

Rafaela Coutinho Miranda

**RELEVÂNCIA DA INFORMAÇÃO ASSOCIADA DOS
SEGMENTOS (HVS-1, HVS-2 E HVS-3) DA REGIÃO
HIPERVARIÁVEL DO DNA MITOCONDRIAL NA
DETERMINAÇÃO DE HAPLOGRUPOS DE
ANCESTRALIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado junto ao curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito da
disciplina BIO7006 - Trabalho de
Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Rita
Marrero

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Miranda, Rafaela Coutinho

Relevância da informação associada dos segmentos (HVS-1, HVS-2 e HVS-3) da Região Hipervariável do DNA mitocondrial na determinação de haplogrupos de ancestralidade. / Rafaela Coutinho Miranda ; orientadora, Andrea Rita Marrero - Florianópolis, SC, 2017.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. mtDNA. 3. Ancestralidade. 4. Região Controle. 5. Grande Florianópolis. I. , Andrea Rita Marrero. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Rafaela Coutinho Miranda

**RELEVÂNCIA DA INFORMAÇÃO ASSOCIADA DOS
SEGMENTOS (HVS-1, HVS-2 E HVS-3) DA REGIÃO
HIPERVARIÁVEL DO DNA MITOCONDRIAL NA
DETERMINAÇÃO DE HAPLOGRUPOS DE
ANCESTRALIDADE**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para o cumprimento da disciplina TCC II (BIO7016) e aprovado em sua forma final pela banca examinadora.

Florianópolis, 09 de Fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso de Ciência Biológicas

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Andrea Rita Marrero
Orientadora
UFSC

Prof.^a Dr.^a Sara Emelie Lofgren
UFSC

Me. Emily Bruna Justino
UFSC

Este trabalho é dedicado à toda minha família, pelo apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Finalmente, após quatro anos e meio de curso, chegou este momento. Anos estes que permitiram que meu lado profissional fosse desenvolvido, e que contribuíram também, para o meu amadurecimento pessoal. Posso afirmar que a pessoa que está concluindo o curso, é totalmente diferente daquela pessoa que ingressou. Aprendi a enxergar o mundo de uma forma diferente, através das diversas experiências vividas durante este período.

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Centro de Ciências Biológicas e ao Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética pelo suporte ao longo destes anos. E também ao CNPq pelo apoio a esta pesquisa. Agradeço à minha orientadora Dra. Andrea Marrero, pela oportunidade dada a mim. Tenho muito orgulho de ter sido orientada por uma pessoa com tanta paixão pelo que faz. Às professoras: Dra. Iliada, Dra. Sara e Dra. Yara, agradeço pela oportunidade de trabalhar no LAPOGE, e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Agradeço às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe, Raquel, e meu pai, Sérgio. Obrigada por me proporcionarem a melhor educação e pelo incentivo constante ao longo de toda essa trajetória. Palavras nunca serão suficientes para expressar a minha gratidão. Aos meus irmãos, Renata e Rodrigo, e ao meu cunhado Augusto, pelo companheirismo, risadas e constante torcida. Vocês todos foram os grandes responsáveis pela conclusão desta etapa, e com certeza, sem vocês, nada disso seria possível.

A todos os tios, tias, avós, primos e primas que sempre demonstraram interesse na minha carreira, o meu muito obrigado. Vocês sempre me incentivaram com os seus questionamentos e comentários relacionados ao mundo da biologia. Um agradecimento especial vai para o meu avô Nelson, que não está mais neste plano e que faz muita falta. Queria que o senhor visse essa minha conquista. Muito obrigada por me passar esse amor pela natureza que tinha. Eras um homem simples, mas muito inteligente, e que se tivesse as mesmas oportunidades que tive, teria um futuro ainda mais brilhante.

Às minhas companheiras e amigas de curso, Alana, Dani e Sabrina, que ingressaram nesta viagem junto comigo e que permaneceram sempre do meu lado. Obrigada pela amizade. Obrigada pelos almoços no RU, pelas idas ao cinema, ao sushi, festas, ou somente à lanchonete para comer aquela famosa coxinha. Aprendi muita coisa da

vida com vocês e tenho muito orgulho das pessoas que vocês são. Vocês marcaram a minha vida e vão sempre fazer parte dela. Torço e vou continuar torcendo muito para o sucesso de todas vocês. Vocês com certeza me mudaram para melhor, e espero que a nossa conexão nunca acabe.

Aos colegas do grupo de pesquisa Evolução Molecular: Amanda, Flávia, Gabriela, Joane, Lucas, Sophia, pelo constante suporte durante esta etapa. E um agradecimento especial à Iara, Mairian e à mestrande Mariana, por sempre estarem dispostas a me ajudar com parte dos experimentos. Também agradeço o suporte das meninas da pós-graduação Alice, Clisten, Emily, Leili e Mari pelo auxílio durante os experimentos e pelos ensinamentos, assim como às demais colegas Andrezza, Alessandra, Kamilla e Emiliana.

Sou muito grata a todos os professores que contribuíram de alguma forma para a minha formação, especialmente os que lecionaram as disciplinas de genética, que me fizeram amar ainda mais esta área: Daniela de Toni, Paulo Hoffman, Luisa Damásio Pitaluga e novamente, e principalmente, Andrea Rita Marrero.

Muito obrigada!

"A mind needs books as sword needs a whetstone,
if it is to keep its edge."

(George R.R. Martin, As Crônicas de Gelo e Fogo)

RESUMO

O estado de Santa Catarina apresenta uma população miscigenada devido a contribuições étnicas ameríndias, europeias e africanas. Visando demonstrar a relevância na determinação de haplogrupos de ancestralidade através da análise dos três sítios polimórficos do DNA mitocondrial em conjunto, 57 amostras de sangue de indivíduos nascidos na grande Florianópolis foram amplificadas e sequenciadas para as regiões HVS-2 e HVS-3. Além disto, 41 amostras foram analisadas em relação às três regiões hipervariáveis (HVS-1, HVS-2 e HVS-3). Haplogrupos foram determinados para estes indivíduos considerando os segmentos em conjunto e separados. Utilizou-se o *software* BioEdit para o alinhamento com a sequência mitocondrial referência (rCRS) e edição. Com o auxílio da árvore filogenética *mtDNA tree Build 16* houve a confirmação da existência das mutações, e do *Mitomaster* os haplogrupos foram determinados. Para a região HVS-2, foram encontrados haplogrupos mitocondriais europeus (84%) e ameríndios/asiáticos (16%), enquanto que para a região HVS-3 observou-se haplogrupos europeus (83%), ameríndios/asiáticos (12%) e africanos (5%). Analisando os dois segmentos como um único, os haplogrupos europeus apresentaram a maior frequência (88%), seguidos dos ameríndios/asiáticos (12%). Para toda a região controladora haplogrupos europeus (94%), ameríndios/asiáticos (3%) e africanos (3%) foram encontrados. Alguns haplogrupos foram alterados com a adição de mais segmentos hipervariáveis na investigação, indicando a importância da análise de toda a região controladora.

Palavras-chave: mtDNA; Ancestralidade; Região Controle; Grande Florianópolis.

ABSTRACT

The state of Santa Catarina presents a mixed population due to Amerindian, European and African ethnic contributions. Aiming to demonstrate the relevance of the determination of haplogroups of ancestry through analysis of the three polymorphic sites of mitochondrial DNA together, 57 blood samples from individuals born in Florianópolis and surrounding cities were amplified and sequenced for the HVS-2 and HVS-3 regions. In addition, 41 samples were analyzed for the three hypervariable regions (HVS-1, HVS-2 and HVS-3). Haplogroups were determined for these individuals considering the segments separated and together. BioEdit software was used for alignment with mitochondrial sequence reference (rCRS) and editing. Using the phylogenetic tree mtDNA tree Build 16 the existence of the mutations was confirmation, and with Mitomaster the haplogroups were determined. For the HVS-2 region, European (84%) and Amerindian/Asian (16%) mitochondrial haplogroups were found, whereas for the HVS-3 region, European (83%), Amerindian/Asian (12%) and African haplogroups (5%). Analyzing the two segments together, European haplogroups showed the highest frequency (88%), followed by Amerindians/Asians (12%). For the entire control region, European haplogroups (94%), Amerindians/Asians (3%) and Africans (3%) were found. Some haplogroups were altered with more hypervariable segments added in the investigation, indicating the importance of analyzing the entire control region.

