

Ewerton Pazini Sebem

**PADRONIZAÇÃO EM *MULTIPLEX* COM MARCADORES
MOLECULARES DE CROMOSSOMO Y PARA ESTUDOS DE
ANCESTRALIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
cumprimento da disciplina TCC II
(BIO7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina.

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

Coorientadora: M.^a Alice Heidrich Prompt.

Florianópolis
2017

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

Pazini Sebem, Ewerton
PADRONIZAÇÃO EM MULTIPLEX COM MARCADORES
MOLECULARES DE CROMOSSOMO Y PARA ESTUDOS DE
ANCESTRALIDADE / Ewerton Pazini Sebem ;
orientador, Andrea Rita Marrero, coorientador,
Alice Heidrich Prompt, 2017.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Cromossomo Y. 3.
Ancestralidade. 4. SNPs. 5. Haplogrupos. I. Rita
Marrero, Andrea . II. Heidrich Prompt, Alice . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

Ewerton Pazini Sebem

**PADRONIZAÇÃO EM *MULTIPLEX* COM MARCADORES
MOLECULARES DE CROMOSSOMO Y PARA ESTUDOS 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, 05 de julho de 2017

Prof. Dr. Carlos Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Mestre Leili D. Hausmann
Universidade Federal de Santa Catarina

Mestre Emily Bruna Justino
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª Dr^ª Iliada Rainha de Souza
(suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Mestre Alice Heidrich Prompt
(Coorientadora)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Andrea Rita Marrero
(Orientadora)
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Pelo apoio e ajuda de todo o grupo do LAPOGE, fico imensamente grato a todos os participantes deste, destacando: a Professora Doutora Andrea Rita Marrero, pela orientação nesse trabalho, disponibilidade e auxílio durante a pesquisa, elaboração e dissertação deste; a doutoranda Alice Heidrich Prompt, pela coorientação deste trabalho, disponibilidade e esclarecimentos em laboratório durante os experimentos e dissertação deste; a Professora Doutora Yara Costa Netto Muniz, pelo o apoio e conselhos durante todos os experimentos, análises de resultados e discussões de cada etapa efetuada; a doutoranda Emily Bruna Justino, pelo auxílio e esclarecimentos durante os experimentos; a aluna de iniciação científica Mairian Mirian de Barcelos, pela participação e ajuda em grande parte dos experimentos.

Pela compreensão dos meus próximos, fico grato a todos, destacando meus amigos: Leonardo Guzi, Elena de Almeida Afonso e Cássia Corso Silva pelas escapadas aos bares mais próximos (e baratos); Luan Aires por me indicar um site muito bom para conversão de unidades e todos meus familiares que não me perguntam como vai a faculdade ou quando vou me formar.

“Quando se aproximaram, eles viram que a casa era feita de pão, e o telhado foi feito de bolo e as janelas de espumante açúcar”.

(“João e Maria”, pg.59. Irmãos Grimm)

RESUMO

Os marcadores de cromossomo Y são amplamente utilizados em diferentes áreas da genética. Esse cromossomo é adequado para estudos de ancestralidade patrilineal. Por ser um cromossomo que 95% de sua composição não sofre recombinação, uma das poucas maneiras de registrar variações é por meio de mutações alélicas de um único par de bases (SNPs). A taxa de mutação dos SNPs é muito baixa, podendo assim ser utilizados como bons marcadores de ancestralidade. Estudos de ancestralidade com SNPs do cromossomo Y (Y-SNPs) colaboram para a construção da filogenia do cromossomo e padrões de migração humana. Graças aos numerosos estudos na área de Genética Antropológica, é possível saber os padrões genéticos das populações e “rastrear” a rota evolutiva que o ser humano percorreu. Para saber de onde viemos esses padrões foram separados em Haplogrupos. Um haplogrupo é uma população genética de pessoas que compartilham um antepassado comum patrilinear ou matrilinear, esses grupos recebem letras do alfabeto para identificação, e os refinamentos consistem em combinações de números e letras adicionais. Com esses estudos, junto aos estudos de colonização e migração, se espera que haja frequência de haplogrupos específicos. Por meio da pesquisa realizada nesse trabalho procurou-se padronizar multiplex com marcadores Y-SNPs dos haplogrupos R1, Q, R, F, J2 e K, relevantes para população do Estado de Santa Catarina. Para atingir tais objetivos se utilizou das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, focando principalmente na padronização da técnica de PCR para os *primers* aqui utilizados, resultando em um grande número de protocolos testados, cada qual com seu intuito de uso e direcionamento técnico. A padronização de marcador *multiplex* desses grupos específicos é um trabalho básico de extrema relevância para futuros estudos que visem uma melhor compreensão de quem somos, de onde viemos e onde estamos na árvore filogenética.

Palavras-chave: Cromossomo Y. Ancestralidade. SNPs. Haplogrupos. Árvore filogenética.

ABSTRACT

The Y chromosome markers are widely used in different areas of genetics. This chromosome is specific for studies of patrilineal ancestry. Because it is a chromosome that 95% of its composition does not undergo recombination, one of the few ways of it to suffer variations is through biallelic mutations of a single nucleotide polymorphism (SNPs). The SNPs mutation rate is really small, so they can be used as good markers for ancestry. Ancestry studies with SNPs for chromosome Y (Y-SNPs) collaborate for the construction of the phylogeny of the chromosome and human migration patterns. Thanks to the numerous studies in the anthropological genetics field, it's already possible to know the genetic patterns of the populations and "track" the evolutionary route that the human being did. For us to know where we came from these patterns were separated in haplogroups. A haplogroup is the genetic population of people that share a common patrilineal or matrilineal ancestor, this groups receive alphabet letters for identification, and the refinements consists in combinations of numbers and additional letters. With this studies, combined with colonization and migration ones, it's expected that there will be a certain frequency of specific haplogroups. The aim of this study was to standardize multiplex with Y-SNPs of the haplogroups R1, Q, R, F, J2 and K, relevant to the population of the State of Santa Catarina. Polymerase Chain Reaction (PCR) and 10% polyacrylamide gel electrophoresis techniques were used to reach these objectives, focusing mainly on the standardization of the PCR technique for the primers used, resulting in a large number of protocols tested, each with its intention of use and technical direction. The standardization of multiplex markers of these specific groups is a basic work of extreme relevance for future studies aimed at a better understanding of who we are, where we come from and where we are in the phylogenetic tree.

