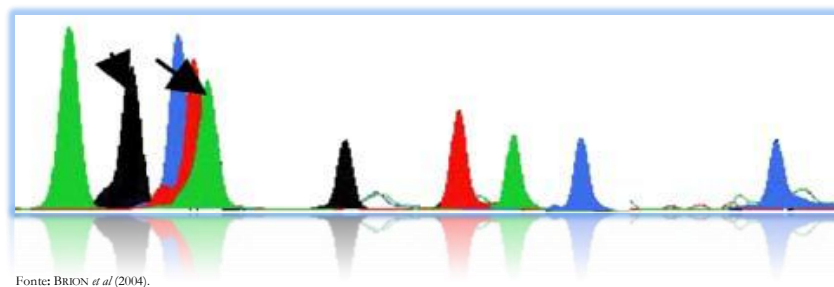


Figura 18 - Árvore dos haplogrupos revista por KARAFET *et al.* (2008).





### 3.1.1. *MULTIPLEX1*

O *multiplex 1* — baseado no estudo de BRIÓN *et al.* (2004) [5] — é constituído pelos seguintes 9 Y-SNPs: SRY1532, M213, M9, M70, M22, TAT, 92R7, M173 e P25 (Figura 19). Estes encontram-se, de um modo geral, dispersos pela árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano [23, 24, 44], sendo possível, apenas com o estudo deste *multiplex*, atribuir o haplogrupo de uma amostra ou identificar o *multiplex* adicional com que deverá posteriormente ser analisada.

Na sequência da reacção de minisequenciação seguida de electroforese capilar, a informação do *locus* polimórfico dos 14 Y-SNPs apresenta-se sob a forma de fragmentos de tamanhos diferentes, representados num electroforegrama (Figura 19).

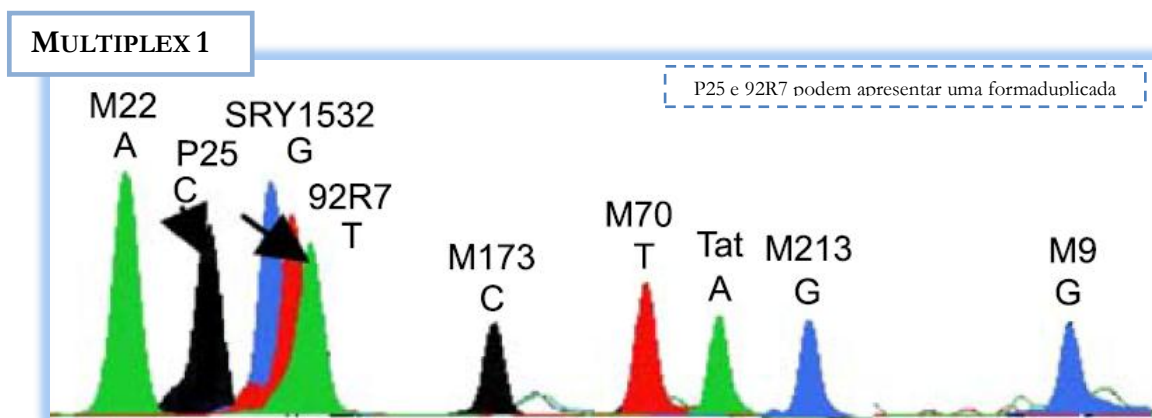


Figura 19 – Representação de um electroferograma de Y-SNPs a partir da análise do *multiplex* 1.

Tabela III.1 – Caracterização dos Y-SNPs que compõem o *multiplex* 1.

Y-SNP	Tamanho	Deteccção	Mutação
SRY1532	30	A — G	A → G
M213	45	A — G	T → C
M9	48	C — G	C → G
M70	34	T — G	A → C
M22	20	A — G	A → G
Tat	42	A — G	T → C
92R7	28	TC — T	G → A
M173	34	A — C	A → C
P25	26	C — AC	C → A

Da análise dos 81 indivíduos saudáveis, não relacionados da população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil), através do *multiplex* 1 foi possível a identificação de pelo menos 8 haplogrupos (Tabela IV.1 - Anexo IV): R1b1 (Figura 20a), R1a (Figura 20b), T (Figura 20c), P(xR1) (Figura 20d), A (Figura 20e), K(xL,N1c,P,T) (Figura 20f), F(xK) e um ou vários dos haplogrupos B,C,D ou E (Figura 20g).

As amostras caracterizadas com o haplogrupo F(xK), foram seleccionadas para análise dos restantes marcadores binários do cromossoma Y deste estudo, compondo o *multiplex* 2.

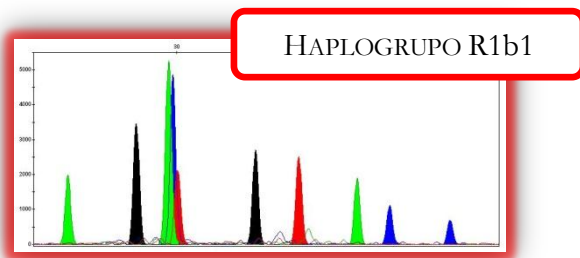


Figura 20a

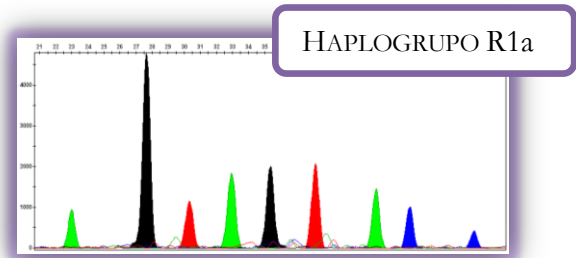


Figura 20b

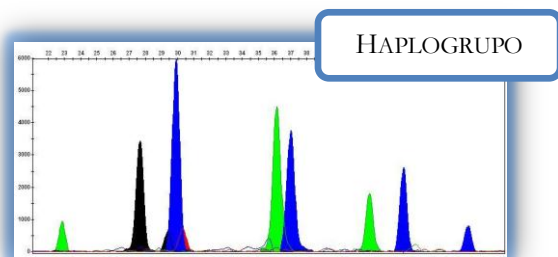


Figura 20c

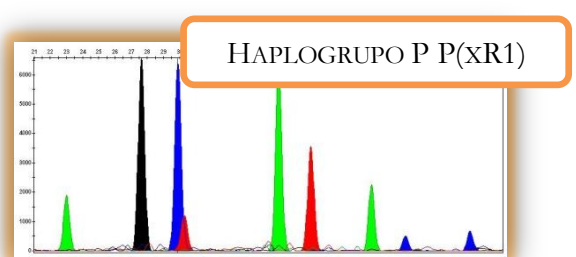


Figura 20d

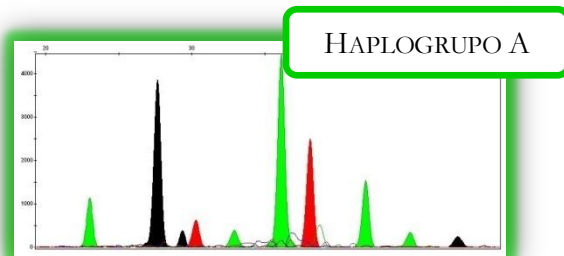


Figura 20e

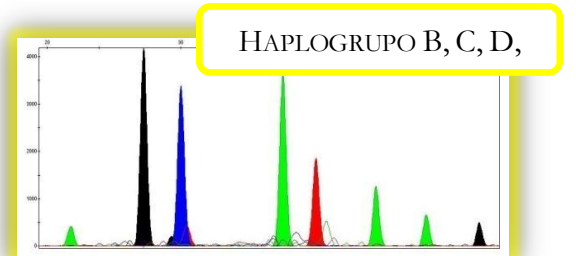


Figura 20g

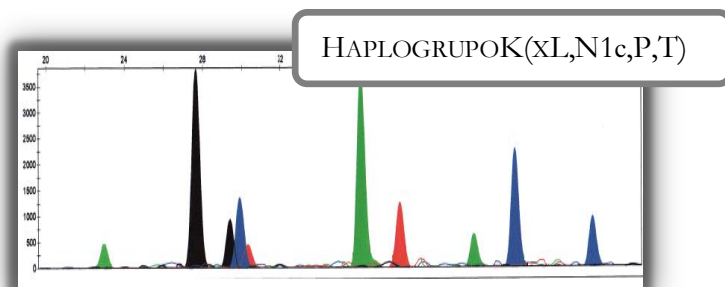
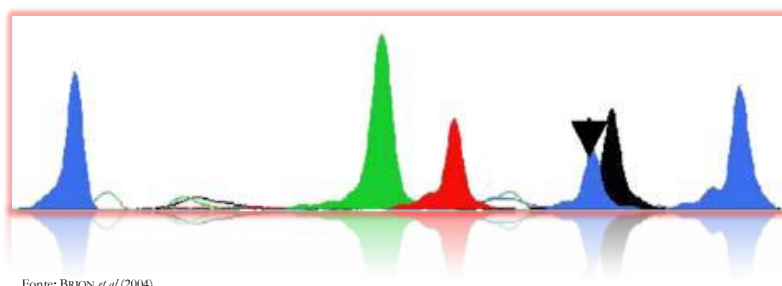


Figura 20f

Figura 20 - Electroforegramas característico de cada um dos haplogrupos determinados após estudo do *multiplex* 1.



### 3.1.2. *MULTIPLEX 2*

Na sequência da análise dos electroforegramas das amostras estudadas com o *multiplex 1*, aquelas cujo haplogrupo não foi atribuído, deveriam ser analisadas com um *multiplex* adicional. Neste estudo, as amostras que, após análise do *multiplex 1*, o haplogrupo não havia sido determinado, foram estudadas igualmente com o *multiplex 2*.



Igualmente definido por BRIÓN *et al.* (2004) [5] este *multiplex* inclui 5 Y-SNPs: M170, M62, M172, M26 e M201 (Figura 21). O processo de atribuição do haplogrupo é equivalente ao *multiplex* anterior, estando a variação nucleotídica representada na Tabela III.2.