Keywords: mtDNA; Ancestry; Control Region; Florianopolis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do DNA mitocondrial humano	26
Figura 2. Estrutura da Região Controle, Hipervariável, ou <i>D-loop</i> do mtDNA, ilustrando as três Regiões Hipervariáveis (HVS1, HVS2 e HVS3 representadas na figura como HV1, HV2 e HV3, respectivamente)	27
Figura 3. Mapa das migrações humanas estimadas a partir dos estudos com mtDNA e distribuição dos haplogrupos mitocondriais	28
Figura 4. Gel de Agarose com seis amostras (1-6) e um controle negativo (CN). As bandas que emitiam luz foram consideradas com uma boa amplificação e seguiram para a próxima etapa	38
Figura 5. Proporção encontrada de haplogrupos para a região HVS2 em 57 indivíduos da grande Florianópolis.....	43
Figura 6. Proporção encontrada de haplogrupos para a região HVS3 em 57 indivíduos da Grande Florianópolis	44
Figura 7. Proporção encontrada de haplogrupos mitocondriais em 57 indivíduos nascidos analisando as regiões HVS2 e HVS3 juntas	46
Figura 8. Proporção encontrada de haplogrupos mitocondriais em 41 indivíduos nascidos na grande Florianópolis através da análise das três regiões hipervariáveis do mtDNA	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição do número de amostras em relação ao local de nascimento dos indivíduos	35
Tabela 2. Sequência do <i>primer</i> utilizado para a amplificação das regiões HVS2 e HVS3	36
Tabela 3. Classificação em haplogrupos dos 57 indivíduos sequenciados para as regiões HVS2 e HVS3	41
Tabela 4. Diversidade observada de haplogrupos ameríndios, africanos e europeus a partir da análise das regiões HVS2 e HVS3	46
Tabela 5. Diversidade encontrada de haplogrupos ameríndios, africanos e europeus a partir da análise dos três segmentos hipervariáveis em 41 indivíduos nascidos na região da grande Florianópolis (AMR - Ameríndios; AST - Asiáticos; AFR - Africanos; EUR - Europeus).....	48
Tabela 6. Classificação em haplogrupos de 41 indivíduos da grande Florianópolis a partir da análise das três regiões hipervariáveis	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
CRS	Sequência Referência de Cambrigde (do inglês <i>Cambrigde Reference Sequence</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (do inglês <i>ethylenediaminetertaacetic acid</i>)
EtOH	Etanol
F	do inglês <i>Foward</i>
HCl	Ácido clorídrico
HVS	Região Hipervariável (do inglês <i>High Variation Segment</i>)
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
M	Molar
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
mL	Militros
mM	Milimolar
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
pb	Pares de base nucleotídicas
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
R	do inglês <i>Reverse</i>
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecilo Sulfato de Sódio
QSP	Quantidade suficiente para
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. DNA MITOCONDRIAL.....	25
1.2. AMERÍNDIOS.....	28
1.3. EUROPEUS.....	29
1.4. AFRICANOS.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. OBJETIVO GERAL.....	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	35
3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	35
3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	36
3.4. ELETROFORESE.....	37
3.5. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	38
3.6. PRECIPITAÇÃO DO DNA.....	39
3.7. ANÁLISES IN SÍLICO.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

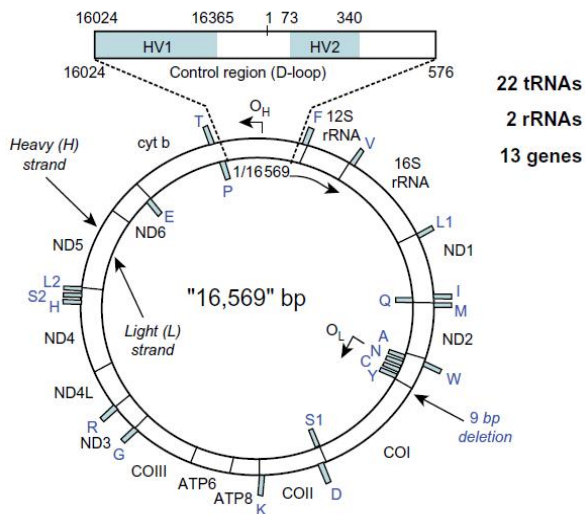
1.1. DNA MITOCONDRIAL

O genoma mitocondrial é encontrado nas organelas citoplasmáticas denominadas mitocôndrias, que estão em grande número em células nucleadas (BUTLER, 2012). Em humanos, este genoma é encontrado em cópias bastante numerosas, podendo totalizar entre 100 a 10000 cópias por célula (SANCHES, 2013).

Este genoma é constituído por uma dupla fita de DNA circular e formado por duas regiões, uma codificadora e uma não codificadora. A região codificadora totaliza 37 genes, onde treze destes codificam proteínas que atuam no processo de fosforilação oxidativa, e o restante é responsável pela transcrição de RNAs transportadores e ribossomais (BUDOWLE et al., 2003) (Fig,1). Por sua vez, a região não codificadora, apresenta genes que atuam na regulação da replicação e transcrição do genoma mitocondrial. Por expressar proteínas essenciais específicas, a região codificadora necessita de um reparo mais acentuando, e se torna menos polimórfica. Diferente do que ocorre na região não codificadora (LEE; JOHNSON, 2006).

Em 1981, Anderson e colaboradores determinaram a sequência do mtDNA humano, reconhecendo 16.569 pb, denominada *Cambridge Reference Sequence* (CRS). Esta foi utilizada como referência para comparações, mas em 1999 foi revisada e corrigida por Andrews e colaboradores, denominando-a *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS), sendo esta utilizada até os dias atuais.

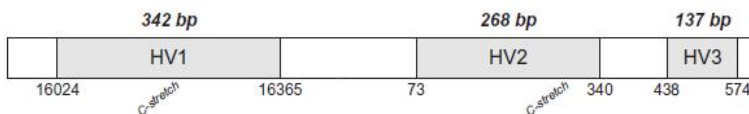
Figura 1. Mapa do DNA mitocondrial humano



Fonte: BUTLER, 2011

A região não codificadora é constituída por uma sequência considerada pequena, e é conhecida também como região controladora, D-loop, que faz referência a fase inicial da replicação desta região, onde a fita recém sintetizada se desprende, formando uma “bolha”. E ainda, é denominada região hipervariável (HVS, do inglês *Hipervariable Segment*). Esta última denominação faz referência a maior taxa de mutações em sua sequência ao longo da evolução (BUDOWLE *et al.*, 2003). Isto se deve à deficiência no mecanismo de reparo de mutações desta sequência causado pela baixa fidelidade da DNA polimerase mitocondrial (LEE; JOHNSON, 2006). A taxa de mutação em sua sequência é de 10 a 20 vezes maior, se comparada com o genoma nuclear (BROWN *et al.* 1982; NECKELMANN *et al.* 1987; WALLACE *et al.* 1987). Ela apresenta três sub-regiões, estas com um alto índice polimórfico, se comparado as outras porções de todo o genoma mitocondrial: a HVSI (342 pb – posição 16.024-16.365), HVSII (268 pb – posição 73 – 340) e a HVSIII (137 pb – posição 438 – 574) (LUTZ *et al.*, 2000; VANECEK *et al.*, 2004) (Fig.2).

Figura 2. Estrutura da Região Controle, Hipervariável, ou *D-loop* do mtDNA, ilustrando as três Regiões Hipervariáveis (HVS-1, HVS-2 e HVS-3).