Keywords: Chromosome Y. Ancestry. SNPs. Haplogroups. Phylogenetic Tree.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esqueleto da filogenia do cromossomo Y humano com a nomenclatura do haplogrupo basal (em negrito) e definindo os marcadores Y-SNP. Os marcadores numerados de 1 a 6 na cor vermelha foram abordados no presente trabalho..... 26
- Figura 2 - Frequência do haplogrupo R. Os haplogrupos apresentados são derivados de R (R1, R1a, R1b e R2). R1a (M17) e R1b (M269;P297) são mais frequentes na Europa e noroeste asiático. R2 (M124) tem alta representatividade no Sri Lanka. R1 (M173) está distribuído pela região nordeste da América do Norte e com menor frequência na região noroeste da Austrália e Indonésia. R1b (V88) apresenta uma distribuição restrita na região central da África, mais frequente na Nigéria..... 28
- Figura 3 - Frequência do haplogrupo Q. As maiores frequências são encontradas nas Américas, havendo uma menor ocorrência na Ásia, com algumas regiões com maior representatividade como norte e leste da Rússia..... 29
- Figura 4 - Frequência do haplogrupo J. Com maior frequência na península arábica, o haplogrupo J se distribui também por toda costa norte da África e parte de Madagascar, por uma boa parte da Europa (região sul) e Ásia (regiões sudoeste e central)..... 30
- Figura 5 - Derivações do haplogrupo F. Esse haplogrupo por ser um dos mais antigos possui uma alta taxa de derivações. Primeiramente se diferenciou pela região norte da Índia nos haplogrupos F* Basal (sentido leste), G (sentido oeste), H (sentido sul), IJ (sentido noroeste) e K (sentido norte). Haplogrupo IJ se diferenciou em I (seguindo na direção da Europa) e J (sentido da península arábica). Haplogrupo K se ramificou em vários outros, tendo K* Basal, M e S se distribuindo ao sul asiático, NO ao centro asiático onde se ramificou em N (seguindo ao norte asiático) e O (seguindo ao sudoeste asiático), Q (seguindo ao noroeste asiático), R, L e T ao oeste asiático, sendo que R se dividiu em R1a e R1b se distribuindo pela Europa..... 31
- Figura 6 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 11 amostras para cada conjunto de marcadores (R1 e Q). Foi utilizado as mesmas amostras para ambos conjuntos, sendo que das 4 ampliações, as amostras das canaletas 9 e 20 representam um mesmo indivíduo, assim como 10 e 21..... 46
- Figura 7 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 5 amostras para cada conjunto de marcadores (R e F). Foi utilizado as mesmas amostras para ambos os conjuntos..... 47

Figura 8 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para cada conjunto de marcadores (R1, Q e J2). Foram utilizadas as mesmas amostras para os conjuntos.....	48
Figura 9 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para cada conjunto Duplex R1Q e QJ2, 3 amostras para o conjunto Duplex R1J2, e 4 amostras para conjunto Triplex R1QJ2. Foi utilizado as mesmas amostras para os conjuntos, com exceção do conjunto R1J2, que teve uma amostra deletada.	48
Figura 10 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para cada conjunto Duplex e Triplex. Foi utilizado as mesmas amostras para os conjuntos.	49
Figura 11 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 10 amostras para Triplex com redução de DNA aplicado.	50
Figura 12 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 6 amostras para conjunto F e K. Foi utilizado as mesmas amostras para os conjuntos. R.0 é replicata da amostra PSC 6000 que foi usada como controle positivo. Conjunto F obteve bandas confiáveis, diferente de K que apresentou bandas com estranhezas.	50
Figura 13 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para conjunto K. Amostras que correram com Solução Carreadora (S. Car.) não mostraram amplificação adequada, enquanto as que correram com Sacarose 4% apresentam bandas, porém irregulares.	51
Figura 14 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 7 amostras para conjunto Duplex R1Q com alteração nas concentrações de Q.....	51
Figura 15 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 9 amostras para conjuntos Duplex (R1Q e J2F). Resultados para R1Q mostra bandas definidas para conjunto Q em 5 amostras (caneletas 1, 2, 3, 5 e 7) e vestígios para conjunto R1 (caneletas 3 e 5). Resultados para J2F foi bom apenas para duas amostras (caneletas 0 e 3).	52
Figura 16 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 15 amostras para conjunto F indicando apenas três ampliações. (canaletas 1, 11 e 14).	53
Figura 17 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 20 amostras para conjunto J2F indicando apenas duas ampliações de conjunto F.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela apresentando as concentrações dos reagentes e soluções de protocolo realizadas durante Teste I. (N= 1).....	35
Tabela 2 – Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas durante Teste II. (N= 1).....	36
Tabela 3 – Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas nos ensaios individuais durante Teste III. (N= 1).....	37
Tabela 4 - Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas nos ensaios Duplex e Triplex durante Teste III. (N= 1).....	38
Tabela 5 – Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas durante Teste IV. (N= 1).	39
Tabela 6 - Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas durante Teste V. (N= 1).....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Conjunto de sequências de *primers* para cada haplogrupo. A letra após o nome do *primer* indica o alelo amplificado, exceto R que se refere ao *primer reverse*. Os nucleótidos não complementares são mostrados em letras minúsculas. (HG - haplogrupo; pb - tamanho do *amplicon* em pares de bases; A letra x identifica quais haplogrupos maiores estão excluídos).....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEG	Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética.
cm	Centímetro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> .
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<i>et al.</i>	“e outros”, do latim <i>et alii</i>
g	Grama
HCl	Ácido clorídrico
HEMOSC	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HU/UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago
KCl	Cloreto de potássio
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos.
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Quantia de amostras (“N” amostral)
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Rpm	Rotações por minuto
R.0	Replicata de amostra controle zero
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês: <i>single nucleotide polymorphism</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEMED	do inglês <i>tetramethylethylenediamine</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
U/μL	Unidades por microlitro
V	Volts
Y-SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo no cromossomo Y
μL	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 MARCADORES MOLECULARES DE CROMOSSOMO Y	25
1.2 HAPLOGRUPOS.....	25
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	34
3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	34
Diluição de <i>Primers</i>	41
Reagentes e soluções para a PCR	43
Procedimento	43
Reagentes e soluções para a eletroforese	43
Análise do Produto Amplificado	43
3.3 ANÁLISES DOS DADOS.....	44
4 RESULTADOS	46
4.1 TESTE I	46
4.2 TESTE II.....	46
4.3 TESTE III.....	47
4.4 TESTE IV	49
4.5 TESTE V.....	52
5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
6 REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma diversidade populacional abrangente e o Estado de Santa Catarina não se diferencia nesse aspecto: sendo inicialmente povoado por indígenas, o Estado teve grande influência de imigrantes portugueses, alemães, italianos, japoneses, austríacos e poloneses, além dos descendentes de africanos provenientes do período escravocrata (FRANCISCO, 2017; LIMA, 2012).

Estudo realizado por Manta e colaboradores (2013) determinou a composição étnica média de Santa Catarina, composta por 79,7% de descendentes europeus, 11,4% de afrodescendentes e 8,9% de descendentes ameríndios.

Foi a partir do século XVI que se iniciou a formação de povoados no Estado de Santa Catarina, primeiramente pelos portugueses (FRANCISCO, 2017). Porém, foi com a chegada dos Açorianos em meados do século XVIII (HAMEISTER, 2005; LIMA, 2012) que a colonização da região se acentuou, esses ocupando principalmente as áreas litorâneas. Sem muito tardar, logo ao fim do século XVIII os africanos foram trazidos às centenas para trabalhar nos empreendimentos que se desenvolviam nessa parte meridional do Império Português (LIMA, 2012). Só a partir das primeiras décadas do século XIX chegaram os alemães ao Estado influenciando na formação cultural das cidades de Joinville, Blumenau, Brusque e Pomerode (FRANCISCO, 2017; GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, 2017; JOCHEM, 2012). Por sua vez, na segunda metade do século XIX, a população imigrante de origem italiana ocupou a porção mais ao sul do estado, influenciando na cultura das cidades de Criciúma, Urussanga e Nova Veneza (FRANCISCO, 2017; GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, 2017).