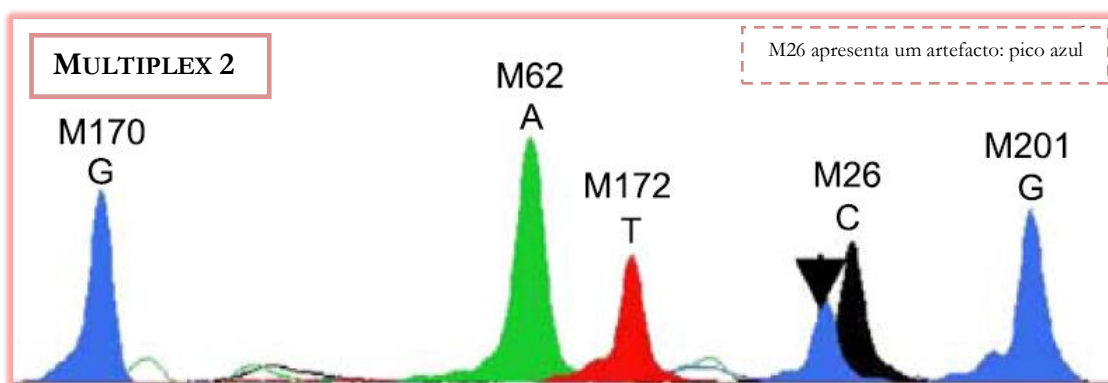


Figura 21 – Representação de um electroferograma de Y-SNPs a partir da análise do *multiplex* 2.

Tabela III.2 – Caracterização dos Y-SNPs que compõem o *multiplex* 2.

Y-SNP	Tamanho	Deteção	Mutação
M170	22	T — G	A → C
M62	27	A — G	T → C
M172	32	T — G	T → G
M26	37	C — T	G → A
M201	42	G — T	G → T

Dada a distribuição dos marcadores deste *multiplex* na árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano e considerando os resultados da tipagem dos Y-SNPs através do *multiplex* 1, apenas foi realizada a análise adicional com este *multiplex* às amostras que o *multiplex* 1 definiu como pertencendo ao haplogrupo F(xK) (Figura 22).

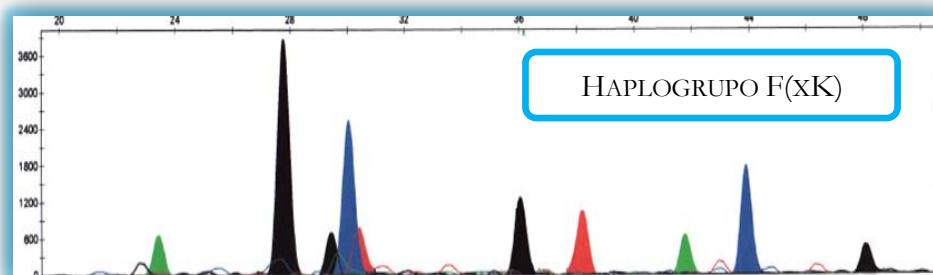


Figura 22 – Electroforegrama característico de uma amostra pertencente ao Haplogrupo F(xK).

Assim, 23 das amostras referentes à população de Ribeirão Preto, após análise com o *multiplex* 1, foram submetidas ao estudo dos Y-SNPs com o *multiplex* 2. Na sequência da mesma, foram atribuídos 5 haplogrupos (Tabela IV.1 - Anexo IV), a saber G (Figura 23a), F(xG,I,J1a,J2,K) (Figura 23b), J2 (Figura 23c) e I(xI2a2) (Figura 23d).

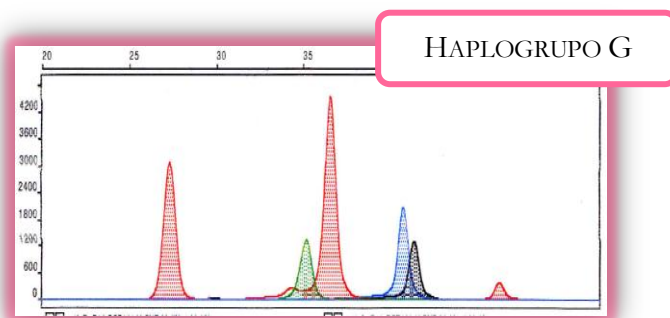


Figura 23a

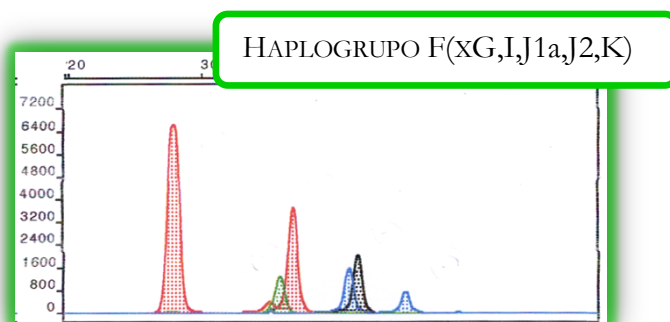


Figura 23b

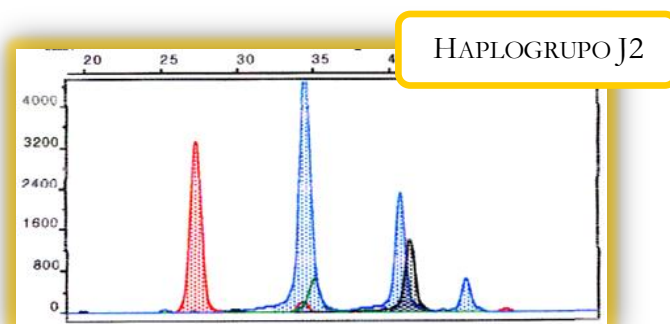


Figura 23c

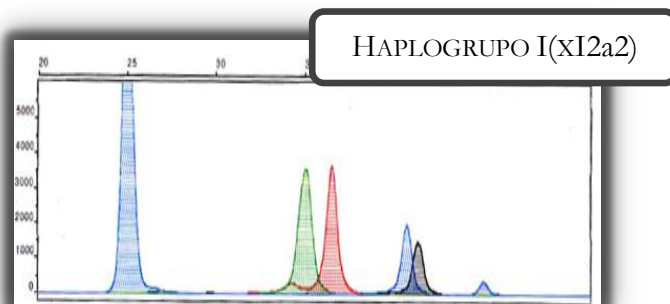


Figura 23d

Figura 23 – Electroforegramas característico de cada um dos haplogrupos determinados após estudo do *multiplex* 2.



### 3.2. CARACTERIZAÇÃO DE HAPLOGRUPOS: CÁLCULO DAS FREQUÊNCIAS

A caracterização de populações, nomeadamente através da análise de haplogrupos do cromossoma Y definidos por SNPs, e posterior estudo estatístico, é fundamental e imprescindível para a elaboração de bases de dados populacionais. Sem estas não será possível a implementação dos Y-SNPs como marcadores de rotina dos laboratórios de genética forense.

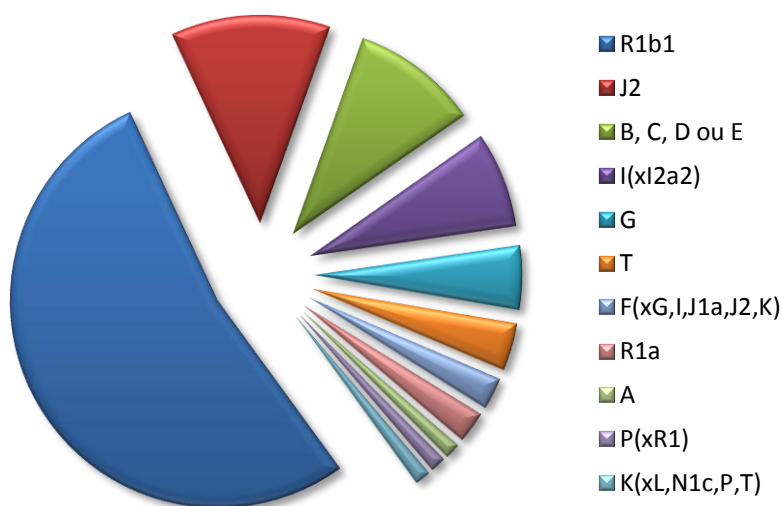
Nessa medida, após o estudo dos 14 Y-SNPs presentes nos *multiplexes 1 e 2*, foi possível determinar a presença de pelo menos 11 haplogrupos, representados na Tabela

III.3 A nomenclatura aplicada para a atribuição dos haplogrupos foi a nomenclatura hierárquica, concordante com os trabalhos do YCC (2002) [44], JOBLING e TYLER-SMITH (2003) [23] e KARAFET *et al.* (2008) [24].

**Tabela III.3** – Caracterização dos haplogrupos presentes na população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil).

Haplogrupos	N	%
R1b1	43	53,09%
J2	10	12,35%
B, C, D ou E	8	9,88%
I (xI2a2)	6	7,41%
G	4	4,94%
T	3	3,70%
F(xG,I,J1a,J2,K)	2	2,47%
R1a	2	2,47%
A	1	1,23%
P (xR1)	1	1,23%
K (xL,N1c,P,T)	1	1,23%

As frequências dos haplogrupos foram determinadas por contagem directa (Tabela III.3). Com a análise do gráfico da Figura 24, podemos verificar que, apesar de alguns dos resultados necessitarem de estudos adicionais, os haplogrupos predominantes, com frequência superior a 65%, são os haplogrupos R1b1 e J2.