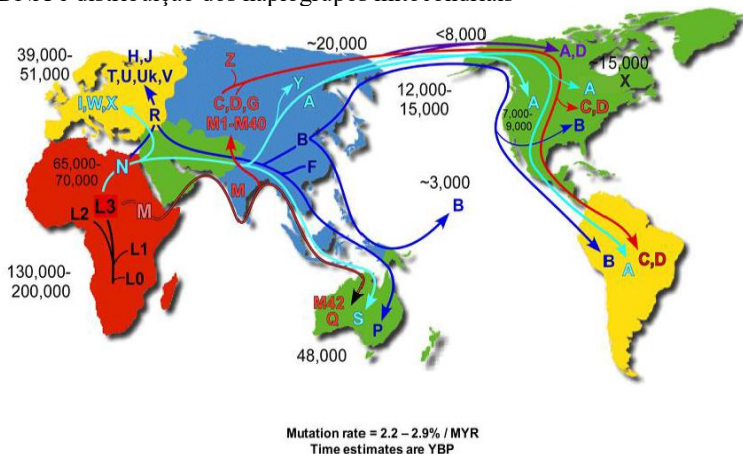
Fonte: BUTLER, 2011.

O genoma mitocondrial, ou mitogenoma, apresenta uma série de propriedades úteis para inferir na história evolutiva de populações humanas (STONEKING *et al.*, 1990). Uma delas é seu elevado número de cópias por células, tornando fácil a obtenção do material genético. Além disto, ele é haplóide e apresenta herança matrilinear, onde as fêmeas transmitem o genoma à toda sua prole, permitindo um rastreamento do ancestral da linhagem materna (PANETO, 2006).

Ao longo da expansão humana, as sequências nucleotídicas do mtDNA sofreram inúmeras mutações, que foram sendo acumuladas, proporcionando, assim, uma grande diversidade entre indivíduos e entre populações (WALLACE, CHALKIA, 2013). As sequências identificadas por um conjunto de variações são denominadas **haplótipos**. Quando compartilham polimorfismos, estes são agrupados em clados, intitulados **haplogrupos**. (BUDOWLE *et al.*, 2003). Novas ramificações foram originadas na árvore filogenética do mitogenoma, a partir de substituições nucleotídicas nas sequências. Agrupamentos filogenéticos formados foram considerados correspondentes com determinadas regiões geográficas. Há haplogrupos específicos da África, da Ásia, da Europa/Oeste da Eurásia, e das Américas (REIDLA *et al.*, 2003). A sequência rCRS, por exemplo, é frequente em populações europeias, e por isto é classificada em haplogrupos europeus (ANDREWS *et al.*, 1999)

As linhagens mitocondriais mais antigas pertencem ao macrohaplogrupo L, que caracteriza os nativos africanos. Sabe-se que existem pelo menos quatro classificações para este grande grupo: o L0, mais antigo e surgido há 200 mil anos; L1, L2 e L3, o mais recente. Este último deu origem a duas linhagens, M e N, há 65 mil anos, e apenas os descendentes destes colonizaram a Eurásia. Na Europa, há 50 mil anos, o haplogrupo N deu origem aos haplogrupos H, que compreende a maioria das linhagens europeias, junto do T, U, V, W, I, J, K. Já na Ásia, as linhagens M e N deram origem aos haplogrupos A, B, C, D, F, G, Y e Z (RICON, 2009; WALLACE, CHALKIA, 2013) (Fig. 3).

Figura 3: Mapa das migrações humanas estimadas a partir dos estudos com mtDNA e distribuição dos haplogrupos mitocondriais



Fonte: www.mitomap.org/pub/MITOMAP/MitomapFigures/WorldMigrations2013.pdf, acessado em 18/08/16

O início do povoamento do litoral de Santa Catarina se relaciona aos ciclos de descobrimentos marítimos ibéricos, no início do século XVI. Sabe-se que depois da chegada do navio “*L’Espoir*”, comandado pelo francês Binot Paulmier, em 1504, houve sucessivas embarcações de diferentes nacionalidades no território catarinense (PIAZZA, 1988).

Atualmente, sabe-se que o território catarinense apresenta três componentes étnicos e genéticos em sua população: os componentes ameríndios, europeus e africanos (TORRES, 2014).

1.2 AMERÍNDIOS

No estado de Santa Catarina três povos de ameríndios eram identificados: os *Guarani (Carijó)*, pertencentes ao tronco linguístico Tupi Guarani, os *Xokleng*, e *Kaingang*, ambos pertencentes ao tronco Macro Gê (RODRIGUES, 1986).

Os *Guarani* ocupavam o litoral e possuíam hábito sedentário, habitavam pequenas aldeias e suas atividades se baseavam em pesca, caça, coleta e agricultura. Quando os açorianos chegaram a esta região, a encontraram quase inabitada, já que este grupo havia sido morto ou levado como escravo pelos bandeirantes paulistas. Os indivíduos que

conseguiram sobreviver fugiram para o interior do estado (FLORES, 2000; SANTOS, 1974).

Os *Xokleng*, conhecidos como bugres, estavam distribuídos no planalto catarinense e eram seminômades (FLORES, 2000). Ficaram conhecidos pela sua resistência aos colonizadores. Seus territórios de caça, coleta e culto passaram a ser limitados devido ao cerco do oceano e fazendas de gado. Com isto, iniciaram o ataque a estas fazendas, e como consequência houve o surgimento dos bugreiros, pessoas pagas para caçar e matar os índios e os pacificadores (MURARO, 2003).

Os *Kaingang* habitavam florestas entre o litoral e o planalto, apresentando uma forma de vida nômade (SANTOS, 1973). Acredita-se que a interação com os colonizadores foi amistosa, visto que há informação sobre ações conjuntas aos bandeirantes para a captura dos guaranis nas Reduções Jesuíticas. Também teriam auxiliado os tropeiros que se deslocavam do Rio Grande do Sul para São Paulo, durante o século XVIII (MURARO, 2003).

Atualmente, os últimos remanescentes destas tribos estão distribuídos em poucas reservas no território catarinense: em Ibirama, Chapecó e na Serra do Tabuleiro (NAMEN, 1994; SANTOS, 1998).

1.3. EUROPEUS

A primeira fase de ocupação do litoral catarinense ocorreu através expansão vicentista em direção ao sul do Brasil, que deu origem aos núcleos de São Francisco do Sul, Nossa Senhora do Desterro e Santo Antônio dos Anjos de Laguna. Porém, a ilha de Santa Catarina já era antes conhecida por navegadores do Atlântico por servir com o abastecimento de água, alimentos e madeira, além de proporcionar um porto protegido, desde meados do século XVI (MAMIGONIAN, 2006).

Em um segundo momento o litoral passou a ser alvo de colonização e exploração, influenciado pela grande disputa entre as coroas Portuguesa e Espanhola. O litoral catarinense foi disputado por ser uma região essencial como base de apoio de operações econômicas e militares realizadas na Baía do Prata, sob o domínio da Espanha. Já Portugal, possuía fortificações na Barra da Lagoa dos Patos (RS) e na Colônia do Sacramento, no Rio da Prata. Isto justificaria o desejo da coroa Portuguesa de domínio territorial sobre esta região para o estabelecimento de uma rede complementar, que auxiliasse na expansão ao sul do Brasil (MURARO, 2003). A partir da cisão da União Ibérica, em 1640, e depois das várias tentativas de negociações diplomáticas devido a conflitos para definir limites territoriais, coroa Portuguesa

adotou a política do "*utis possidetis*" ("quem povoa domina") para povoar regiões em disputa. (PIAZZA, 1988).