É de interesse saber as origens populacionais para compreender melhor a miscigenação atual e facilitar o mapeamento migratório das populações ancestrais. Atualmente muitos estudos na área da antropologia biológica são realizados utilizando marcadores moleculares específicos para detecção de polimorfismos genéticos, que são capazes de determinar não só a ancestralidade, mas que também colaboram em diferentes áreas da pesquisa científica tanto com humanos quanto com outros animais, vegetais e microrganismos, porém, foi a partir de 1960 que se deram os primeiros passos para um método de marcação de polimorfismo, no qual se desenvolveu por meio do padrão eletroforético de isoenzimas que utilizado em análises de diversidades genéticas (CANÇADO et al., 2012). Posteriormente foi desenvolvido, através de

tecnologias de análise molecular, a determinação de pontos de referência nos cromossomos, denominados “marcadores moleculares” (BORÉM; CAIXETA, 2008; CANÇADO et al., 2012).

1.1 MARCADORES MOLECULARES DE CROMOSSOMO Y

Sabe-se que o genoma humano possui aproximadamente três bilhões de pares de bases e pode-se estimar que cerca de seis milhões desses sejam diferentes de um indivíduo para outro (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). Para avaliar essas diferenças se faz uso de marcadores genéticos ou moleculares que apontam no DNA de um indivíduo o padrão ou o perfil de fragmentos próprios do seu material genético. Para estabelecer um vínculo genético entre indivíduos se faz a identificação de polimórficos no DNA, que em sua grande maioria são regiões ricas em variações populacionais (COOMBER et al., 2007). Essas regiões bastante variáveis são conhecidas como DNA satélites, representam aproximadamente 10% do genoma humano e são eficientes para definir variabilidade (LI et al., 2004).

A região não recombinante do cromossomo Y tem sido alvo de estudos na área da genética antropológica (ALANÍS, 2016). Essa região se destaca por apresentar polimorfismos com certa frequência, como também polimorfismos que surgiram por mutações raras, denominados como polimorfismos de base única (SNPs) (MACHADO et al., 2005). SNPs também são definidos como locais no DNA onde apenas um nucleotídeo passou por mutação ou trocou por um nucleotídeo diferente (ISOGG, 2017a). A taxa de mutação para um SNP é extremamente baixa tornando-os ideais marcadores para a construção da árvore de ancestralidade humana (ROSSETTI, 2016)..

Foram listados mais de 27 mil Y-SPNs (ISOGG, 2017b) que se mostram de grande importância como marcadores genéticos, pois, além de revelar a história evolutiva das populações, suas ocorrências ao longo do genoma os tornam ideais para análises de especiação e demografia histórica (BRUMFIELD et al., 2003).

1.2 HAPLOGRUPOS

Através de marcadores de SNPs pode-se determinar os haplogrupos de DNA de cromossomo Y, sendo que um haplogrupo é definido como uma população genética de pessoas que compartilham um antepassado comum patrilíneo ou matrilinear. Para classificá-los são atribuídas letras do alfabeto para identificação e os refinamentos consistem em combinações de números e letras adicionais (Figura 1) (ISOGG, 2017a).

Quando se trabalha com genética antropológica focando apenas a linhagem patrilinear, uma ferramenta de estudo amplamente utilizada são marcadores Y-SNPs. Estudos foram realizados nas últimas duas décadas abordando as variações do cromossomo Y que permitiram a construção de uma árvore filogenética bem detalhada (Figura 1) que, reflete a evolução mutacional do cromossomo Y a partir do mais recente antepassado patrilineal comum dos humanos modernos (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003).

O antepassado patrilineal comum mais recente de todos os humanos modernos (Y-MRCA) está representado na posição mais à esquerda do esqueleto filogenético, e conforme ocorrem as ramificações as mutações de Y-SNPs vão se distanciando do antepassado patrilineal comum e são equivalentes as ondas migratórias das populações (OVEN et al., 2014), como exemplo, os haplogrupos A e B são mais frequentes para populações africanas estão presentes a esquerda do esqueleto, apoiando a origem africana dos humanos modernos (HAMMER et al., 1998). Com base no esqueleto filogenético pode-se ter ideia das origens e derivações aplicadas aos seis haplogrupos abordados neste trabalho ao decorrer do tempo.

Karafet e colaboradores (2015) afirmaram que houve uma rápida diversificação do haplogrupo K (Figura 1, marcação 6) (com provável ocorrência no Sudeste Asiático), que acompanhou a expansão do haplogrupo P (o antepassado imediato dos Haplogrupos Q e R), para oeste.

Acredita-se que o haplogrupo R (Figura 1, marcação 1) surgiu durante a era do Paleolítico Superior, cerca de 27 mil anos atrás, na Ásia e possui duas sub ramificações principais: R1 e R2 (ISOGG, 2017b; RAGHAVAN et al., 2014).

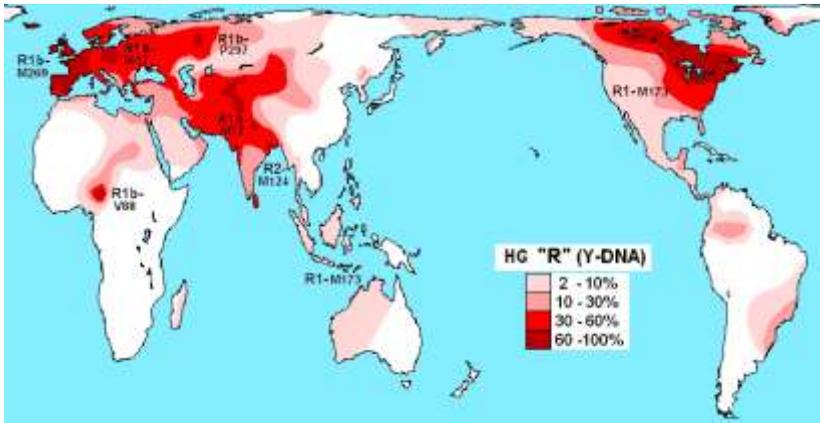
A expansão relativamente rápida dos subgrupos de R1 (Figura 1, marcação 2) tem sido frequentemente observada: tanto R1a quanto R1b compreendem expansões recentes (KARAFET et al., 2008)

Kivisild e colaboradores (2003) sugeriram que o sul e ocidente da Ásia podem ter sido fonte do haplogrupo R1 e que dada a disseminação geográfica e as diversidades dos grupos irmãos R1 e R2 (este está restrito à Índia, Paquistão, Irã e o sul da Ásia central), é possível que o sul e ocidente da Ásia possam ser fonte de diferenciação entre R1 e R1a.

Se estima que o haplogrupo R1 surgiu à cerca de 18,5 mil anos durante o último período glacial na região sudoeste da Índia (ISOGG, 2017b). Hoje em dia é bastante difundido pela Europa, oeste asiático e noroeste americano (Figura 2).