**Figura 24** – Representação gráfica da distribuição dos haplogrupos da população em estudo.

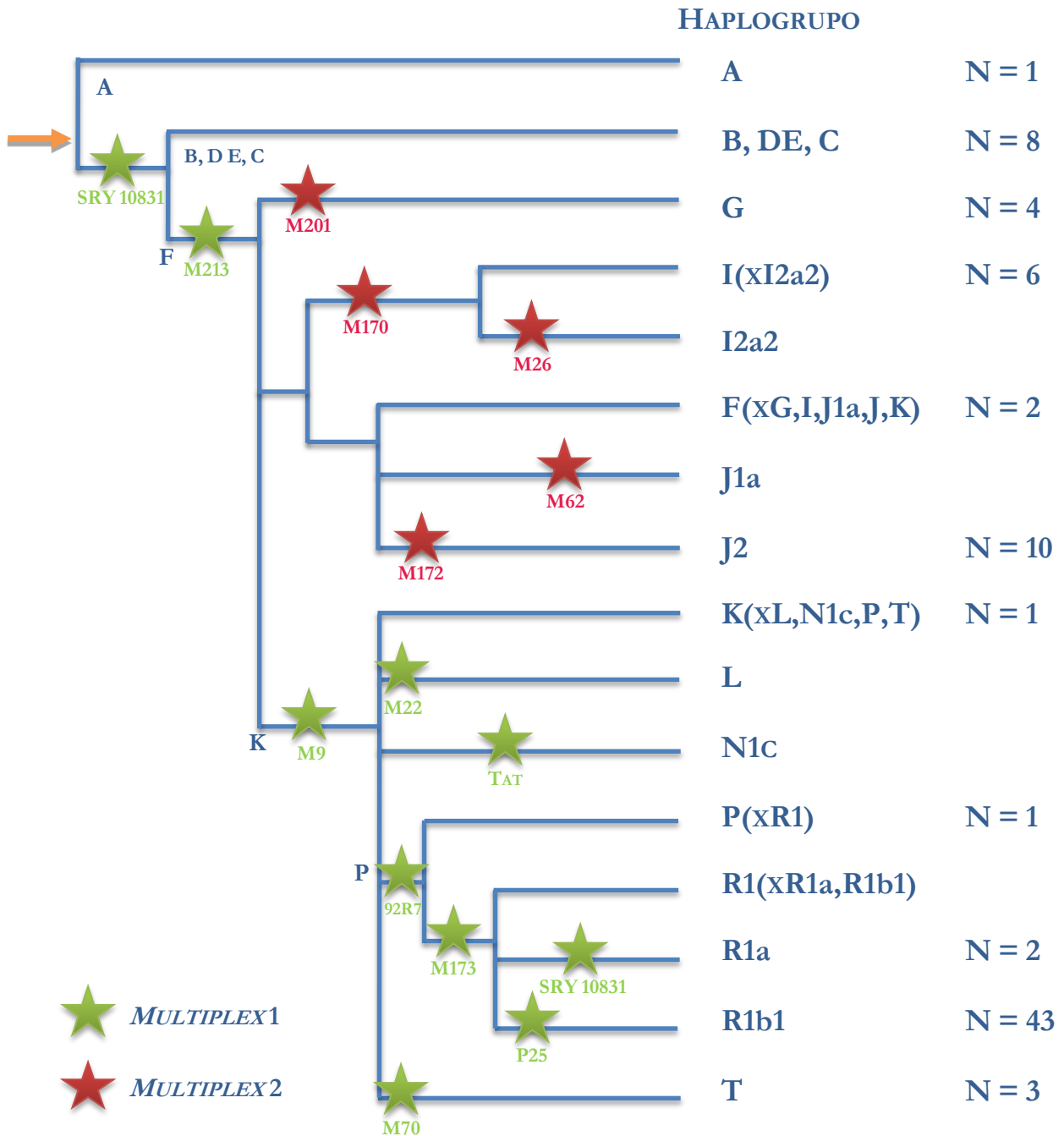


### 3.3. ÁRVORE FILOGENÉTICA

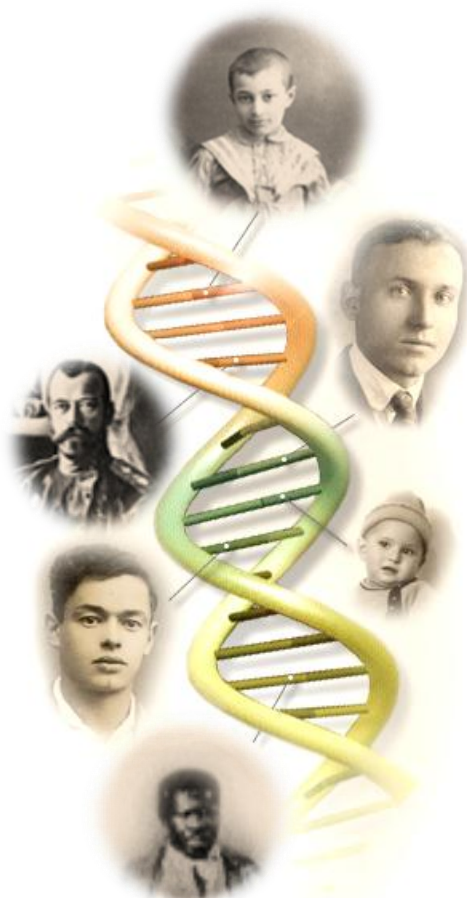
A partir dos dados genéticos populacionais resultantes do estudo de *single nucleotide polymorphisms* do cromossoma Y, é possível a caracterização dos haplogrupos presentes nessa população. Esta tem lugar considerando não só a sua localização na árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano [20], mas considerando igualmente a frequência em que estão presentes em cada população. Estes dados são determinantes para a elaboração de bases de dados populacionais e estudos de evolução.

A partir da análise comparativa dos haplogrupos identificados nos indivíduos de Ribeirão Preto com a árvore do YCC revista [24], foi possível elaborar a “árvore filogenética dos haplogrupos” da população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo,

Brasil) na Figura 25, onde se encontram figurados apenas os haplogrupos definidos pelos marcadores em estudo nesta população.



**Figura 25** – “Árvore” dos haplogrupos do cromossoma Y da população de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), obtida na sequência da análise dos 14 Y-SNPs.



Fonte: <http://www.myheritageimages.com/H/storage/blogs/companyblog/DNA.jpg>  
<http://www.afrigenes.com/graphics/afrigenelogo5b.jpg>  
[http://www.mygenetree.com/images/MGT\\_genetic\\_geneology\\_issues\\_family\\_tree\\_0309\\_01.jpg](http://www.mygenetree.com/images/MGT_genetic_geneology_issues_family_tree_0309_01.jpg)  
[http://www.dnareunion.org/image/home\\_banner\\_01.jpg](http://www.dnareunion.org/image/home_banner_01.jpg)  
<http://news.medill.northwestern.edu/uploadedImages/News/Chicago/Images/Urban/Peltzer%20Pekarsky%20family%20small.jpg>

## 4. DISCUSSÃO

Desde a evidência de que distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y, a partir do análise de polimorfismos binários na região não codificante, permite identificar padrões de migrações humanas históricas através das linhagens paternas [21,23], responder a questões antropológicas, históricas e genealógicas [13], entre outras aplicações, que o estudo de Y-SNPs se tornou bastante comum.

Na área forense, dada a sua abundância por todo o genoma (i), simplicidade — permitindo a análise a partir de pequenas quantidades de amostra e a análise através de tecnologias com rápida capacidade de processamento — (ii), baixa taxa de mutação — permitindo o seu estudo em investigações de paternidade — (iii), presença única do cromossoma Y no genoma masculino — determinado pelo gene SRY — (iv), modo de transmissão directamente de pai para filho, sem recombinação, sendo a mutação ao acaso o único mecanismo para a variação no tempo entre homens paternalmente relacionados (v), é igualmente vasto o potencial. As suas aplicações forenses têm sido praticamente limitadas à sua utilização como ferramenta adicional, tendo, no entanto, aplicação como ferramenta de exclusão em investigações de parentesco incompletas ou quando as restantes metodologias parecem falhar.

Após comprovada a especificidade populacional dos polimorfismos bialélicos do cromossoma Y, que em conjunto com a sua simplicidade permite inferir sobre a origem da população de qualquer indivíduo da população de interesse para fins forenses [7, 22], a análise de haplogrupos do cromossoma Y, definidos por polimorfismos binários, tem-se tornado na abordagem padrão para o estudo das origens das populações humanas modernas e na avaliação da variabilidade existente entre as mesmas [5]. Todavia, a diversidade populacional específica exibida por estes polimorfismos deve ser interpretada com cautela. A sua frequência deve ser estimada e interpretada tendo em atenção os dados antropológicos.

Respondendo à complexa situação que se estava a gerar na comunidade científica na interpretação dos resultados destes estudos, o YCC definiu um sistema hierárquico com base nos marcadores binários da região não recombinante do cromossoma Y de distribuição de haplogrupos, em conjunto com um novo sistema de nomenclatura que é suficientemente versátil para permitir a sua actualização inerente com a descoberta de novas linhagens [24].

Para que possa ter aplicação forense, é de importância vital o conhecimento prévio da distribuição global dos haplogrupos do cromossoma Y. Neste estudo, determinaram-se os principais haplogrupos presentes na população de Ribeirão Preto, a partir da análise de Y-SNPs, de modo a caracterizar esta população, possibilitando a sua utilização na prática forense. Foram detectados pelo menos 11 haplogrupos de Y-SNPs, tendo-se verificado o seguinte:



- Haplogrupo A:

Com uma frequência de apenas 1%, este haplogrupo ocupa o *clade* mais basal de toda a árvore do cromossoma Y. Característico de indivíduos de origem africana - sendo praticamente restrito a esse continente [24,32] -, a sua presença foi detectada pela ausência da mutação SRY10831.1. Para a definição concreta de subdivisões, revela-se necessário o estudo de outros polimorfismos binários, ausentes dos *multiplexes* em estudo.

- Haplogrupo B, C, D ou E:

Correspondendo a praticamente 10% da amostragem, e considerando a disparidade dos haplogrupos em questão, será fundamental a análise com mais marcadores Y-SNP para uma correcta caracterização da população em estudo. Na verdade, os haplogrupos B, C, D e E apresentam em comum apenas a simultaneidade da existência da mutação SRY10831.1 e ausência de mutação M213.