Por volta de 1740, Portugal viu a necessidade de povoar as terras do Brasil, incluindo a ilha de Santa Catarina, para cultivo e construção de fortificações. Para isto, decidiram enviar famílias das ilhas de Açores e Madeira para esta região. Estas ilhas foram selecionadas devido à alta atividade vulcânica e aos intensos abalos sísmicos, além destas apresentarem uma alta densidade demográfica associada a falta de alimentos para a população (PIAZZA, 1988). Com a Provisão Régia de 31 de agosto de 1746, a coroa Portuguesa abre o alistamento para as famílias interessadas, e oferece vantagens aos residentes destas ilhas caso desejassem migrar para a América. Assim, em agosto de 1747, o primeiro assento é consolidado para o transporte de mil pessoas dos Açores para a ilha de Santa Catarina. Antes da conclusão do primeiro assento, há a chegada de 59 madeirenses, sendo estes os únicos a se fixar em território catarinense. Ao longo da efetivação de outros assentos, estima-se que a contribuição de cerca de 6 mil açorianos no litoral do sul do Brasil (PIAZZA, 1988).

O egresso inicial dos primeiros europeus não portugueses se deu início em 1828, quando o Governo Imperial ordenou ao Presidente da Província de Santa Catarina, a instalação de colonos alemães. Estes colonos eram, em sua maioria, da cidade de Bremen, e uma parcela fazia parte da Legião Alemã. Depois de aportados e alojados em Desterro, parte dos colonos foi transferida para a vila de São José, fundando a colônia de São Pedro de Alcântara (PIAZZA, 1988).

Henrique Ambauer Schutel e Carlo Demaria foram os grandes responsáveis pela primeira fase da colonização italiana no território catarinense. Juntos fundaram a empresa Demaria & Schutel, uma sociedade particular de colonização, que obteve do governo um título provisório de terras para a criação de uma colônia agroindustrial e pastoril, denominada "Nova Itália". Esta área seria ocupada por colonos italianos e nacionais, que fossem, de preferência, agricultores (PIAZZA, 1988).

Mais tarde, em 1881, houve a vinda de poloneses que poderiam contribuir para a indústria têxtil, já que possuíam experiência em construção de teares de madeira, produzidos para a confecção de tecidos. Quinze anos depois, chegariam imigrantes franceses e outros italianos, onde estes estavam inseridos também no setor têxtil, além de profissionais calçadistas, ferreiros e carpinteiros (MURARO, 2003).

1.4. AFRICANOS

O aparecimento do componente africano no Brasil ocorreu durante o período da prática escravagista, iniciada em 1538 (SALZANO, FREIRA-MAIA, 1970). No território catarinense a introdução desta população se deu a partir da primeira fase de ocupação da região pelos portugueses, entre os séculos XVII e XVIII (MAMIGONIAN, 2006).

A criação de armações baleeiras foi um fator importante para a ocupação do litoral catarinense e influenciou a compra de escravos africanos durante a segunda metade do século XVIII. Em questão de produtividade, as armações eram comparadas aos engenhos, e necessitavam de um grande aporte de mão de obra para funções específicas (MAMIGONIAN, 2006). Foi a partir de 1742 que o litoral catarinense foi incorporado como uma área de exploração baleeira, e entre os anos de 1746 e 1798 seis armações foram construídas. Todas eram administradas por contratadores de Lisboa, conjuntamente com o Rio de Janeiro, este com a função de fornecer os materiais e mão de obra necessários para a funcionalidade destas construções. A primeira baleeira foi fundada em 1746 e denominada Armação da Piedade, que apresentava 107 escravos africanos em 1750 (SILVA, 1992).

Durante as últimas décadas do século XVIII, a Coroa Portuguesa iniciou um processo de investimento para o desenvolvimento de atividades econômicas estratégicas no litoral de Santa Catarina, e como consequência, houve a integração desta área aos circuitos Atlânticos. Isto se deu devido ao constante crescimento populacional da cidade do Rio de Janeiro e de áreas do sudeste do Brasil. Com isto, supõe-se que mercadorias catarinenses abasteceriam navios negreiros aportados, ou elas seriam trocadas por escravos em Angola (MAMIGONIAN, 2006).

Em 7 de novembro de 1831, firmou-se um acordo entre a Inglaterra e o Império do Brasil, que proibia a entrada de novos africanos cativos nos portos brasileiros (CARVALHO, 2012). Com isto, houve um aumento no valor de escravos, e consequentemente, a compra de novos cativos africanos diminuiu. Apesar disto, a população de africanos escravizados de vilas e freguesias de Santa Catarina cresceu lentamente entre os anos de 1830 e 1850, com seguida diminuição, por venda e alforria, entre 1850 e 1860 (MAMIGONIAN, 2006).

Estudos envolvendo ancestralidade mitocondrial para o estado de Santa Catarina são escassos (PALENCIA, 2010; TORRES, 2014; LIMA, 2015), e relacionados às regiões HVS-2 e HVS-3, são ainda menos numerosos (PALENCIA, 2010). Nenhum destes trabalhos

analisou a região controle para questões de ancestralidade materna para a região da grande Florianópolis.

Além de observar o perfil dos indivíduos desta região para os segmentos HVS-2 e HVS-3, o presente estudo se faz importante devido a investigação de todas as regiões, e a partir disto verificar a relevância da análise das mutações dos três segmentos juntos para a determinação de haplogrupos de ancestralidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a relevância da informação associada à análise dos três segmentos (HVS-1, HVS-2 e HVS-3) da região hipervariável do DNA mitocondrial na determinação de haplogrupos de ancestralidade em uma amostragem populacional da grande Florianópolis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e sequenciar os segmentos HVS-2 e HVS-3 do mtDNA de indivíduos nascidos na grande Florianópolis;
- Comparar as sequências geradas com a sequência referência (rCRS) visando identificar haplogrupos de acordo com os polimorfismos encontrados nos segmentos e determinar sua proporção;
- Comparar os haplogrupos determinados a partir da análise do segmento HVS-1, com os encontrados a partir dos segmentos HVS-2 e HVS-3 isolados e associados;
- Determinar o haplogrupo mitocondrial final a partir da análise das três regiões hipervariáveis (HVS-1, HVS-2 e HVS-3), para estimar a proporção de ancestralidade mitocondrial definitiva da amostra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte de um projeto amplo, intitulado “Estrutura Genética e Origem da População de Santa Catarina”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), no parecer nº 1077/11.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas 57 amostras de sangue coletadas anteriormente pela equipe do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) no Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC) e em Hemocentros do estado. O DNA foi extraído a partir dos leucócitos sanguíneos, utilizando o método *Salting Out*, descrito por Miller e colaboradores (1988).

As amostras representam indivíduos nascidos em Santa Catarina, não aparentados entre si, que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, assentindo o uso de seu material biológico. Foram selecionadas pessoas considerando o seu município de nascimento, buscando aquelas nascidas na região da Grande Florianópolis, como representando na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição do número de amostras em relação ao local de nascimento dos indivíduos.

Local de Nascimento	Número de Amostras
Florianópolis	31
Antônio Carlos	2
São José	9
Palhoça	2
Biguaçu	6
Águas Mornas	1
São Pedro de Alcântara	2
Santo Amaro da Imperatriz	4
Total	57

Fonte: Banco de dados LAPOGE

Destas 57 amostras, 41 foram anteriormente utilizadas por Lima,

2015 que realizou o sequenciamento do primeiro segmento da região hipervariável do mtDNA (HVS-1), permitindo assim a complementaridade dos segmentos analisados no presente estudo (HVS-2 e HVS-3).

3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para a amplificação do segmento de 884 pb, utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR). Em cada microtubo de 0,2mL foram adicionados: 0,15µL de dNTP, 1,5 µL tampão, 0,3 µL de MgCl₂, 0,1µL de *TaqPlatinum*, 0,3µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 8,35 µL de água Milli-Q, para cada 4,0 µL de DNA uso (20ng/µL), totalizando um volume de 15 µL por tubo. Utilizou-se controle negativo com o mesmo volume de DNA, substituindo-o por água Milli-Q, para que a possibilidade de contaminação de amostras fosse descartada. As sequências de *primers* utilizadas foram complementares a dois sítios de ligação em HVII e HVIII, a L16413, na posição *forward*, e a H727 na posição *reverse* (FRIDMAN *et. al.*, 2014) (Tabela 1).