A presença deste haplogrupo na América levantou muitas controvérsias (EREN et al., 2013; FERNANDES et al., 2012; OPPENHEIMER; BRADLEY; STANFORD, 2014; REIDLA et al., 2003; STANFORD; BRADLEY, 2012; STRAUS; MELTZER; GOEBEL, 2005). No entanto, o gradiente decrescente do haplogrupo R no sentido de Nordeste ao Sudoeste da América do Norte sugere que é o resultado de uma mistura de Mal'ta-Buret (MALHI et al., 2008). Outras pesquisas apontam maior semelhança entre os subgrupos de R1 entre os encontrados na América do Norte com os encontrados na Sibéria (LELL et al., 2002; RAGHAVAN et al., 2014), sugerindo imigração pré-histórica da Ásia e Beríngia, decorrentes de duas grandes migrações siberianas.

Figura 2 - Frequência do haplogrupo R. Os haplogrupos apresentados são derivados de R (R1, R1a, R1b e R2). R1a (M17) e R1b (M269;P297) são mais frequentes na Europa e noroeste asiático. R2 (M124) tem alta representatividade no Sri Lanka. R1 (M173) está distribuído pela região nordeste da América do Norte e com menor frequência na região noroeste da Austrália e Indonésia. R1b (V88) apresenta uma distribuição restrita na região central da África, mais frequente na Nigéria.



Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_R_\(Y-DNA\).PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_R_(Y-DNA).PNG)

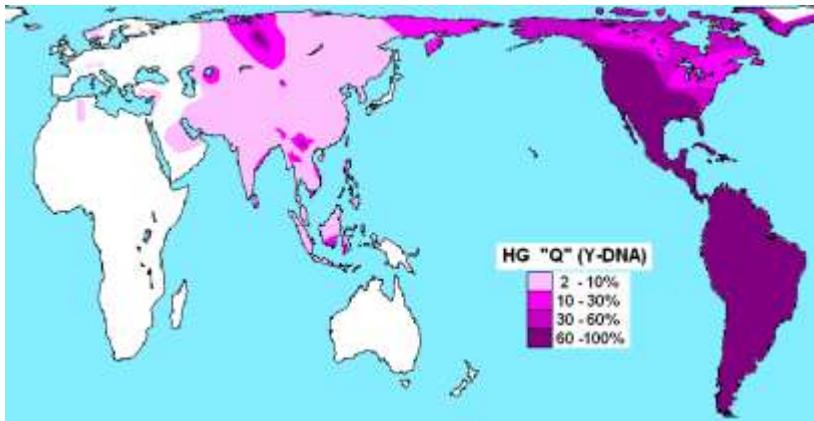
O haplogrupo Q (Figura 1, marcação 3) é mais frequente nas Américas, admitindo-se que tenha partido da Ásia e expandindo-se por todo o continente americano por volta de 17 mil anos atrás (ISOGG, 2017b; ZEGURA et al., 2004) (Figura 3).

O haplogrupo Q é um dos dois ramos de P (M45) (o outro já citado é R-M207) (KARAFET et al., 2015). Há vários ramos do haplogrupo Q, no qual possuem predominância de linhagens masculinas pré-

colombianas ou de povos indígenas das Américas. A maioria deles é descendente dos principais grupos fundadores que migraram da Ásia para as Américas atravessando o Estreito de Bering (ZEGURA et al., 2004).

O haplogrupo Q foi encontrado em aproximadamente 94% dos povos indígenas da América Central e da América do Sul (BORTOLINI et al., 2003). Atualmente no Brasil as frequências de Q entre toda a população masculina correspondem a 3,95% (PALHA et al., 2012).

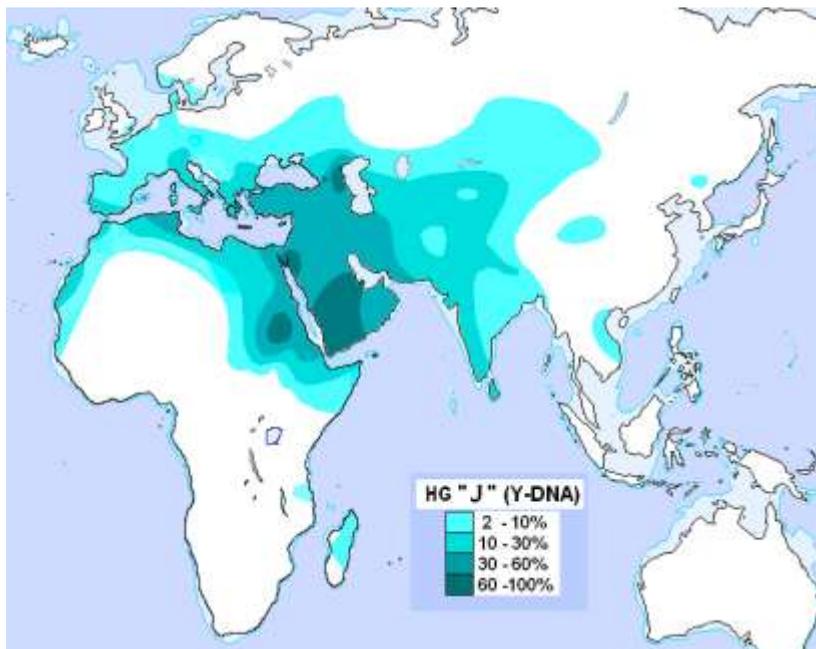
Figura 3 - Frequência do haplogrupo Q. As maiores frequências são encontradas nas Américas, havendo uma menor ocorrência na Ásia, com algumas regiões com maior representatividade como norte e leste da Rússia.



Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_Q_\(Y-DNA\).PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_Q_(Y-DNA).PNG)

O haplogrupo J surgiu por volta de 31 mil anos atrás (SEMINO et al., 2004) no antigo Médio Oriente e se espalhou pelo o Norte de África, Europa, Ásia Central, Paquistão e Índia dividindo-se em duas grandes linhagens: J1 e J2 (Figura 1, marcação 4). Estima-se que o haplogrupo J2 teve origem entre 19.000 e 24.000 anos (BATINI et al., 2015) e que foram originadas na região do Mediterrâneo (ISOGG,2017), sendo também encontrado principalmente no Crescente Fértil, no Cáucaso (NASIDZE et al., 2004), na Anatólia, na Itália, no litoral mediterrâneo e no planalto iraniano (SEMINO et al., 2000). A maior frequência relatada foi de 87,4%, entre Ingush em Malgobek (BALANOVSKY et al., 2012). Essas informações podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4 - Frequência do haplogrupo J. Com maior frequência na península arábica, o haplogrupo J se distribuiu também por toda costa norte da África e parte de Madagascar, por uma boa parte da Europa (região sul) e Ásia (regiões sudoeste e central).