Nessa medida, a sua presença tanto pode indiciar a origem dos indivíduos restrita à África Subsariana — haplogrupo B — [24, 34], a todo o continente africano — de onde o haplogrupo E é típico [24, 56] —, assim como uma outra proveniência. Efectivamente, o haplogrupo C não se encontra na África Subsariana mas é comum principalmente entre populações asiáticas (sendo uma das linhagens rara restrita ao Japão [56]), australianas, da Oceânia e só muito raramente em indivíduos nativo-americanos [24]. Da mesma forma, o haplogrupo D não é encontrado fora da Ásia, surgindo com grande frequência na Ásia Central e Japão;

- Haplogrupo G

Com 5% de frequência na amostra estudada da população de Ribeirão Grande, este haplogrupo é definido pela mutação M201. Apesar de apresentar uma baixa frequência na maioria das populações, o haplogrupo G encontra-se presente principalmente nos indivíduos do Médio Oriente, Mediterrâneo e Montanhas do Cáucaso [24, 30].

- Haplogrupo I(xI2a2)

Definido pela presença da mutação M170 e ausência da mutação M26, este haplogrupo representa 7,41% na população em estudo. O Haplogrupo I é característico das populações europeias [26,32], encontrando-se distribuído de modo generalizado por todo continente e sendo praticamente a este restringido [30, 56].

O *subclade* excluído (I2a2) – caracterizado pela presença da mutação M26 – é próprio das populações de uma zona geográfica muito restrita (Sudeste da Europa), sendo mais frequente na Bosnia-Herzegovina mas sendo também encontrada nos indivíduos do Nordeste de Itália.

- Haplogrupo J2:

Definido pela mutação M172, este haplogrupo é o mais frequente nos indivíduos da população europeia, no âmbito do *clade* J [23, 27, 32]. Do mesmo modo, é o segundo haplogrupo com maior representatividade na população em estudo, com uma prevalência de 12%.

- Haplogrupo F(xG, I, J1a, J2, K)

Apresentando a mutação M213 e verificando-se simultaneamente a ausência de mutação em qualquer dos marcadores do *multiplex* 2 — assim como do Y-SNP M9 —, a análise deste haplogrupo não permite, por si só, uma conclusão válida relativamente à origem dos indivíduos que o representam. Apresenta uma frequência de 2% na população em estudo.

- Haplogrupo K(xL,N1c,P,T) = M, O, S, N(xN1c)

Representando 1% da população em estudo, o haplogrupo K(xL,N1c,P,T), revela, desde já, uma influência asiática. Na verdade, o haplogrupo O é maior nos indivíduos do Este da Ásia, o haplogrupo N encontra-se principalmente nos indivíduos do Norte da Eurásia e os haplogrupos M e S predominam nas populações da região indonésia e da Oceania.

A caracterização dos indivíduos a que corresponde o presente haplogrupo carece de posterior análise com outro(s) *multiplex(es)* de Y-SNP.

- Haplogrupo P(xR1) = R2 e Q

Tal como referido em haplogrupos anteriores, também este necessitará de uma análise com outros Y-SNP de modo a caracterizar os 1% dos indivíduos da população em estudo que lhe correspondem. Primeiramente, presença deste haplogrupo numa população pode indiciar novamente a influência asiática [32] que esta população sofreu (perfeitamente comprovada pelos dados históricos). No entanto, apesar de ser interessante a presença do haplogrupo R2 na população em estudo (concordante com os dados históricos, atendendo à sua frequência nas populações asiáticas, em particular sub-continentes indiano e ásia central [56]), é a possibilidade de relação com o *clade* Q que o torna mais curioso. Com efeito, estando hoje distribuído pelas populações do Norte da Eurásia (mas podendo

também estar presente com frequência pequena na Europa, Este asiático e Médio Oriente), o clade Q constitui a maior linhagem entre os nativos americanos [30]. Assim, a sua presença na população em estudo seria acutilante.

- Haplogrupo R1a

Este haplogrupo fica definido pela presença simultânea das mutações M173 e SRY10831.2. Com uma representatividade de 2,5% da população em estudo, este haplogrupo está presente com maior frequência nos indivíduos das populações da Europa Oriental e da Ásia Ocidental e Central [59].

- Haplogrupo R1b1:

Pertencendo ao *clade* R, este haplogrupo é identificado pelas mutações 92R7, M173 e P25, não se verificando a presença da mutação SRY10831.2 (atendendo aos *multiplexes* estudados). Este haplogrupo é caracteristicamente europeu [24, 56], onde é observado com maior frequência. Neste estudo, este é o haplogrupo dominante na população, representando, destacadamente, 53% da amostragem.

- Haplogrupo T

Definido pela presença da mutação M70, este haplogrupo consta da árvore de haplogrupos do cromossoma Y apenas desde a revisão do estudo de polimorfismos binários de KARAFET *et al.* em 2008.

Este haplogrupo está presente, embora com baixa frequência, em indivíduos de populações europeias mas também de alguns locais do Médio Oriente e Norte e Oeste de África [24, 56]. Na presente população, o haplogrupo T representa 3,7% dos indivíduos.

Através da análise comparativa entre os dados da população de São Paulo (Brasil) analisados neste trabalho e os dados publicados de outros estudos anteriores realizados em várias populações brasileiras, e que se encontram em concordância com os dados históricos, demonstraram que os brasileiros formam uma das populações mais heterogêneas do mundo, como o resultado de 5 séculos de cruzamentos inter-étnicos inicialmente entre indivíduos dos três continentes: colonizadores europeus, maioritariamente representados por portugueses; escravos africanos e ameríndios autóctones [1]. Do mesmo modo, também Ribeirão Preto foi abrangido pelo padrão nacional de colonização. Assim, após chegada dos primeiros colonizadores — portugueses — o cruzamento com mulheres ameríndias teve início desde logo. Mais tarde, verificada a necessidade de mão-de-obra, e a vinda de escravos africanos, o cruzamento passou também a ter lugar com mulheres escravas africanas. Foi somente após a abolição da escravatura que teve lugar a grande vaga de imigração por portugueses, italianos, espanhóis e alemães.

Só mais tarde teve lugar a migração asiática, acolhendo principalmente japoneses, mas também sírios e libaneses [1]. Uma característica importante é o facto da primeira vaga migratória ter sido composta unicamente por homens.

Assim, os resultados obtidos encontram-se em concordância com os dados históricos e estudos populacionais anteriores. A população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil) caracteriza-se por uma forte presença da contribuição dos homens europeus, que deixaram um registo claro através dos haplogrupos R1b1 (tipicamente europeu), J2 (que, dentro do *clade* J, é o mais comum na Europa [23]) e I(xI2a2) (uma vez que o haplogrupo I é o segundo mais frequente na Europa [23]). No seu conjunto estes três haplogrupos de características europeias perfazem uma frequência de praticamente 73% de todos os haplogrupos identificados na população em estudo.

Apesar de a uma escala mínima, o haplogrupo A também demonstra a contribuição africana, conclusão que é reforçada pelos 9,88% dos indivíduos que podem pertencer aos haplogrupos B e E. A presença do haplogrupo P(xR1) muito provavelmente refere-se ao testemunho de nativos americanos através do seu característico haplogrupo Q [30] — que não pode ser identificado através dos Y-SNPs escolhidos — mas a sua detecção pode também estar relacionada com uma contribuição asiática [32, 56], dedução confortada pela presença dos 9.88% dos indivíduos que podem pertencer aos haplogrupos C e D. A presença dos restantes haplogrupos, como G, T, F(xG, I, J1a, J2, K) e K(xL,N1c,S), também se encontra concordante com os dados históricos e de estudos anteriores.

De modo a revelar-se possível a utilização destes resultados em estudos de evolução e investigações forenses, será necessária a análise de mais Y-SNPs, seguindo a mesma estratégia hierárquica ao longo da árvore dos haplogrupos do cromossoma Y. Assim, das amostras a que fizemos corresponder os haplogrupos P(xR1), K(xL,N1c,P,T) ou a um dos haplogrupos B, C, D ou E, para estarem devidamente estudadas e a população caracterizada, necessitam da análise com outros *multiplexes* não seleccionados para o presente estudo.



Fonte: <http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-asia.jpg>, <http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-americas.jpg>,  
<http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-africa.jpg>, <http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-europe.jpg>,  
<http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-oceania.jpg> e <http://www.thegeneticgenealogist.com/wp-content/uploads/2007/07/southamerica2.jpg>

## 5. CONCLUSÕES

Os *single nucleotide polymorphisms* do cromossoma Y têm aplicação em investigações forenses e estudos genealógicos, evolutivos e clínicos, entre outros. No campo forense, a análise do cromossoma Y sofreu grandes desenvolvimentos nos últimos anos. Apenas o tempo comprovará se este aumento de conhecimento dos Y-SNPs, fará com que sejam aplicados não apenas como recurso para situações únicas. Na verdade, até agora o

conhecimento da afiliação geográfica releva principalmente em casos específicos de identificação pessoal, designadamente acidentes em massa (em que a identificação das vítimas é praticamente impossível dado o estado de destruição dos corpos podendo aquelas ter origem em diversas áreas geográficas) (i), em cenas crime (na identificação do grupo étnico a que pertence o suspeito que deixou o vestígio, limitando o campo de procura) (ii) e na análise de DNA altamente degradado (como corpos em decomposição, vestígios biológicos antigos ou restos humanos com algum tempo) (iii). Para que seja possível a inclusão como análise de rotina será necessário que tenha lugar a validação de estudos e realização de estudos inter-laboratoriais, assim como o aumento das bases de dados para fortalecer a estimativa estatística de correspondência.

Neste sentido, analisaram-se 81 indivíduos anónimos, saudáveis, da população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil), através do estudo de 14 Y-SNPs dispersos por dois *multiplex*, de modo a caracterizar a mesma, identificando os principais haplogrupos presentes.

Com este trabalho, confirma-se a mais-valia do estudo de Y-SNPs por minisequenciação através do kit *SNaPshot<sup>TM</sup> multiplex* (*Applied Biosystems*) uma vez que este se revela numa metodologia precisa, de fácil utilização, com possibilidade de análise de vários sistemas em simultâneo — *multiplex* — e com elevada rapidez de análise dos resultados. Os resultados obtidos encontram-se em perfeita concordância com os dados históricos e outros estudos.