A reação foi efetivada no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/10min; 30 ciclos de: desnaturação a 95°C/15s, anelamento a 57°C/30s; extensão a 72°C/90s, extensão final a 72°C/10min e 4°C infinito (DAUD *et al.*, 2014).

Tabela 2. Sequência do *primer* utilizado para a amplificação das regiões HVS-2 e HVS-3.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>
L16413	5'-TGAAATCAATATCCCGCACA-3'
H727	5'-AGGGTGAACCTCACTGGAACG-3'

Fonte: FRIDMAN *et al.*, 2014

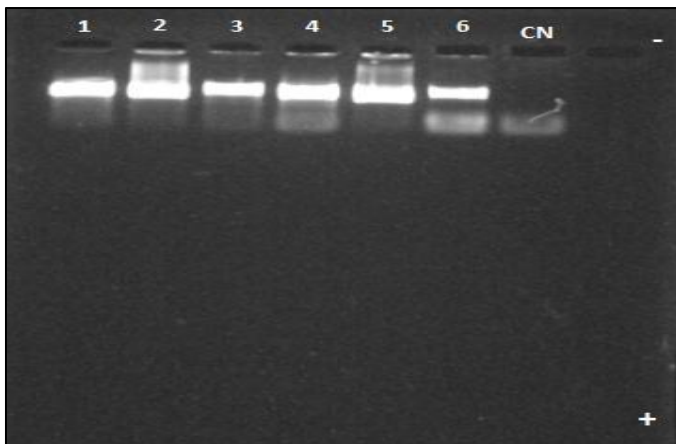
Reagentes e Soluções:

1. Água ultrapura;
2. 0,2 mM de cada dNTP (100 mM, Invitrogen®);
3. 2,5 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen®);
4. 1X Tampão de PCR (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl; Invitrogen®);
5. 0,2 pmol Primer Reverse (Exxtended®);
6. 0,2 pmol Primer Forward (Exxtended®);
7. 0,1 U Taq DNA Polymerase Platinum (0,5 U/ μL/ Invitrogen®).

3.4. ELETROFORESE

A certificação da amplificação foi realizada a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose 1%, visualizando as bandas formadas. Foi aquecido em forno microondas a mistura de agarose e tampão TBE 0,5X, para a formação do gel. Colocou-se a solução no suporte de gel, e fixada a peça para a formação dos poços. Em cada poço utilizou-se 2 μL de produto de PCR de cada amostra, 0,3μL de corante GelRed e 0,3μL de solução carreadora. Durante 15 minutos as amostras foram submetidas a uma tensão de 100 V, e migraram para o polo positivo da cuba de eletroforese. O gel foi exposto a luz UV com o auxílio Fotodocumentador.

Figura 4. Gel de Agarose com seis amostras (1-6) e um controle negativo (CN). As bandas que emitiam luz foram consideradas com uma boa amplificação e seguiram para a próxima etapa.



Fonte: desenvolvido pela autora.

Reagentes e Soluções:

1. Agarose;
2. Tampão TBE 10X (Tris base 0,89 M, Amresco®; Ácido Bórico 0,89 M, Vetec®; EDTA 0,2 M, Vetec®);
3. Tampão TBE 0,5X (50 mL de tampão TBE 10X; 95 mL de água destilada)
4. Solução GedRed®;
5. Solução Carreadora;

3.5. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Na reação de sequenciamento, nucleotídeos fluorescentes foram incorporados nas sequências de DNA. Esta reação foi feita em placa de sequenciamento de 96 poços. Adicionou-se 2 μ L de produto de PCR, 1 μ L de *primer reverse* (R) ou *foward* (F), 1,5 μ L de tampão Big Dye, 1 μ L do corante Big Dye Terminator® e 10 μ L de água miliQ.

Reagentes e Soluções:

1. 5 pmol *Primer R e F*;
2. Tampão BigDye® Terminator Sequencing Buffer 2,5X (200 mM Tris-HCl, pH 9; 5,0 mM MgCl₂, Applied Biosystems®);
3. Corante BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems®);
4. Água MiliQ

3.6. PRECIPITAÇÃO DO DNA

Com esta etapa retirou-se o excesso de nucleotídeos fluorescentes não incorporados ao fragmento de DNA. Em cada poço foi adicionado 2,5 µL de solução EDTA e o material foi submetido a agitação e centrifugação. Em seguida, houve a adição de 25 µL de etanol absoluto a cada poço, selou-se a placa e o material foi homogeneizado quatro vezes por inversão manual. A placa então foi submetida a centrifugação, por 45 minutos a 4000 rpm (20°C) (*Eppendorf Centrifuge 5804*®).

Descartou-se o sobrenadante, e o excesso foi escorrido em papel absorvente. Em cada reação foi adicionado 150µL de etanol 70% em temperatura ambiente. Após isto, a placa submetida a uma centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos (20°C) (*Eppendorf Centrifuge 5804*®). Por fim colocou-se a placa invertida sobre papel absorvente na centrífuga, e foi dado um spin, não ultrapassando 1000 rpm. A placa ficou exposta *overnight* a temperatura ambiente, e após ficar seca, foi selada e encaminhada para a análise em sequenciador (ABI3130, Applied Biosystems®).

Reagentes e Soluções:

1. Solução de EDTA (125 mM, Sigma-Aldrich®, pH 8,0);
2. Etanol Absoluto (Merck®);
3. Etanol 70% (Merck®)

3.7. ANÁLISES *IN SILICO*

Após o sequenciamento, os dois eletroferogramas (*foward e reverse*) gerados para cada amostra foram verificados manualmente com o auxílio do *software Chromas* (TECHNELYSIUM, 2015), a partir do qual foram gerados arquivos em formato [.fasta].

Estes arquivos fasta foram alinhados em duas etapas: na primeira, os dois arquivos de uma mesma amostra foram alinhados junto com o segmento compreendendo as regiões HVS2 e HVS3 da rCRS (GeneBank: NC_012920.1; posição 1-680) e editadas com o auxílio do *software BioEdit 7.2.5* (HALL, 1999). Apenas mutações observadas nas duas fitas e confirmadas no *mtDNA tree Build 16* (VAN OVEN; KAYSER, 2009) foram consideradas existentes, descartando assim artefatos conhecidos como “mutações fantasma” provenientes de erros de sequenciamento que só podem ser verificados na edição de duas fitas complementares da mesma sequência. Cada amostra gerou então uma sequência “assemble” onde apenas as mutações reais foram mantidas

Na segunda etapa, todas as sequências assemble foram alinhadas a rCRS, e assim, classificadas e organizadas de acordo com a semelhança de mutações e posteriormente classificadas em haplogrupos de acordo com as suas mutações a partir do *Mitomaster* (MITOWEB, 2009). As regiões foram analisadas separadamente e em conjunto.

Após isto, analisou-se 41 amostras considerando as três regiões hipervariáveis, utilizando a mesma metodologia, para a definição dos haplogrupos mitocondriais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta a distribuição de haplogrupos encontrados a partir da análise de duas regiões do mtDNA (HVS-2 e HVS-3).

Para a região HVS-2, os indivíduos foram classificados em haplogrupos mitocondriais europeus (84%) e ameríndios/asiáticos (16%) (Figura 5). Das 57 sequências, 30 linhagens diferentes foram encontradas e distribuídas em 9 grandes haplogrupos, onde apenas 3 indivíduos não apresentaram mutações, sendo estes idênticos à rCRS (Tabela 3). Dos 9 haplogrupos, 6 são característicos de populações europeias (H, V, K, T, U, N), 3 de populações ameríndias/asiáticas (B, G, R).