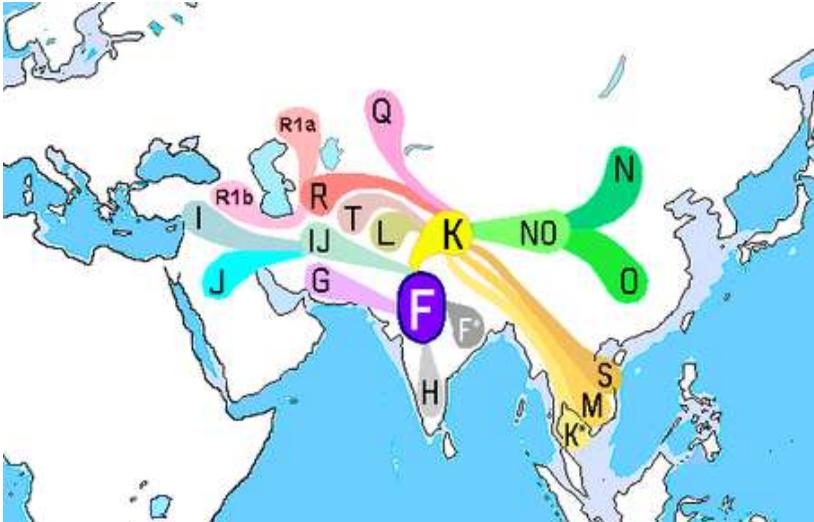


Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_J_\(Y-DNA\).PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_J_(Y-DNA).PNG)

Em relação ao haplogrupo F (Figura 1, marcação 5), estima-se que tenha surgido entre 60 mil e 80 mil anos atrás e que participou na migração original da África (ISOGG, 2017b). Esse haplogrupo constitui mais de 90% das linhagens paternas fora da África e é encontrado principalmente em toda região sul e sudeste da Ásia e algumas partes do leste Asiático (RAGHAVAN et al., 2013).

Por ter uma origem tão distante também se tornou responsável pela derivação de vários outros grupos, entre eles o haplogrupo K, que é uma linhagem antiga que surgiu aproximadamente a 47 mil anos atrás, (KARAFET et al., 2008) provavelmente no sul da Ásia ou no oeste da Ásia. (ISOGG, 2017b) (Figura 5).

Figura 5 - Derivações do haplogrupo F. Esse haplogrupo por ser um dos mais antigos possui uma alta taxa de derivações. Primeiramente se diferenciou pela região norte da Índia nos haplogrupos F* Basal (sentido leste), G (sentido oeste), H (sentido sul), IJ (sentido noroeste) e K (sentido norte). Haplogrupo IJ se diferenciou em I (seguindo na direção da Europa) e J (sentido da península arábica). Haplogrupo K se ramificou em vários outros, tendo K* Basal, M e S se distribuindo ao sul asiático, NO ao centro asiático onde se ramificou em N (seguindo ao norte asiático) e O (seguindo ao sudoeste asiático), Q (seguindo ao noroeste asiático), R, L e T ao oeste asiático, sendo que R se dividiu em R1a e R1b se distribuindo pela Europa.



Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_F_\(Y-DNA\).PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Haplogroup_F_(Y-DNA).PNG)

A complexa distribuição e derivações de Y-SNPs são resultados de milhares de anos de desenvolvimento que foram arcando e registrando a história de nossos antepassados em nossos próprios genes. O desafio para a comunidade científica é traduzir o que carregamos e interpretar os resultados de modo plausível.

Esse trabalho tem intuito de estabelecer condições metodológicas padronizadas para determinação dos haplogrupos presentes na região sul do Brasil, com ênfase para o Estado de Santa Catarina, afim de uma melhor compreensão das interações entre esses marcadores e visando auxiliar futuros estudos de análise de distribuição dos mesmos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar o ensaio de multiplex com marcadores Y-SNPs dos haplogrupos R1, Q, R, F, J2 e K em indivíduos do Estado de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ★ Padronizar o protocolo de Medina e colaboradores (2014) no LAPOGE para marcadores Y-SNPs específicos para os haplogrupos R1, Q, R, F, J2 e K, individualmente;
- ★ Padronizar ensaios duplex e tríplex com marcadores Y-SNPs com base nos ensaios padronizados individualmente;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

A amostra biológica foi constituída por sangue de 101 homens não aparentados do Estado de Santa Catarina, atendidos pelo Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC) e unidades do HEMOSC em quatro diferentes centros urbanos de Santa Catarina (Joinville, Blumenau, Lages e Florianópolis). As coletas e processamento do sangue dos indivíduos foram realizados anteriormente por membros do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Após a coleta e armazenamento do sangue em tubos estéreis, estes foram devidamente identificados e transportados ao LAPOGE. As coletas foram rotuladas e mantidas a 4°C até o momento da separação e preparação das amostras. A amostra biológica de cada indivíduo foi integrada ao Banco de DNA/LAPOGE juntamente com os formulários de dados epidemiológicos preenchidos no momento da coleta de sangue.

Um total de 202 amostras foram quantificadas e diluídas a 20 ng/μL. Porém, devido a não amplificação das amostras diluídas (dados não mostrados), foram utilizadas 101 amostras para a padronização do protocolo.

3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Os fragmentos foram amplificados utilizando protocolo descrito por Medina e colaboradores (2014), que descreve as condições para técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e também os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). As alterações realizadas durante todo o processo de refinamento desse protocolo estão presentes nas tabelas a seguir (Tabelas 1 a 6).

Tabela 1 - Tabela apresentando as concentrações dos reagentes e soluções de protocolo realizadas durante Teste I. (N= 1).

Haplogrupo	Solução	Concentração Estoque	Concentração Mix RI I ₁	Concentração Mix RI I ₂
	Tampão	1x	1x	1x
	MgCl₂ (mM)	50	0,75	0,75
	dNTP (mM)	10	100	100
	Taq Platinum (U/ μ L)	5	0,025	0,025
R1	M173F1C (μ M)	10	0,375	0,375
	M173F2A (μ M)	10	0,375	0,375
	M173R (μ M)	10	0,375	0,375
	DNA	20 ng/ μ L	20 ng	60 ng

Tabela 2 – Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas durante Teste II. (N= 1).

Haplogrupo	Solução	Concentração Mix R1 II	Concentração Mix Q II	Concentração Mix J2 II	Concentração Mix R II	Concentração Mix F II	Concentração Mix K II	Concentração Mix R1Q II
	Tampão	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
	MgCl₂ (mM)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
	dNTP (μM)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Taq Platinum (U/μL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
R1	M173F1C (μM)	0,375						0,375
	M173F2A (μM)	0,375						0,375
	M173R (μM)	0,375						0,375
Q	M242F1C (μM)		0,281					0,281
	M242F2T (μM)		0,375					0,375
	M242R (μM)		0,281					0,281
J2	M172F1G (μM)			0,625				
	M172F2T (μM)			0,75				
	M172R (μM)			0,625				
R	M207F1G (μM)				0,625			
	M207F2A (μM)				0,75			
	M207R (μM)				0,625			
F	M89R1 (μM)					0,2		
	M89R2 (μM)					0,2		
	M89F (μM)					0,2		
K	M9F1G (μM)						0,375	
	M9F2C (μM)						0,375	
	M9R (μM)						0,375	
	DNA (ng)	60	60	60	60	60	60	60

Tabela 3 – Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas nos ensaios individuais durante Teste III. (N= 1).