O estudo da população de referência, na qual decorrem as investigações, é essencial. A forte herança cultural e genética deixada pela população portuguesa no Brasil, bem como a língua e a proximidade entre os dois países, através de protocolos políticos e facilidade de circulação, potenciam a migração para Portugal, o que confere um carácter ainda mais importante a este estudos populacionais.

Independente das características dos Y-SNPs — como seja o baixo polimorfismo —, para que seja possível a aplicação do presente estudo em perícias médico-legais de genética forense, nomeadamente para investigações de parentesco ou criminalística biológica envolvendo indivíduos da população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil), será necessário o estudo complementar, com mais marcadores, para algumas amostras e, idealmente, o estudo de um maior número de indivíduos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVES-SILVA, J., *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Genet* 67 (2000) 444-461.
- [2] BENDER, K., *et al.*, A multiplex SNP typing approach for the DNA pyrosequencing technology, *International Congress Series* 1288 (2006) 73-75.
- [3] BOGUS, M., *et al.*, Rapid microarray-based typing of forensic SNPs, *International Congress Series* 1288 (2006) 37-39.
- [4] BRION, M., *et al.* 29 Y-chromosome SNP analysis in European populations, *International Congress Series* 1261 (2004) 73-75.
- [5] BRION, M., *et al.*, Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations, *Int. J. Leg. Med.* 119 (2004) 10-15.

- [6] **BRION, M., et al.** A collaborative study of the EDNAP group regarding Y-chromosome binary polymorphism analysis, *Forensic Science International* 153 (2) (2005) 103-108.
- [7] **BRION, M., et al.** Introduction of an single nucleotide polymorphism-based "Major Y-chromosome haplogroup typing kit" suitable for predicting the geographical origin of male lineages. *Electrophoresis* 26 (2005) 4411-4420
- [8] **BRION, M., et al.** Y chromosome SNP analysis using the single-base extension: a hierarchical multiplex design. *Methods Mol Biol.* 297 (2005) 229-42.
- [9] **BRION, M., et al.** Analysis of 29 Y-chromosome SNPs in a single multiplex useful to predict the geographic origin of male lineages, *International Congress Series* 1288 (2006) 13-15
- [10] **BRISIGHELLI F., et al.** Y-chromosomal and mitochondrial markers: A comparison between four population groups of Italy, *International Congress Series* 1288 (2006) 91-93.
- [11] **BROOKES A.J.,** The Essence of SNPs. *Gene* 234 (1999) 177-186.
- [12] **BROWN, T.A.,** Gene cloning. 3. Ed. Chapman & Hall (1996) Londres
- [13] **BUTLER J.M.,** Forensic DNA Typing. (2001). Academic Press. Barcelona.
- [14] **DANIEL, R.,** Walch, S.J., Piper, A., Investigation of single-nucleotide polymorphisms associated with ethnicity, *International Congress Series* 1288 (2006) 79-81.
- [15] **DARNELL, J. et al.** *Molecular Cell Biology.* (2000). 4. ed. W. H. Freeman and Company. Nova Iorque.
- [16] **ENCICLOPEDIA LUSO-BRASILEIRA DE CULTURA.** Verbo 16: 560; 1415 – 1427.
- [17] **GILL, P.,** An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes *Int J Legal Med* (2001) 114: 204–210.
- [18] **GUSMAO, L., et al.,** Y chromosome specific polymorphisms in forensic analysis. *Leg. Med.* 1999, 1, 55–60.
- [19] **HARRISON, C., et al.,** A sensitive issue : Pyrosequencing as a valuable forensic SNP typing platform, *International Congress Series* 1288 (2006) 52-54.
- [20] **JARRRETA, M.B.M., et al.,** La prueba del ADN en medicina Forense – La Genética al servicio de la Ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad. Barcelona – Masson S,A. (1999). Barcelona.
- [21] **JOBLING, M.A., e TYLER-SMITH, C.,** Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 1995 (11): 449-56.



- [22] **JOBLING, M.A.**, Y-chromosomal SNP haplotypes diversity in forensic analysis. *Forensic Science International* 118 (2001) 158-162.
- [23] **JOBLING, M.**, e **TYLER –SMITH, C.**, The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.* 4, 2003 598-612.
- [24] **KARAFET, T.M.**, *et al.*, New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal Haplogroup tree. *Genome Research* 18(2008) 830-838.
- [25] **LAREU, M.**, *et al.* The use of the LightCycler for the detection of Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* 118 (2001) 163-168.
- [26] **LESSIG, R.**, *et al.*, SNP-genotyping on human Y-chromosome for forensic purposes : comparison of two different methods. *International Congress Series* 1261 (2004) 334-336.
- [27] **LESSIG, R.**, *et al.*, Y-SNP-genotyping — a new approach in forensic analysis. *Forensic Science International* 154 (2005) 128-136.
- [28] **LI, L.**, *et al.*, Y. SNP genotyping by multiplex amplification and microarrays assay for forensic application *Forensic Science International* 162 (2006) 74–79.
- [29] **MENFEL-JORGENSEN, J.**, *et al.*, MALDI-TOF Mass Spectrometric Detection of Multiplex Single Base Extended Primers. A Study of 17 Y-Chromosome Single-Nucleotide Polymorphisms. *Analytical Chemistry.* 76 (2004) 6039-6045.
- [30] **NASIDZE I.**, *et al.*, Mitochondrial DNA and Y-Chromosome Variation in the Caucasus. *Annals of Human Genetics* 68 (2004) 205-221.
- [31] **NILSSON, M.**, *et al.* Sensitive forensic analysis using the Pyrosequencing technology, *Progress in Forensic Genetics II.* Elsevier (2006) 625-627;
- [32] **ONOFRI, V.**, *et al.*, Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* 157 (2006) 23-35. *Forensic Sci. Int.* 157 (2006) 23-35.
- [33] **ONOFRI, V.**, *et al.*, Post-mortem DNA damage: A comparative study os STRs and SNPs typing efficiency in simulated forensic samples, *International Congress Series* 1288 (2006) 510-512.
- [34] **ONOFRI, V.**, *et al.*, Y-chromosome genetic structure in sub-Apennine populations of Central Italy by SNP and STR analysis. *International Journal of Legal Medicine,* 121 (3) (2007) 234-237.

- [35] **PATI, N., et al.**, A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. *J. Biochem. Biophys. Methods* 60 (2004) 1–12.
- [36] **PETKOVSKI, E., et al.**, Maldi-ToF Ms analysis of Y- SNPs in ancient samples, *International Congress Series*. 1288 (2006) 25-27.
- [37] **SANCHEZ, J., et al.**, Multiplex PCR and minisequencing of SNPs— a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* 137 (2003) 74–84.
- [38] **SÃO-BENTO, M., et al.**, STR data for the 15 AmpFISTR® Identifiler™ loci in the Brazilian population of São Paulo State. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series* 1 (2008) 367–369.
- [39] **SHELL, C., et al.**, Multiplex typing with 5 Y-chromosomal SNPs, *International Congress Series* 1288 (2006) 22-24.
- [40] **SIMS, L.M., et al.**, Sub-Populations Within the Major European and African Derived Haplogroups R1b3 and E3a Are Differentiated by Previously Phylogenetically Undefined Y-SNPs. *Hum Mutat.* 28 (2007) (1):97
- [41] **SINCLAIR, A.H., et al.**, A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244
- [42] **SKALETSKY, H., et al.**, The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423 (2003) 825-838.
- [43] **SOBRINO, B.,** Brión, M., Carracedo, A., SNPs in forensic genetics: a review on SNO typing methodologies. *Forensic Science International* 154 (2005) 181-194. SNPs in forensic genetics
- [44] **THE Y CHROMOSOME CONSORTIUM**, “A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups.” *Genome Res.* 12, 2002: 339-348.
- [45] **TURCHI, C., et al.**, Multiplex genotyping of 22 autosomal SNPs and its application in the forensic field, *International Congress Series* 1288 (2006) 40-42.
- [46] **WALSH P.S., et al.**, Chelex ® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, 10 1991 (4): 506-513.
- [47] **WETTON, J.H., et al.**, Inferring the population of origin of DNA evidence within the UK by allele-specific hybridization of Y-SNPs. *Forensic Sci Int.* 152 (2005) 45-53.
- [48] **WILLARD, H.F., et al.**, Tales of the Y chromosome. *Nature* 423 (2003) 810-812.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ELECTRÓNICAS**

- [49] **APPLIED BIOSYSTEMS.** ABI Prims® SNaPshot™ Multiplex kit protocol (2001). P/N 4323357. Rev. A. Acedido em: 26 de Julho de 2009 em: [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).
- [50] **APPLIED BIOSYSTEMS.** Using the SNaPshot® Multiplex System with the POP-7™ Polymer on Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers and 3130/3130xl Genetic Analyzers. Part Number 4367258 Rev. A (2005). Acedido em: 27 de Julho de 2009 em: [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).
- [51] **APPLIED BIOSYSTEMS.** GeneScan™ - 120 LIZ Size Standard P/N 4324287. Acedido em: 10 de Julho de 2009 em: [http://search.vadlo.com/b/trk?uid=8bf5ea724407aa24&sn=158621799&ip=77.54.79.236&lgkKy=LIZ+Size+Standard&rn=2&http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042510.pdf](http://search.vadlo.com/b/trk?uid=8bf5ea724407aa24&sn=158621799&ip=77.54.79.236&lgkKy=LIZ+Size+Standard&rn=2&http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042510.pdf).