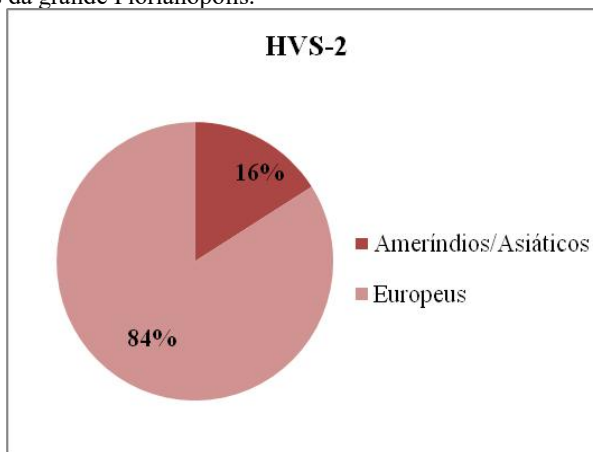
Tabela 3 Classificação em haplogrupos dos 57 indivíduos sequenciados para as regiões HVS-2 e HVS-3.

Amostra	HVS-2	HVS-3	HVS2+HVS3
GDF031	T2a	H	T2a
GDF082	H3a	H	H3a
GDF065	H	I5a	I5a
GDF083	H	H2a	H2a
GDF016	H2a	I5a	H2a
GDF026	H2a	H	H2a
GDF022	H6	H	H6
GDF028	H2a	H	H2a
GDF013	H3s	H2a	H3s
GDF034	T1a	H2a	T2b
GDF037	H2a	H2a	H1a
GDF084	U5a	H10d	K1c
GDF085	H2a	H2a	H
GDF029	H2a	H2a	H2a
GDF086	H1b	L2a	H1b
GDF042	T2c	B4d	B4a
GDF008	R31a	H2a	H1a
GDF054	U5a	H1n	U5a
GDF063	H13a	H2a	HV14
GDF009	H2a	F1a	H1b
GDF072	H1b	H	H1b
GDF087	K1c	L0d	T2g
GDF088	H13a	M29	H10a

GDF089	U7a	H2a	T2g
GDF090	H91	H2a	H91
GDF078	H7i	H2a	H7i
GDF091	B2b	H2a	B2b
GDF038	B4a	B2i	H2a
GDF032	H	H	H
GDF092	H2a	H2a	H2a
GDF012	R8a	L4b	V
GDF066	N1a	H2a	T1a
GDF093	H1a	H2a	H1a
GDF094	B2b	H	H2a
GDF071	H2a	M29	U8a
GDF003	H1z	H2a	H1z
GDF064	H3a	T2g	H3a
GDF039	H13a	H2a	HV14
GDF002	H1b	H2a	H1b
GDF076	R22	M27a	V
GDF095	U2a	H2a	H1a
GDF052	H7i	H2a	H7i
GDF005	H3a	H2a	U1a
GDF079	V	H2a	H5a
GDF020	V	H1c	H1c
GDF035	T2g	H2a	B4a
GDF096	V	H2a	H1n
GDF097	H2a	H2a	H2a
GDF005	H2a	H	H2a
GDF070	V	H2a	H1n
GDF060	N2	H	N2
GDF046	B4a	H	B4a
GDF051	H1a	G2b	M
GDF074	B4a	H	B4a
GDF067	G2b	H	G2b
GDF081	HV0f	H	HV0f
GDF043	T2b	H	T2b

Fonte: desenvolvido pela autora.

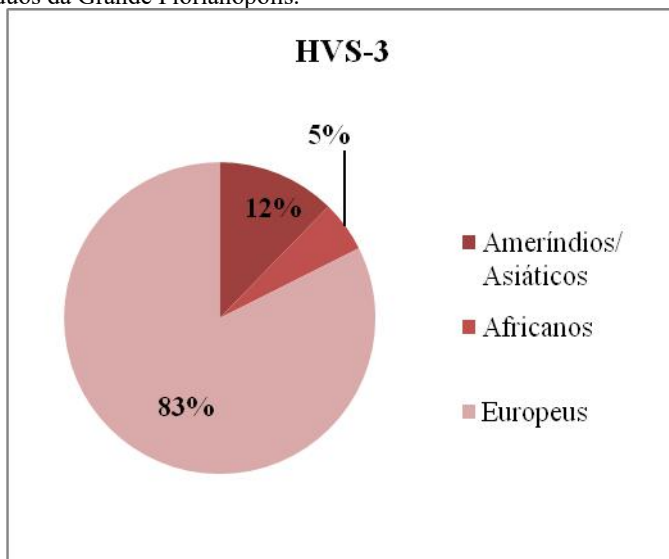
Figura 5. Proporção de haplogrupos encontrados para a região HVS-2 em 57 indivíduos da grande Florianópolis.



Fonte: desenvolvido pela autora

Para a região HVS-3, observou-se haplogrupos europeus (83%), ameríndios/asiáticos (12%), e africanos (5%) (Fig.6). Das 57 sequências, 18 linhagens foram encontradas e estão inseridas em 8 grandes haplogrupos (Tab.3). Destes, 3 são característicos de populações europeias (H, I, T), 1 de populações africanas (L), e 4 de populações ameríndias/asiáticas (B , F, G, M). Além disto, não foi observada qualquer mutação em 15 indivíduos, sendo estes idênticos à rCRS (referência europeia).

Figura 6. Proporção de haplogrupos encontrados para a região HVSIII em 57 indivíduos da Grande Florianópolis.



Fonte: desenvolvido pela autora.

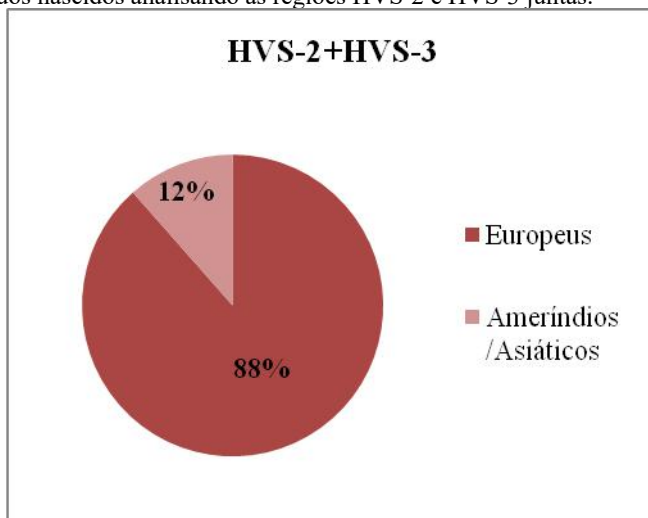
Quando analisadas separadamente, tanto na região HVSII, quanto na HVSIII, a proporção de haplogrupos mitocondriais encontrada nos indivíduos referente a populações europeias foi maior, 82% e 83%, respectivamente. Isto já era esperado devido ao fato de que o estado de Santa Catarina, e, por consequência, a grande Florianópolis, sofreram um intenso fluxo migratório proveniente da Europa, principalmente Portugal (PIAZZA, 1988).

Em ambas as regiões o grande haplogrupo H e suas subdivisões foram os mais recorrentes entre os indivíduos amostrados, e todos já foram observados em frequências consideráveis na maioria dos europeus ou descendentes de europeus (TORRONI *et al.*, 1998; ACHILI, *et al.*, 2004). Apesar de apresentarem uma menor ocorrência os haplogrupos I, T, U, K, N, V, X também foram encontrados na população da grande Florianópolis, e todos são observados em populações europeias (REIDLA *et al.*, 2003; OLIVIERI *et al.*, 2006). Apenas na região HVSIII foi observada mutações referentes a haplogrupos africanos, como o L0, já encontrado em catarinenses (TORRES, 2014; LIMA, 2015), L4, L5 (OLIVIERI, 2006). Este resultado também é esperado para a população da grande Florianópolis, pelo o seu passado com

tráfico de africanos escravizados (PIAZZA, 1988). Com relação aos haplogrupos ameríndios identificados, apenas o grande haplogrupo B foi observado. Nos indivíduos amostrados neste estudo, apenas 2 apresentaram a classificação B2, para HVSII, e 1 para HVSIII. Este haplogrupo é encontrado tipicamente em populações nativo-americanas (BANDELT et al., 2003; ACHILLI, 2008), confirmando a presença do componente ameríndio na população da grande Florianópolis. Diferente do haplogrupo B2, o B4, que foi observado nos dois segmentos, é encontrado frequentemente em populações asiáticas, e também não é intimamente relacionado ao primeiro filogeneticamente (STARIKOVSKAYA et al., 2005). Observou-se ainda a presença dos haplogrupos R e suas subdivisões apenas na HVSII, G em ambas, e F e M, apenas na HVSIII, todas presentes em populações asiáticas (STARIKOVSKAYA et al., 2005).