Haplogrupo	Solução	Concentração Mix R1 III	Concentração Mix Q III	Concentração Mix J2 III
	Tampão	1x	1x	1x
	MgCl₂ (mM)	7,5	7,5	7,5
	dNTP (μM)	1000	1000	1000
	Taq Platinum(U/μL)	0,25	0,25	0,25
R1	M173F1C (μM)	0,375		
	M173F2A (μM)	0,375		
	M173R (μM)	0,375		
Q	M242F1C (μM)		0,281	
	M242F2T (μM)		0,375	
	M242R (μM)		0,281	
J2	M172F1G (μM)			0,625
	M172F2T (μM)			0,75
	M172R (μM)			0,625
	DNA (ng)	100	100	100

Tabela 5 – Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas durante Teste IV. (N= 1).

Haplogrupo	Solução	Concentração Mix RIQJ2 IV	Concentração Mix F IV	Concentração Mix K IV	Concentração Mix RIQ IV -
	Tampão	1x	1x	1x	1x
	MgCl₂ (mM)	7,5	7,5	7,5	7,5
	dNTP (μM)	1000	1000	1000	1000
	Taq Platinum (U/μL)	0,25	0,25	0,25	0,25
R1	M173F1C (μM)	0,375			0,375
	M173F2A (μM)	0,375			0,375
	M173R (μM)	0,375			0,375
Q	M242F1C (μM)	0,281			0,185
	M242F2T (μM)	0,375			0,2475
	M242R (μM)	0,281			0,185
J2	M172F1G (μM)	0,625			
	M172F2T(μM)	0,75			
	M172R (μM)	0,625			
F	M89R1 (μM)		0,2		
	M89R2 (μM)		0,2		
	M89F (μM)		0,2		
K	M9F1G (μM)			0,375	
	M9F2C (μM)			0,375	
	M9R (μM)			0,375	
	DNA (ng)	40	100	100	100

Tabela 6 - Tabela apresentando as modificações de protocolo realizadas durante Teste V. (N= 1).

Haplogrupo	Solução	Concentração Mix R1Q V	Concentração Mix J2F V	Concentração Mix F V	Concentração Mix J2F V -
	Tampão	1x	1x	1x	1x
	MgCl₂ (nM)	7,5	7,5	7,5	7,5
	dNTP (μM)	1000	1000	1000	1000
	Taq Platinum (U/μL)	0,25	0,25	0,25	0,25
R1	M173F1C (μM)	0,488			
	M173F2A (μM)	0,488			
	M173R (μM)	0,488			
Q	M242F1C (μM)	0,123			
	M242F2T (μM)	0,173			
	M242R (μM)	0,123			
J2	M172F1G (μM)		0,938		0,625
	M172F2T (μM)		1,125		0,75
	M172R (μM)		0,938		0,625
F	M89R1 (μM)		0,3	0,26	0,2
	M89R2 (μM)		0,3	0,26	0,2
	M89F (μM)		0,3	0,26	0,2
	DNA (ng)	100	100	100	100

Diluição de *Primers*

Inicialmente os *primers* liofilizados foram centrifugados por 5 minutos antes de serem abertos e a cada *primer* foi adicionado água ultrapura segundo a bula especificada pelo fabricante (Alpha DNA®) para alcançar a concentração de 100 μM . Após a eluição dos *primers*, foi feita a diluição de cada *primers* para a obtenção da solução de uso a 10 μM , composto por: 10 μL de solução estoque (100 μM) e 90 μL de H_2O ultrapura.

Foram escolhidos os seis grupos de *primers* que determinam os haplogrupos R1, Q, J2, R, F e K (Medina et al., 2014) apresentados como bons marcadores de interesse populacional de ancestralidade. (Quadro 1).

Quadro 1 - Conjunto de sequências de *primers* para cada haplogrupo. A letra após o nome do *primer* indica o alelo amplificado, exceto R que se refere ao *primer reverse*. Os nucleótidos não complementares são mostrados em letras minúsculas. (HG - haplogrupo; pb - tamanho do *amplicon* em pares de bases; A letra x identifica quais haplogrupos maiores estão excluídos).

HG	Primer	Sequência (5' - 3')	pb
R1	M173F1C	cCA AGG GCA TTg AGA ACC	150
	M173F2A	ta atg tat TCA AGG GCA TaT AGA ACA	158
	M173R	CA GCC TTC AAA GCT TCT CCT	
Q	M242F1C	A AAG GTG ACC AAG GTG CTC	131
	M242F2A	A aca atA AAG GTt ACC AAG GTG CTT	137
	M242R	TCA GCA TAA TAC CTT ACC TAG AAC AAC	
R	M207F1G	CgA GTC AAG CAA GcA ATT TAG	124
	M207F2A	gtt cac TAA GTC AAG CAA GAA ATc TAA	118
	M207R	AAA AGC TGA AGG AAA AGT GGA	
J2	M172F1G	A AAC CCA TTT gGA TGC TTG	96
	M172F2T	cta atA AAC CCA TTg TGA TGC TTT	101
	M172R	TTA AAT ATC AGC CAG GTA CAG AGA	
F (x K,Q,R)	M89R1	Cg CAG GCA AAG TGA GAG ATA	85
	M89R2	ttt aaT CAG GCA AAG TGA GAG ATG	89
	M89F	C ACA GAA GGA TGC TGC TCA	
K (x Q,R)	M9F1G	G GCC TAA GAT GGT TGg ATG	70
	M9F2C	tt tgG aCC TAA GAT GGT TGA ATC	74
	M9R	T GTA AGA CAT TGA ACG TTT GgA	

Reagentes e soluções para a PCR

- ★ Água ultrapura;
- ★ Tampão de PCR 10X (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl);
- ★ $MgCl_2$ 1,5 mM (50 mM);
- ★ dNTPs 10 mM de cada;
- ★ Taq Platinum® 5U/ μ L.

Procedimento

Em microtubos de 0,2 mL foram adicionados 14,68 μ L de água ultrapura, 2,00 μ L de tampão 10X, 0,6 μ L de $MgCl_2$ (1,5 mM), 0,32 μ L de dNTPs (10 mM), 0,3 μ L da solução de uso de *primers*, 0,1 μ L de Taq Platinum® (5U/ μ L) e 2,00 μ L de DNA, totalizando 20 μ L finais. Para cada reação foi feito um tubo de controle negativo, onde foi adicionado 2,00 μ L de água ultrapura no lugar do DNA, para se ter certeza que os reagentes não estavam contaminados. Estas amostras foram submetidas a PCR em um termociclador (Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler) de acordo com o protocolo de Medina e colaboradores (2014), sendo: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 33 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; uma etapa de 72°C por 10 minutos, encerrando a 4°C.