- [52] **RELATORIO ESTATISTICO DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE APOIO A VITIMA DE 2008**, Acedido em: 20 de Agosto de 2009 em: [http://www.apav.pt/portal/pdf/APAV\\_Totais\\_Nacionais\\_2008.pdf](http://www.apav.pt/portal/pdf/APAV_Totais_Nacionais_2008.pdf)
- [53] *Brief History of Forensic DNA Typing*. Disponível em [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/ppt/intro.pdf](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/ppt/intro.pdf)
- [54] **BIORAD**, Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual. Acedido em: 17 de Maio de 2009 em: [www.biorad.pt](http://www.biorad.pt).
- [55] **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA**. Acedido em: 25 de Maio de 2009 em: <http://ibge.gov.br>.
- [56] **INTERNATIONAL SOCIETY OF GENETIC GENEALOGY**. Acedido em: 27 de Julho de 2009 em: [http://www.isogg.org/tree/ISOGG\\_HapgrpI09.html](http://www.isogg.org/tree/ISOGG_HapgrpI09.html)
- [57] **USB**. Not using ExoSAP-IT®? Your loss. PCR Clean-Up from USB. Acedido em: 27 de Julho de 2009 em: [www.kellymillerlab.com/research/ExoSAP\\_IT.pdf](http://www.kellymillerlab.com/research/ExoSAP_IT.pdf).
- [58] **PREFEITURA MUNICIPAL DE RIBEIRÃO PRETO**. Acedido em: 15 de Julho de 2009 em: <http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/index.html>
- [59] **PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**. Acedido em: 27 de Julho de 2009 em: [www.saopaulo.sp.gov.br](http://www.saopaulo.sp.gov.br).
- [60] **QIAGEN**, QIAGEN Multiplex PCR Handbook 02/2008. Acedido em: 15 de Julho de 2009 em: [www1.qiagen.com/HB/MultiplexPCR](http://www1.qiagen.com/HB/MultiplexPCR).
- [61] **SANTOS, J.R.**, Imigração e Ascensão Social em Ribeirão Preto entre o final do século XIX e meados do XX. Acedido em: 19 de Julho de 2009 em: [http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2006/docspdf/ABEP2006\\_797.pdf](http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2006/docspdf/ABEP2006_797.pdf)
- [62] **ROCHE APPLIED SCIENCE**, Alkaline Phosphatase, shrimp (2007) Cat. No. 1175825000, Acedido em: 17 de Agosto de 2009 em: [www.roche.pt](http://www.roche.pt).

**ANEXOS**

## **ANEXO I.**

PROTOCOLO UTILIZADO PARA A EXTRACÇÃO DE DNA POR *CHELEX*<sup>®</sup> 100 A  
PARTIR DE MANCHAS DE SANGUE PARA ANÁLISE DE Y-SNPs

### Protocolo utilizado para a Extração de DNA por *CHELEX*<sup>®</sup> 100 a partir de manchas de sangue para análise de Y-SNPs

- 1 – Com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça<sup>1</sup>, fazer um pequeno corte na mancha de sangue das amostras com uma área de aproximadamente 3mm<sup>2</sup><sup>2</sup> que se coloca num tubo *ependorf* de 1,5 ml, previamente identificado e esterilizado com radiações Ultra Violeta (U.V.);
- 2 – Adicionar a cada tubo *ependorf* com a respectiva amostra 1 ml de água desionizada e autoclavada;
- 3 – Deixar os tubos fechados a incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos<sup>3</sup>;
- 4 – Centrifugar as amostras durante 3 minutos a uma velocidade de 14 000 rpm numa microcentrífuga;
- 5 – Retirar cuidadosamente o sobrenadante que é eliminado, deixando cerca de 30 µl de solução com a amostra em cada tubo *ependorf*;
- 6 – Adicionar 170 µl de *Chelex*<sup>®</sup> 100 a 5%, perfazendo um volume final de 200 µl<sup>4</sup>;
- 7 – Incubar num banho a 56°C durante 15 a 30 minutos;
- 8 – Agitar no *vortex* durante 5 a 10 segundos;
- 9 – Ferver<sup>5</sup> os tubos *ependorf* durante 8 minutos, não esquecendo de os furar com uma agulha<sup>6</sup>;
- 10 - Agitar novamente as amostras no *vortex* durante 5 a 10 segundos;

---

<sup>1</sup> Deve ter-se o cuidado de evitar contaminação entre amostras, lavando o material com lixívia e água Mili-Q, após a sua utilização entre as diferentes amostras.

<sup>2</sup> É importante respeitar a quantidade de amostra do protocolo, dado que um excesso de amostra pode resultar numa inibição da reacção de PCR.

<sup>3</sup> No caso de a amostra não ser fresca, esta deve ser agitada ocasionalmente por inversão ou suavemente no *vortex*.

<sup>4</sup> Deve cortar-se a ponta da pipeta para evitar que as resinas esféricas que constituem o *Chelex*<sup>®</sup> 100 se acumulem na ponta, impedindo a sua saída para a solução com as amostras.

<sup>5</sup> A fervura é necessária para o rompimento da célula e consequente libertação do DNA nuclear.

<sup>6</sup> A tampa dos tubos *ependorf* deve ser furada para permitir a saída do vapor de água, evitando deste modo a abertura dos mesmos durante a fervura.

11 – Centrifugar as amostras durante 2 a 3 minutos a uma velocidade de 14 000 rpm numa microcentrífuga<sup>7</sup>;

No final do protocolo, o DNA da amostra está em condições de ser amplificado.

Caso não se proceda de imediato à amplificação do DNA das amostras, estas devem ser armazenadas no frigorífico a 4°C ou no congelador a -20°C (ou mesmo -80°C quando o período de tempo for longo), prevenindo deste modo a actividade das nucleases<sup>8</sup> [13]. Posteriormente, para se proceder à amplificação do DNA, e após descongelamento à temperatura ambiente, devem repetir-se os passos 10 e 11 do protocolo de extracção.

---

<sup>7</sup> Este *spin* final na microcentrífuga faz com que a resina de *Chelex*® 100 fique no fundo do *eppendorf*, ficando o DNA a constituir a fracção sobrenadante.

<sup>8</sup> Deve ter-se o cuidado de colocar os tubos em posição vertical até ao congelamento total do produto extraído.



## **ANEXO II.**

PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR COM O *QIAGEN*<sup>®</sup> *MULTIPLEX PCR*  
*KIT* PARA ESTUDO DE Y-SNPs ATRAVÉS DE *MULTIPLEX 1* E *MULTIPLEX 2*

**PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR COM O *QIAGEN*<sup>®</sup> *MULTIPLEX PCR KIT PARA ESTUDO DE Y-SNPs ATRAVÉS DE MULTIPLEX 1 E MULTIPLEX 2***

- 1 – Determinar o número de amostras a amplificar (N), que deve incluir o controlo negativo (PCR negativo), e marcar N tubos de 200µl e um tubo de 500 µl para a mistura e iniciar a descontaminação. Simultaneamente, em local seguro e fisicamente separado, colocar o produto de extracção, reagentes do *Qiagen*<sup>®</sup> *Multiplex PCR kit* necessários e *primers* a descongelar.
- 2 – Preparar a *Master Mix* contendo:

<i>2X QIAGEN<sup>®</sup> MULTIPLEX PCR MASTER MIX</i>	<i>PRIMER MIX</i>	<i>H<sub>2</sub>O RNASE-FREE</i>
N x 5µl	N x 1µl	N x 3,5µl

sendo N<sup>9</sup> o número de amostras a amplificar, incluindo o controlo negativo da reacção de amplificação por PCR.

- 3 – Agitar fortemente a *Master Mix* no *vortex* e centrifugar numa microcentrífuga;
- 4 – Repartir 9,5µl da *Master Mix* por cada tubo de amostra (incluindo controlo negativo);
- 5 – Adicionar 0,5µl de produto extraído<sup>10</sup>, sendo o volume final de 10µl. No controlo negativo, adicionar a mesma quantidade de água adicionada à *Master Mix*;
- 6 – Colocar as amostras prontas a amplificar no termociclador;
- 7 – Armazenar o restante da amostra a 4°C, se reutilizadas num curto prazo de tempo, ou congelar a -20°C, mantendo os tubos na posição vertical até a amostra estar congelada.

Durante todo o processo de preparação das amostras para amplificação, deve ter-se o cuidado de colocar os reagentes e *Master Mix* em gelo, dado que se deve evitar oscilações de temperatura que alteram as características dos seus componentes.

<sup>9</sup> A unidade adicionada ao valor determinado para N ter por objectivo minimizar erros que possam resultar das sucessivas pipetagens. Quando o N for significativamente elevado, o (N+1) pode mesmo ser aumentado para (N+2).

<sup>10</sup> Se a amostra de DNA a amplificar tiver sido previamente congelada, deve ser agitada no *vortex* durante 5 a 10 segundos, após descongelamento à temperatura ambiente, e seguidamente centrifugada durante 3 minutos a uma velocidade de 14000 rpm numa microcentrífuga, antes de ser adicionada à mistura para amplificação.

## **ANEXO III.**

PROTOCOLO DE MINISEQUENCIÇÃO COM *SNAPSHOT™ MULTIPLEX KIT* (*APPLIED BIOSYSTEMS*) PARA ESTUDO DE Y-SNPs PRESENTES NOS *MULTIPLEX 1 E 2*

**PROTOCOLO DE MINISEQUENCIAÇÃO COM *SNAPSHOT™ MULTIPLEX KIT (APPLIED BIOSYSTEMS)* PARA ESTUDO DE *Y-SNPs* PRESENTES NOS MULTIPLEX 1 E 2**

- 1 – Marcar 1 tubo de 200µl, para o controlo negativo para a reacção com *SNaPshot™ kit*, um tubo de 500 µl para a mistura e iniciar a descontaminação. Simultaneamente, em local seguro e fisicamente separado, descongelar os reagentes do *SNaPshot™ Multiplex kit* necessários e SBE *primers* a descongelar.
- 2 – Preparar a *Master Mix* contendo:

<i>MULTIPLEX</i>	<i>SNAPSHOT™ MULTIPLEX READY REACTION MIX</i>	<i>SBE PRIMERS</i>	<i>H<sub>2</sub>O RNASE-FREE</i>
1	(N+1) x 1µl	(N+1) x 1,27µl	(N+1) x 1,23µl
2	(N+1) x 1µl	(N+1) x 1,5µl (0,675µl SBE <i>primer</i> + 0,825µl H <sub>2</sub> O)	(N+1) x 1µl

sendo N o número de amostras a amplificar, incluindo o controlo negativo da reacção de amplificação por PCR, ao qual foi adicionado o controlo negativo desta reacção

- 3 – Agitar fortemente a *Master Mix* no *vortex* e centrifugar numa microcentrífuga;
- 4 – Repartir 3,5µl da *Master Mix* por cada tubo de amostra purificada por Exo-SAP (incluindo controlo negativo da primeira amplificação);
- 5 – No controlo negativo de *SNaPshot™*, adicionar 1,5µl de água desionizada e autoclavada.
- 6 – Colocar as amostras no termociclador e iniciar o programa.