A partir da análise em conjunto das regiões HVSII e HVSIII observou-se haplogrupos característicos de populações europeias (88%) e populações ameríndias/asiáticas (12%) (Figura 7). Das 57 sequências, 36 linhagens foram encontradas, incluídas em 10 grandes haplogrupos, sendo 7 característicos de populações europeias (H, I, J, K, U, T, V) e 3 característicos de populações ameríndias/asiáticas (M, B, G). Apenas um indivíduo foi considerado idêntico a rCRS (Tabela 4). Com esta investigação considerando os dois segmentos como um único, foi observado que a alta proporção de haplogrupos típicos de populações europeias, confirmando mais uma vez os dados históricos. Notou-se, também, que houve um acréscimo na diversidade de haplogrupos encontrados (Tabela 4). Enquanto que nos segmentos HVSII e HVSIII separados, foram obtidas 30 e 17 linhagens diferentes respectivamente, o único segmento analisado apresentou 36 linhagens distintas. Isto pode ser um bom indicativo de uma maior precisão na classificação de haplogrupos em uma população.

Figura 7. Proporção encontrada de haplogrupos mitocondriais s em 57 indivíduos nascidos analisando as regiões HVS-2 e HVS-3 juntas.



Fonte: desenvolvido pela autora.

Tabela 4. Diversidade observada de haplogrupos ameríndios, africanos e europeus a partir da análise das regiões HVS-2 e HVS-3.

Haplogrupos	HVS-2	HVS-3	HVS-2+HVS-3
Ameríndios	3	6	3
Africanos	0	3	0
Europeus	27	8	33
Total	30	17	36

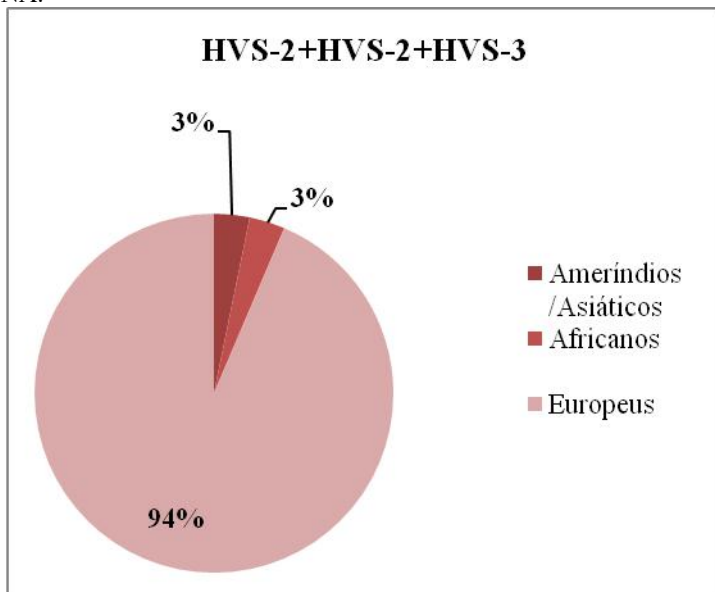
Fonte: desenvolvido pela autora.

Ao analisar 41 indivíduos considerando as mutações de todos os sítios polimórficos da região controladora (HVI+HVSII+HVSIII), foram obtidos haplogrupos europeus (94%), ameríndios/asiáticos (3%) e africanos (3%) (Fig. 8). De todas as sequências geradas, 31 linhagens diferentes foram encontradas, onde apenas 1 indivíduo não apresentou alguma mutação em sua sequência, o que o torna idêntico à rCRS (Tab.8). Um total de 10 grandes haplogrupos foi observado, em que 8

são característicos de populações europeias (H, I, J, K, N, T, U, V), 1 de populações ameríndias (C), e 1 característico de populações africanas (L).

Apesar do haplogrupo C7 pertencer ao clado C, típico de populações nativo-americanas, esta variante está presente em populações da Ásia oriental (DERENKO, 2010). A região controladora como um todo, apresentou um padrão de ancestralidade esperado para a grande Florianópolis, com uma ocorrência maior de haplogrupos europeus, mas ainda presentes, componentes africanos e asiáticos.

Figura 8. Proporção encontrada de haplogrupos em 41 indivíduos nascidos na grande Florianópolis através da análise das três regiões hipervariáveis do mtDNA.



Fonte: LIMA, 2015; desenvolvido pela autora.

Como apresentado na tabela 7, a diversidade de haplogrupos encontrada através da análise conjunta destas regiões foi muito superior quando comparada com a das três regiões separadas, como também com a HVSII e HVSIII juntas.

Tabela 5. Diversidade encontrada de haplogrupos ameríndios, africanos e europeus a partir da análise dos três segmentos hipervariáveis em 41 indivíduos nascidos na região da grande Florianópolis.

Segmento HVS	AMR/ AST	AFR	EUR	Total
1	1	7	12	20
2	3	0	23	25
3	5	1	7	13
2 + 3	3	0	25	28
1 + 2 + 3	1	1	29	31

Fonte: LIMA, 2015; desenvolvido pela autora.

Além disto, a grande maioria dos haplogrupos encontrados para a região HVS-1 (LIMA, 2015) obteve uma classificação mais refinada com a análise de HVS-1+HVS-2+HVS-3 (Tab.8). Em alguns indivíduos, o grande haplogrupo foi alterado para um característico de uma população diferente da classificada anteriormente. Como no caso da amostra GDF065, em que foi atribuído um haplogrupo típico de populações africanas (L1e0) apenas com a investigação do segmento HVS-1, e sua classificação final um haplogrupo frequente em populações europeias (I5a).

Apesar da taxa de mutação da HVS-1 ser superior às demais (MEYER *et al.*, 1999), a análise dos três sítios polimórficos da região controladora se mostra importante para a correta classificação de haplogrupos mitocondriais. Devido a isto, o seu estudo garante um aumento do poder discriminatório entre amostras e uma alta confiabilidade na determinação dos haplogrupos a que realmente pertencem.

Tabela 6 Classificação em haplogrupos de 41 indivíduos da grande Florianópolis a partir da análise das três regiões hipervariáveis (indef – não foi possível definir o haplogrupo).

Amostra	HVS-1	HVS-2	HVS-3	HVS-2+ HVS-3	HVS-1+ HVS-2+HVS-3
GDF031	J	T2a	H	T2a	J2a
GDF065	L1e	H	I5a	I5a	I5a
GDF016	H	H2a	I5a	H2a	H1m

GDF026	H7c1	H2a	H2a	H2a	H7c
GDF022	H	H6	H	H6	H6
GDF028	H82	H2a	H	H2a	H2a
GDF013	H	H3s	H2a	H3s	H3s
GDF034	K	T1a	H2a	T2b	K
GDF037	K	H2a	H2a	H1a	H1a
GDF029	HV0	H2a	H	H2a	V
GDF042	T	T2c	B4d	B4a	T
GDF008	H	R31a	H2a	H1a	H5
GDF054	C	U5a	H1n	U5a	L3h
GDF063	L0a	H13a	H2a	HV14	HV14
GDF009	H	H2a	F1a	H1b	H1a
GDF079	indef	V	H2a	H5a	H10d
GDF072	L3d	H1b	H	H1b	H1a
GDF020	H	V	H1c	H1c	H1c
GDF081	indef	HV0f	H	HV0f	H7
GDF067	L1	G2b	H	G2b	U2e
GDF046	U5a1a	B4a	H	B4a	U5a
GDF051	C	H1a	G2b	M	C7
GDF074	indef	B4a	H	B4a	H1e
GDF043	T2b	H	H	T2b	T2b
GDF060	H	N2	H	T1a	N1a
GDF070	L1c1b	V	H2a	H1n	H2a
GDF048	U5	H2a	H	U1	U5a
GDF035	K	T2g	H2a	B4a	K1b
GDF005	H	H3a	H2a	U1a	H1n
GDF052	C	H7i	H2a	H7i	V
GDF076	indef	R22	M27a	V	H2a
GDF002	H	H1b	H2a	H1b	H1a
GDF039	T1	H13a	H2a	HV14	H42a
GDF064	L0a2	H3a	T2g	H3a	H3a
GDF003	H	H1z	H2a	H1z	H10d

GDF071	L3	H2a	M29	U8a	HV6
GDF012	H	R8a	L4b	V	H2a
GDF066	L1e	N1a	H2a	T1a	N1a
GDF032	H	H	H	H	H
GDF038	T1a	B4a	B2i	U2e	T
GDF078	indef	H7i	H2a	H7i	H7i

Fonte: LIMA, 2015; da autora.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As regiões HVS-2 e HVS-3 separadamente e em conjunto apresentaram um padrão de ancestralidade esperado, com uma maioria de haplogrupos típicos de populações europeias, devido ao movimento de colonizador e migratório.