Reagentes e soluções para a eletroforese

- ★ Solução de poliacrilamida 29:1 (29g de acrilamida, 1g de bisacrilamida e 100 mL de água destilada);
- ★ EDTA pH 8,0 (18,6 g EDTA, 100 mL de água ultrapura);
- ★ Tetrametiletilenodiamina (TEMED);
- ★ TBE 10X (108 g de TRIS, 53 g de ácido bórico, 40 mL de EDTA pH 8,0 e água ultrapura q.s.p. 1 L);
- ★ TBE 1X para corrida (900 mL de água e 100 mL de TBE 10X);
- ★ Persulfato de amônio 10 % (1 g de persulfato de amônio e 10 mL de água destilada);

Análise do Produto Amplificado

Após a PCR as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Estes foram feitos adicionando H_2O destilada à

solução de acrilamida/bisacrilamida, a temperatura ambiente, antes da adição do TBE (10X). Os catalisadores da reação de polimerização do gel, TEMED e persulfato de potássio foram adicionados à mistura do gel imediatamente antes de vertê-la em um cassete previamente montado, composto de duas placas de vidro separadas por espaçadores e presas com o auxílio de prendedores metálicos. O tamanho das placas foi de 22 cm *versus* 17 cm. Logo após, um pente foi colocado na borda superior, formando poços no gel. Aguardou-se a polimerização por 30 minutos. Após a polimerização do gel o pente foi retirado, a placa fixada na cuba de eletroforese vertical e os poços foram lavados com TBE (1x).

Esta cuba foi conectada a uma fonte de voltagem, PWSys - PW300, Biosystems®, ajustada à tensão constante de 200 V, necessária para separação dos fragmentos amplificadas.

Foi preparado um Mix contendo 220 µL de corante fluorescente GelRed® e 110 µL solução carreadora (N=55), em seguida foi distribuído em uma microplaca 6 µL desse Mix e 10 µL do produto da PCR. Um dos poços da microplaca não recebeu adição do produto da PCR (controle negativo). Na sequência 8 µL de cada poço da placa foram aplicados nos poços do gel de poliacrilamida e a fonte foi ligada a 200 V. A corrida eletroforética durou 2 horas e 30 minutos.

Com o término da corrida, o gel foi retirado cuidadosamente das placas de vidro e registrado pelo fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro® e visualizado em foto digital.

3.3 ANÁLISES DOS DADOS

A diferença dos tamanhos dos fragmentos para cada alelo foi observada pela altura das bandas e a diferença no tamanho dos fragmentos é entre 7 pb a 17 pb, sendo que entre R1 e Q são 13 pb; entre Q e R são 7 pb; entre R e J2 são 17 pb; entre J2 e F são 7 pb; entre F e K são 11 pb.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE I

A amplificação inicial foi com a replicação fidedigna do protocolo descrito por Medina e colaboradores (2014), utilizando um único marcador (R1), o qual foi utilizado como ponto de partida, uma vez que havia sido positivamente amplificado em trabalhos anteriores do grupo (ALANÍS, 2016; SANT'ANNA, 2016), porém, este teste não apresentou resultados positivos (dados não mostrados).

Foram feitas duas misturas conforme tabela 1, colunas 4 e 5, com concentrações de DNA diferentes, no intuito de definir a concentração de DNA ideal para o ensaio.

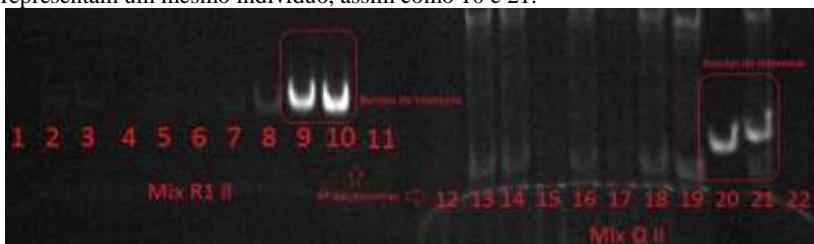
No entanto, esse teste tampouco obteve resultados positivos, uma vez que não houve amplificação de fragmento com nenhuma das concentrações utilizadas (dados não mostrados).

4.2 TESTE II

Após a avaliação dos resultados negativos do teste I, foram ajustadas as concentrações de $MgCl_2$, dNTP e Taq Platinum, que foram multiplicadas por dez após comparação com trabalhos realizados anteriormente pelo grupo LAPOGE (ALANÍS, 2016; SANT'ANNA, 2016) (Tabela 2, coluna 3).

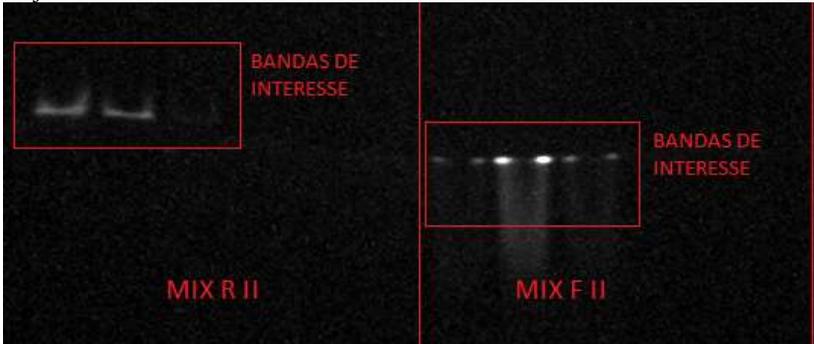
A partir dos ajustes das concentrações foi feita nova PCR para os 6 haplogrupos separadamente (R1, Q, J2, R, F e K), sendo possível detectar a presença de bandas para R1, Q, R e F separadamente (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 11 amostras para cada conjunto de marcadores (R1 e Q). Foi utilizado as mesmas amostras para ambos conjuntos, sendo que das 4 amplificações, as amostras das canaletas 9 e 20 representam um mesmo indivíduo, assim como 10 e 21.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Figura 7 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 5 amostras para cada conjunto de marcadores (R e F). Foi utilizado as mesmas amostras para ambos os conjuntos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Como a amplificação de R1 e Q se apresentou bem definida individualmente (apresentado na Figura 7), foi testado esses dois haplogrupos em um Duplex (Mix R1Q). No entanto, quando juntos o resultado foi insatisfatório. Pela questão que R e F tiveram resultados medianos e K não apresentou amplificações, esses foram deixados para serem testados novamente mais adiante.

4.3 TESTE III

Após avaliação dos resultados anteriores a concentração de DNA aplicado foi alterada de 60 ng para 100 ng (tabela 3) no intuito de melhorar o padrão das bandas. Esse teste teve uma melhor eficiência e apresentou bandas bem definidas (Figura 8).

Figura 8 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para cada conjunto de marcadores (R1, Q e J2). Foram utilizadas as mesmas amostras para os conjuntos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

A partir dos resultados do teste III tentativas para formação de diferentes Duplex e Triplex desses conjuntos de *primers* foram realizadas. Nesses testes se observou que alguns conjuntos de *primers* apresentaram uma forte competição por recursos durante a PCR, dessa forma alguns conjuntos se mostraram fracos quando comparados a outros (Figura 9).

Figura 9 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para cada conjunto Duplex R1Q e QJ2, 3 amostras para o conjunto Duplex R1J2, e 4 amostras para conjunto Triplex R1QJ2. Foi utilizado as mesmas amostras para os conjuntos, com exceção do conjunto R1J2, que teve uma amostra deletada.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Quando se analisa o Duplex R1Q, podemos perceber que o conjunto de marcadores de Q apresentam bandas bem definidas e visíveis, enquanto R1 é praticamente imperceptível. Já no Duplex R1J2, foi o conjunto de R1 que apresentou bandas, enquanto J2 não. Em QJ2 o conjunto de Q novamente se mostrou mais competitivo obtendo bandas, e quando se uniu os três conjuntos em um Triplex (R1QJ2) o conjunto Q

mais uma vez se fez melhor definido. Sendo assim, o conjunto de Q mostrou-se bastante competitivo em todos os testes que se foi aplicado, seguido de R1 e J2, respectivamente.