Nesta etapa não é aconselhável interromper o processo e guardar a amostra a 4°C ou mesmo -20°C uma vez que se revela numa genotipagem menos eficaz e robusta. Após ter terminado a reacção no termociclador, deve prosseguir-se o protocolo. Os momentos ideais para interromper o processo encontram-se assinados com uma seta preta nos protocolos das Figuras 8 e 9.

## ANEXO IV.

### TABELA DE RESULTADOS:

CARACTERIZAÇÃO DOS HAPLOGRUPOS DO CROMOSSOMA Y PRESENTES NA POPULAÇÃO DE RIBEIRÃO PRETO (ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL) A PARTIR DO ESTUDO DE 14 Y-SNPs INCLUÍDOS EM 2 *MULTIPLEXES*, DE ACORDO COM A ESTRATÉGIA SUGERIDA POR BRIÓN *ET AL.* (2004), POR MINISEQUÊNCIAÇÃO COM *SNAPSHOT™ MULTIPLEX* (*APPLIED BIOSYSTEMS*), SEGUIDA DE ANÁLISE COMPARATIVA COM A ÁRVORE DOS HAPLOGRUPOS BINÁRIOS DO CROMOSSOMA Y HUMANO PROPOSTA PELO YCC E ÁRVORE REVISTA POR KAREFET *ET AL.* (2007) (N=81).

**Tabela IV.1** – Tabela de Resultados: Caracterização dos haplogrupos do cromossoma Y presentes na população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil) a partir do estudo de 14 Y-SNPs incluídos em 2 *multiplexes*, de acordo com a estratégia sugerida por BRIÓN *et al.* (2004), por minisequênciação com *SNaPshot<sup>TM</sup> Multiplex* (*Applied Biosystems*), seguida de análise comparativa com a árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano proposta pelo YCC e árvore revista por KAREFET *et al.* (2007) (N=81).

Y-SNP	Multiplex 1									Haplogrupo	Multiplex 2					Haplogrupo
	SRV1532	M213	M9	M70	M22	Tat	92R7	M173	P25		M170	M62	M172	M26	M201	
Deteção	A—G	A—G	C—G	T—G	A—G	A—G	Tc—T	A—C	c—Ac	T—G	A—G	T—G	c—T	G—T		
Mutação	A→G	T→C	C→G	A→C	A→G	T→C	G→A	A→C	C→A	A→C	T→C	T→G	G→A	G→T		
BSP 12	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 14	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 18	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 23	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 25	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 26	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 30	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 35	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	G	A	T	C	G	I(xI2a2)
BSP 38	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 42	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 44	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 51	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 56	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 58	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	T	C	T	G
BSP 61	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						

BSP 74	G	C	G	C	A	T	G	A	C	T						
BSP 75	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 77	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 86	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 88	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	G	A	T	C	G	I(xI2a2)
BSP 92	A	C	G	A	A	T	A	C	C	R <sub>1</sub> a						
BSP 94	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 95	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 100	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 102	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 107	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	T	C	G	F(xG,I,J1a,J2,K)
BSP 120	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 125	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 132	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 144	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 145	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 158	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	A	T	T	C	T	G
BSP 159	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 161	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	T	C	T	G
BSP 163	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	G	A	T	C	G	I(xI2a2)
BSP 163	G	C	G	C	A	T	G	A	C	T						
BSP 165	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						

BSP 166	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 167	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 169	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 170	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 171	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 172	G	C	G	A	A	T	G	A	C	$K(xL,N1c,S)$						
BSP 174	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	T	C	G	F(xG,I,J1a,J2,K)
BSP 175	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 176	A	T	C	A	A	T	G	A	C	A						
BSP 179	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 180	G	C	G	A	A	T	A	A	C	$P(xR1)$						
BSP 181	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 182	A	C	G	A	A	T	A	C	C	$R_1a$						
BSP 184	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 185	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 186	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 188	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 190	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	T	C	T	G
BSP 197	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 198	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 199	G	C	G	A	A	T	A	C	A	$R_1b_1$						
BSP 200	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2



BSP 203	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 204	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	G	A	T	C	G	I(xI2a2)
BSP 205	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 208	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 209	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 210	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 212	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 214	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 215	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 216	G	G	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 217	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 218	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 222	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	G	A	T	C	G	I(xI2a2)
BSP 253	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 255	G	C	G	C	A	T	G	A	C	T						
BSP 256	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 270	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 286	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						
BSP 287	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	G	A	T	C	G	I(xI2a2)
BSP 288	G	T	C	A	A	T	G	A	C	B, C, D ou E						
BSP 289	G	C	C	A	A	T	G	A	C	F(xK)	T	A	G	C	G	J2
BSP 290	G	C	G	A	A	T	A	C	A	R <sub>1</sub> b <sub>1</sub>						

## ÍNDICE DE GRAVURAS

Página

Gravura 1 – Disponível em <a href="http://www.scientificamerican.com/media/inline/blog/Image/DNA-genome-personal.jpg">http://www.scientificamerican.com/media/inline/blog/Image/DNA-genome-personal.jpg</a> , <a href="http://www.acadepro.com.br/es/publico/images/mapa_brasil.gif">http://www.acadepro.com.br/es/publico/images/mapa_brasil.gif</a> , <a href="http://www.radios.com.br/gif/mapa_sao_paulo_novo.gif">http://www.radios.com.br/gif/mapa_sao_paulo_novo.gif</a> (adaptado) .....	capa e contra capa
--	--------------------

Gravura 2 – Disponível em <a href="http://www.uwlax.edu/ls/news/archivednews/2007spring/images/dna.jpg">http://www.uwlax.edu/ls/news/archivednews/2007spring/images/dna.jpg</a> .....	14
Gravura 3 – Disponível em <a href="http://www.alzheimers.org/pubs/conv10n3and4.html">www.alzheimers.org/pubs/conv10n3and4.html</a> .....	17
Gravura 4 – Disponível em <a href="http://www.biolsci.monash.edu.au/.../info/gen3051.html">www.biolsci.monash.edu.au/.../info/gen3051.html</a> .....	21
Gravura 5 – Disponível em <a href="https://sites.google.com/a/luther.edu/genetics/_/rsrc/1236044497909/students/tyler-best/tyler-best-personal-genomics/SNP.png">https://sites.google.com/a/luther.edu/genetics/_/rsrc/1236044497909/students/tyler-best/tyler-best-personal-genomics/SNP.png</a> .....	24
Gravura 6 – Disponível em <a href="http://www.bio-teck.com/images/dna1">www.bio-teck.com/images/dna1</a> .....	27
Gravura 7 – Disponível em <a href="http://www.microsynth.ch/.../Diverses/genotyping.htm">www.microsynth.ch/.../Diverses/genotyping.htm</a> .....	28
Gravura 8 – Disponível em <a href="http://www.forumlabo.com/Forumlabo/UK/presse/news/qiagen2">www.forumlabo.com/Forumlabo/UK/presse/news/qiagen2</a> .....	30
Gravura 9 – Disponível em <a href="http://vidacheiadecoisas.files.wordpress.com/2009/02/bg_brasil1.jpg?w=300&amp;h=218">http://vidacheiadecoisas.files.wordpress.com/2009/02/bg_brasil1.jpg?w=300&amp;h=218</a> .....	32
Gravura 10 – Disponível em <a href="http://www.ifi-test.com/images/self_promo_skyscraper.jpg">http://www.ifi-test.com/images/self_promo_skyscraper.jpg</a> .....	38
Gravura 11 – Disponível em <a href="http://www.consumergenetics.com/images/3-step-blood-collection.png">http://www.consumergenetics.com/images/3-step-blood-collection.png</a> , <a href="http://www.whatman.com/References/WGP_1351_Blood_B.pdf">http://www.whatman.com/References/WGP_1351_Blood_B.pdf</a> e <a href="http://www.securityandsafetysupply.com/department-supplies/evidence-5.html">http://www.securityandsafetysupply.com/department-supplies/evidence-5.html</a> .....	39
Gravura 12 – Disponível em <a href="http://www.orlandoinvestigations.com/DNA_LAB_TESTING.HTML">www.orlandoinvestigations.com/DNA_LAB_TESTING.HTML</a> .....	41
Gravura 13 – SOBRINO <i>et al.</i> (2005) .....	43

Gravura 14 – Disponível em <a href="http://home.nvg.org/~forthun/gif/pcr-3stp.gif">http://home.nvg.org/~forthun/gif/pcr-3stp.gif</a> .....	49
Gravura 15 – Disponível em <a href="http://www.usbweb.com/assets/78200_f1.gif">http://www.usbweb.com/assets/78200_f1.gif</a> .....	55
Gravura 16 – Disponível em <a href="http://www.appliedbiosystems.com">www.appliedbiosystems.com</a> .....	57
Gravura 17 – Disponível em <a href="http://www.physorg.com/newman/gfx/news/2006/2-down_ent.jpg">http://www.physorg.com/newman/gfx/news/2006/2-down_ent.jpg</a> .....	61
Gravura 18 – Disponível em <a href="http://www.bristol.ac.uk/news/2009/6394.html/2009-06-05.1681948413/image">http://www.bristol.ac.uk/news/2009/6394.html/2009-06-05.1681948413/image</a> , <a href="https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/AB-091304539_s_3130ProductImage_orderpg_small.jpg">https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/AB-091304539_s_3130ProductImage_orderpg_small.jpg</a> e <a href="https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/310_014.jpg">https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/htdocs/productMgr/images/310_014.jpg</a> .....	63
Gravura 19 – Disponível em <a href="http://humods.com/uploaded_images/DNA-assembly-fab-717561">http://humods.com/uploaded_images/DNA-assembly-fab-717561</a> , <a href="http://www.dps.state.ak.us/CrimeLab/Images/DNA/3130insideThumb.jpg">http://www.dps.state.ak.us/CrimeLab/Images/DNA/3130insideThumb.jpg</a> e <a href="http://humods.com/uploaded_images/nano-replaces-chemo-717245">http://humods.com/uploaded_images/nano-replaces-chemo-717245</a> .....	66
Gravura 20 – Disponível em <a href="http://pubs.acs.org/appl/literatum/publisher/achs/journals/production/nalefd/2009/nalefd.2009.9.issue7/nl9002969/images/medium/nl-2009-002969_0004.gif">http://pubs.acs.org/appl/literatum/publisher/achs/journals/production/nalefd/2009/nalefd.2009.9.issue7/nl9002969/images/medium/nl-2009-002969_0004.gif</a> .....	68
Gravura 21 – YCC (2002) .....	71
Gravura 22 – Imagem da autora .....	72
Gravura 23 – ONOFRI <i>et al</i> (2006).....	75
Gravura 24 – BRION <i>et al</i> (2004). .....	76
Gravura 25 – BRION <i>et al</i> (2004). .....	79