Quando analisadas em conjunto (HVS-2+HVS-3), houve um aumento de diversidade dos haplogrupos mitocondriais, indicando que a adição de uma região na análise aprimora a determinação destes.

Por fim, a investigação de todos os sítios polimórficos da região controle (HVS-1+HVS-2+HVS-3), que apresentou o maior número de haplogrupos distintos, quando comparado às três regiões separadas, permite um maior aumento no poder discriminatório. Isto indica que a análise total deste segmento mitocondrial se faz mais eficiente para estudos evolutivos e forenses.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, R. M.; KUBACKA, I.; CHINNERY, P. F. *et al.* **Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.** *Nature Genetics*, 1999.
- ACHILI, A., RENGO, C., MAGRI, C. *et al.* **The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was major source for the European gene pool.** *The American Journal of Human Genetics*, 2004.
- ACHILLI, A.; PEREGO, U. A.; BRAVI, C. M. *et al.* **The phylogeny of the Four Pan-American mtDNA Haplogroups: Implications for evolutionary and disease studies.** *Plos One*, 2008.
- BANDELT, H. J.; HERRNSTADT, C.; YAO, Y. G. *et al.* **Identification of native american founder mtDNAs through the Analysis of Complete mtDNA Sequences: Some Caveats.** *Annals of Human Genetics*, 2003.
- BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A. *et al.* **Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution.** *Journal of Molecular Evolution*, 1982.
- BUDOWLE, B.; ALLARD, M.; WILSON, M. R. **Forensic and mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations.** *Annual Review Genomics and Human Genetics*, 2003.
- BULTER, J.M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.** Waltham: Elsevier Inc, 2012.
- CARVALHO, J.D.C.L. **O Tráfico de escravos, a pressão inglesa e a lei de 1831.** *Revista de História Econômica & Economia Regional Aplicada*, Rio de Janeiro, 2012.
- DAUD, S.; SHAHZAD, S; SHAFIQUE, M. *et al.* **Optimization and Validation of PCR protocol for three Hypervariable Regions (HVI, HVII and HVIII) in Human Mitochondrial DNA.** *Advancements in Life Sciences*, 2014.

DERENKO, M.; MALYARCHUK, B.; GRZYBOWSKI, T. *et al.* **Origin and Post-Glacial Dispersal of Mitochondrial DNA Haplogroups C and D in the Northern Asia.** Plos One, 2010.

FLORES, M. B. R. **Povoadores da fronteira: os casais açorianos rumo ao sul do Brasil.** Florianópolis: UFSC, 2000.

FRIDMAN, C.; GONZALES, R. S.; PEREIRA, A. C. **Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil.** International Journal of Legal Medicine, 2014.

HALL, T. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symposium, 1999.

LEE, H. R.; JOHNSON, K. **Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase.** Journal of Biological Chemistry, 2006.

LIMA, A. **Ascendência Genética Matrinilear da Grande Florianópolis.** UFSC, Florianópolis, 2015.

LUTZ, S.; WITTIG, H.; WEISSER, H. J. *et al.* **Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions?** Forensic Science International, 2000.

MAMIGONIAN, B. G.. **Africanos em Santa Catarina: Escravidão e Identidade Étnica (1750-1850).** UFRJ, Rio de Janeiro 2006.

MEYER, S.; WEISS, G.; VON HAESSELER, A. **Pattern of nucleotide substitution and rare heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA.** Genetics, 1999.

MILLER, S.A.; DYKER, D.D.; POLESKY, H.F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acids Research, 1998.

MITOWEB. **Mitomaster,** 2009. Disponível em <<http://www.mitomap.org/>>

MURARO, V. F. **História de Santa Catarina: para ler e contar.** Florianópolis: Cuca Fresca, 2003.

NAMEN, A. M. **Botocudo: Uma história de contato.** Florianópolis. UFSC/FURB, 1994

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

OLIVIERI, A.; ACHILLI, A.; PALA, M. *et al.* **The mtDNA legacy of the Levantine Early Upper Palaeolithic in Africa.** Science, 2006.

PALENCIA, L.; VALVERDE, L.; ÁLVAREZ, A. *et al.* **Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input.** International Journal of Legal Medicine, 2010.

PANETO, G. G. **Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro.** UNESP, Araraquara, 2006.

PIAZZA, W. F. **A colonização Italiana em Santa Catarina.** Florianópolis: Governo do Estado de Santa Catarina, 1976.

PIAZZA, W. F. **A colonização de Santa Catarina.** Porto Alegre: Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul, 1988.

REIDLA, M.; KIVISILD, T.; METSPALU, E. *et al* **Origin and diffusion of mtDNA Haplogroup X.** American Journal Human Genetics, 2003.

RICON, D. **Estudos de DNA Mitocondrial em Populações Remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira - São Paulo.** USP, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, A. D. **Línguas Brasileiras: para o conhecimento das línguas indígenas.** São Paulo: Loyola, 1986.

SALZANO, F. M.; FREIRE-MAIA, N. **Problems in human biology: a study of Brazilian population.** Wayne State University Press, Detroit, 1970.

SANTOS, S. C. **Índios e brancos no sul do Brasil: a dramática experiência dos Xokleng,** Edeme, 1973.

SANTOS, S. C. **Nova história de Santa Catarina.** Florianópolis, Edição do Autor, 1974.

SANTOS, S. C. **Nova história de Santa Catarina.** Florianópolis, Terceiro Milênio, 1998.

SANCHES, N. M. **Análises de Polimorfismos da Região Controle do DNA Mitocondrial em Indivíduos Nascidos e Residentes do Estado do Espírito Santo para Utilização na Identificação Humana.**UNESP, Araraquara, 2013.

SILVA, C. M. **Ganchos, SC: ascensão e decadência da pequena produção mercantilpequira.** Florianópolis, Ed. da UFSC, 1992.

STARIKOVSKAYA, E.; SUKERNIK, R. I.; DERBENEVA, O. A. *et al.* **Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the southern extent of Siberia, and the origins of native american haplogroups.** Annals of Human Genetics, 2005.

STONEKING, M.; JORDE, L. B.; BHATIA, K. *et al.* **Geographic variation in human mitochondrial DNA from Papua New Guinea.** Genetics. 1990.

TECHNELYSIUM. **Chromas lite,** 2015. Disponível em <<http://technelysium.com.au>>

TORRONI, A., BANDELT, H. J., D'URBANO, L. *et al.* **mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe.** The American Journal Of Human Genetics. 1998.

TORRES, S.R. R. **Avaliação da Estrutura Genética da População de Santa Catarina com Diferentes Marcadores Moleculares para**

Aplicação na Genética Forense. UFSC, Florianópolis, 2014.

VAN OVEN M., KAYSER, M.. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. Human Mutation, 2009

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

WALLACE, D.C., CHALKIA, D. Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease, Cold Spring Harbor Laboratory. Press, 2013.