Gravura	26	–	Disponível em	<a href="http://i.pbase.com/o3/83/4383/1/111494168.d9iexYll.HaplogroupFYDNAMap.jpg">http://i.pbase.com/o3/83/4383/1/111494168.d9iexYll.HaplogroupFYDNAMap.jpg</a> .....	82
Gravura	27	–	Disponível em	<a href="http://www.mygenetree.com/images/MGT_genetic_geneology_issues_family_tree_0309_01.jpg">http://www.mygenetree.com/images/MGT_genetic_geneology_issues_family_tree_0309_01.jpg</a> .....	84
Gravura	28	–	Disponível em	<a href="http://www.mygenetree.com/images/MGT_genetic_geneology_issues_family_tree_0309_01.jpg">http://www.mygenetree.com/images/MGT_genetic_geneology_issues_family_tree_0309_01.jpg</a> , <a href="http://www.dnareunion.org/image/home_banner_01.jpg">http://www.dnareunion.org/image/home_banner_01.jpg</a> , <a href="http://news.medill.northwestern.edu/uploadedImages/News/Chicago/Images/Urban/Peltzer%20Pekarsky%20family%20small.jpg">http://news.medill.northwestern.edu/uploadedImages/News/Chicago/Images/Urban/Peltzer%20Pekarsky%20family%20small.jpg</a> , <a href="http://www.myheritageimages.com/H/storage/blogs/genealogyblog/MH_AFRIGENEAS.jpg">http://www.myheritageimages.com/H/storage/blogs/genealogyblog/MH_AFRIGENEAS.jpg</a> .....	86
Gravura	29	–	Disponível em	<a href="http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-asia.jpg">http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-asia.jpg</a> , <a href="http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-americas.jpg">http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-americas.jpg</a> , <a href="http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-africa.jpg">http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-africa.jpg</a> , <a href="http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-europe.jpg">http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-europe.jpg</a> , <a href="http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-oceania.jpg">http://dna.ancestry.com/assets/faces-pat-oceania.jpg</a> e <a href="http://www.dnatesting.com/ancestry/images/NativeAmerican-DNA.gif">http://www.dnatesting.com/ancestry/images/NativeAmerican-DNA.gif</a> .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

- Figura 1** – Representação ilustrativa da relação entre a dupla hélice de DNA e os cromossomas e sua localização no interior das células eucariotas. Disponível em <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/chromosome.jpg>.....18
- Figura 2** – Representação morfológica do cromossoma e sua relação com a Dupla Hélice de DNA. Disponível em <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/chromosomestructure.jpg> (adaptado) .....19
- Figura 3** – Representação esquemática da estrutura do cromossoma Y. BUTLER, J.M. (2001) (adaptado) .....23

- Figura 4** – Modelo revisto da árvore de YCC proposto por KARAFET *et al.* (2008) .....29
- Figura 5** – Mapa político do Brasil. Disponível em <http://www.mapsofworld.com/brazil/maps/map-brazil.jpg> (adaptado) .....33
- Figura 6** – Esquema representativo da localização de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo e deste no Brasil. [http://marketplace.publicradio.org/i/news/b\\_south\\_america.jpg](http://marketplace.publicradio.org/i/news/b_south_america.jpg), [http://i.ehow.com/images/GlobalPhoto/Articles/5082717/223360main\\_Full.jpg](http://i.ehow.com/images/GlobalPhoto/Articles/5082717/223360main_Full.jpg) e [http://www.radios.com.br/gif/mapa\\_sao\\_paulo\\_novo.gif](http://www.radios.com.br/gif/mapa_sao_paulo_novo.gif) (adaptado) .....34
- Figura 7** – Representação esquemática das principais metodologias para o estudo de SNPs. SOBRINO *et al* (2005) .....42
- Figura 8** – Esquema geral do estudo de Y-SNPs por genotipagem através do *ABI Prism<sup>®</sup> SNaPshot<sup>™</sup> Multiplex kit* (*Applied Biosystems*) .....44
- Figura 9** – Protocolo experimental para estudo de Y-SNPs para *Multiplex 1* .....47
- Figura 10** – Protocolo experimental para estudo de Y-SNPs para *Multiplex 2* .....48
- Figura 11** – Termociclador *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2700* da *Applied Biosystems*. Disponível em [http://escience.ws/b572/L3/images/2700\\_3.gif](http://escience.ws/b572/L3/images/2700_3.gif) .....52
- Figura 12** – Esquema de acção de *ExoSAP-IT<sup>®</sup>* (usb<sup>®</sup>). Disponível em [http://www.usbweb.com/assets/78200\\_f1.gif](http://www.usbweb.com/assets/78200_f1.gif) .....56
- Figura 13** – Esquema geral do processo de minisequenciação por aplicação do *SNaPshot<sup>™</sup> Multiplex kit* (*Applied Biosystems*). Disponível em [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) ....58
- Figura 14** – Primers emparelhados ao template e estendidos aos quais foram adicionadas caudas. Disponível em [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).....59

<b>Figura 15</b> – Sistema de minisequênciação através do <i>SNaPshot™ Multiplex kit</i> ( <i>Applied Biosystems</i> ). Disponível em docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/00105041.pdf (adaptado) .....	69
<b>Figura 16</b> – Representação dos fragmentos do padrão interno <i>GeneScan®-120 Liz</i> ( <i>Applied Biosystems</i> ) .....	70
<b>Figura 17</b> – Árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano proposta pelo <i>Y CHROMOSOME CONSORTIUM (YCC)</i> . YCC (2002) .....	73
<b>Figura 18</b> – Árvore dos haplogrupos revista por KARAFET <i>et al.</i> (2008) .....	74
<b>Figura 19</b> – Representação de um electroforegrama de Y-SNPs a partir da análise do <i>multiplex 1</i> . BRIÓN <i>et al</i> (2004) .....	77
<b>Figura 20</b> – Electroforegramas característico de cada um dos haplogrupos determinados após estudo do <i>multiplex 1</i> .....	78
<b>Figura 21</b> – Representação de um electroferograma de Y-SNPs a partir da análise do <i>multiplex 2</i> BRIÓN <i>et al</i> (2004) .....	70
<b>Figura 22</b> – Electroforegrama característico de uma amostra pertencente ao Haplogrupo F(xK) .....	80
<b>Figura 23</b> – Electroforegramas característico de cada um dos haplogrupos determinados após estudo do <i>multiplex 2</i> .....	81
<b>Figura 24</b> – Representação gráfica da distribuição dos haplogrupos da população em estudo .....	83
<b>Figura 25</b> – “Árvore” dos haplogrupos do cromossoma Y da população de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), obtida na sequência da análise dos 14 Y-SNPs .....	85



## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>TABELA II.1</b> – Relação dos SNPs do cromossoma Y aplicados neste estudo, sua distribuição por multiplex [de acordo com BRIÓN <i>et al.</i> (2004)], indicação da sua alteração nucleotídica no caso de mutação, e respectiva detecção .....	45
<b>TABELA II.2</b> – Composição do <i>QLAGEN</i> <sup>®</sup> <i>Multiplex PCR kit</i> .....	52
<b>TABELA II.3</b> – Caracterização dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de Y-SNPs, distribuídos por <i>multiplex</i> (de acordo com BRIÓN <i>et al.</i> 2004) .....	53

<b>TABELA II.4</b> – Condições de PCR para a amplificação dos <i>multiplexes</i> .....	53
<b>TABELA II.5</b> – Programa do termociclador para purificação <i>Exo-Sap</i> .....	56
<b>TABELA II.6</b> – Distribuição dos fluorocromos pelos ddNTPs e indicação da cor atribuída na sua análise .....	59
<b>TABELA II.7</b> – Caracterização dos SBE primers aplicados na reacção de minisequenciação dos Y-SNPs em estudo. ....	60
<b>TABELA II.8</b> – Programa de PCR para a minisequenciação através de <i>SNaPshot<sup>TM</sup> kit</i> .....	60
<b>TABELA II.9</b> – Condições de PCR para a acção enzimática da enzima <i>SAP</i> .....	62
<b>TABELA II.10</b> – Protocolo de preparação das amostras para a electroforese capilar nos sequenciadores automáticos <i>ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer</i> e <i>ABI Prism<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer</i> .....	67
<b>TABELA III.1</b> – Caracterização dos Y-SNPs que compõem o <i>multiplex 1</i> .....	77
<b>TABELA III.2</b> – Caracterização dos Y-SNPs que compõem o <i>multiplex 2</i> .....	80
<b>TABELA III.3</b> – Caracterização dos haplogrupos presentes na população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil).....	83
<b>TABELA IV.1</b> – Tabela de Resultados: Caracterização dos haplogrupos do cromossoma Y presentes na população de Ribeirão Preto (Estado de São Paulo, Brasil) a partir do estudo de 14 Y-SNPs incluídos em 2 <i>multiplexes</i> , de acordo com a estratégia sugerida por BRIÓN <i>et al.</i> (2004), por minisequenciação com <i>SNaPshot<sup>TM</sup> Multiplex (Applied Biosystems)</i> , seguida de análise comparativa com a árvore dos haplogrupos binários do cromossoma Y humano proposta pelo YCC e árvore revista por KAREFET <i>et al.</i> (2007) (N=81).....	108