Por essa razão foram realizadas alterações na concentração dos *primers* que se mostraram menos competitivos durante as últimas PCRs (R1 e J2) conforme tabela 4, colunas 7, 8 e 9, e se aplicou em conjuntos Duplex e Triplex (Figura 10).

Figura 10 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para cada conjunto Duplex e Triplex. Foi utilizado as mesmas amostras para os conjuntos.



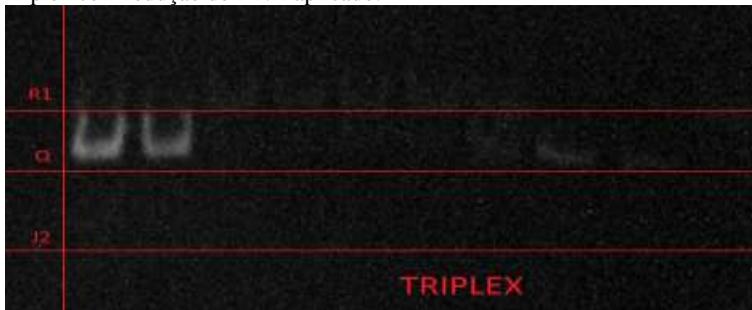
Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Conforme a figura 10, nota-se que com a alteração na concentração dos *primers*, a interação entre os conjuntos de marcadores é alterada, observando-se amplificação somente para R1 no duplex entre R1 e J2 e um leve sinal de amplificação de R1 no triplex.

4.4 TESTE IV

Devido aos negativos resultados do teste anterior (após aumento das concentrações dos *primers*), as suas concentrações originais foram retomadas juntamente com a redução da concentração de DNA, no intuito de verificar a possibilidade de poupar material amostral. (Tabela 5, coluna 3) (Figura 11).

Figura 11 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 10 amostras para Triplex com redução de DNA aplicado.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Avaliando a figura 11 é possível averiguar que ainda se tem competição durante PCR e a redução de DNA aplicado não se faz recomendável. Logo que no teste III foi padronizado os conjuntos individuais R1, Q e J2 (Figura 8), foram retomados os testes para os conjuntos de F e K (Tabela 5, colunas 4 e 5). O conjunto de *primers* para F apresentou amplificação, porém o conjunto de K apresentou bandas fora do padrão (Figura 12).

Figura 12 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 6 amostras para conjunto F e K. Foi utilizado as mesmas amostras para os conjuntos. R.0 é replicata da amostra PSC 6000 que foi usada como controle positivo. Conjunto F obteve bandas confiáveis, diferente de K que apresentou bandas com estranhezas.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Suspeitou-se que a amplificação de K estaria se misturando com a solução carreadora durante a eletroforese, então se repetiu o teste trocando a solução carreadora por sacarose 4%. O resultado confirmou a suspeita e mostrou que o conjunto de K amplifica, porém fica difícil analisar logo que suas bandas são irregulares (Figura 13).

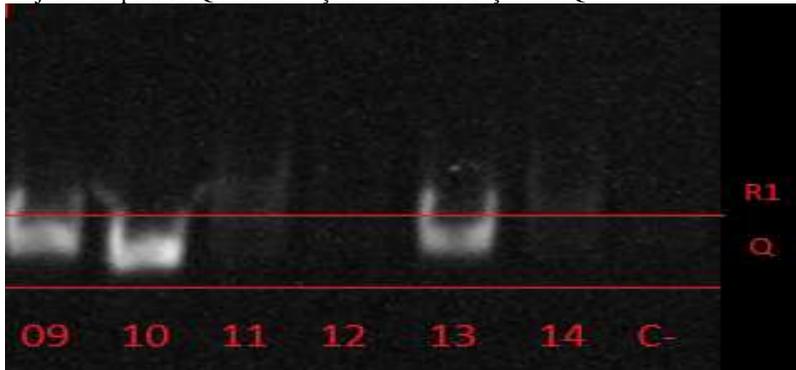
Figura 13 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 4 amostras para conjunto K. Amostras que correram com Solução Carreadora (S. Car.) não mostraram amplificação adequada, enquanto as que correram com Sacarose 4% apresentam bandas, porém irregulares.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Retomando o resultado do Duplex R1Q do Teste III (Figura 9) se fez a tentativa de diminuir as concentrações de Q (Tabela 5, coluna 6) na intenção de diminuir a competição durante a PCR e os *primers* de R1 conseguem amplificar com maior facilidade (Figura 14).

Figura 14 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 7 amostras para conjunto Duplex R1Q com alteração nas concentrações de Q.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Avaliando a figura 14 se percebe que não houve grandes alterações nos resultados, e que o conjunto R1 apresenta grande dificuldade em amplificar junto a Q.

4.5 TESTE V

Após todos os testes, foram reunidos os resultados e definidos protocolos finais. Iniciaram-se os testes finais para dois Duplex (R1Q e J2F) com alterações de concentrações dos *primers* (Tabela 6, colunas 3 e 4). Os dois duplex apresentaram bandas irregulares (Figura 15).

Figura 15 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 9 amostras para conjuntos Duplex (R1Q e J2F). Resultados para R1Q mostra bandas definidas para conjunto Q em 5 amostras (caneletas 1, 2, 3, 5 e 7) e vestígios para conjunto R1 (caneletas 3 e 5). Resultados para J2F foi bom apenas para duas amostras (caneletas 0 e 3).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Na sequência se tentou a padronização apenas do conjunto de *primers* marcadores de F, porém com aumento de concentração do conjunto de 30% no intuito de haver a possibilidade de agrupa-lo com J2 (Tabela 6, coluna 5). Para evitar a má interação do conjunto com a solução carreadora esse teste foi realizado alterando a solução carreadora por sacarose 4%, porém não obteve bons resultados e as ampliações foram fracas ou inexistentes (Figura 16).

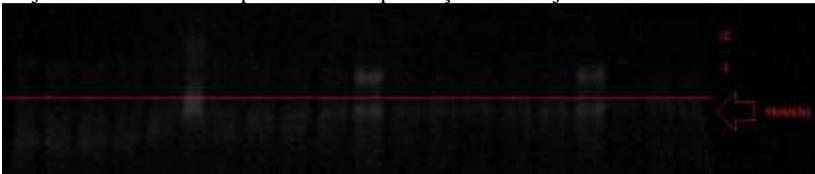
Figura 16 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 15 amostras para conjunto F indicando apenas três ampliações. (canaletas 1, 11 e 14).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Uma última tentativa de Duplex foi realizada entre J2 e F (Tabela 6, coluna 6). Para evitar que houvesse interação com a solução carreadora o teste de eletroforese foi realizado com sacarose 4% (Figura 17).

Figura 17 - Foto de gel de poliacrilamida 10% com corrida de 20 amostras para conjunto J2F indicando apenas duas ampliações de conjunto F.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

A análise desse último gel confirma a grande complexidade da interação entre os *primers* que foram utilizados.

5 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível padronizar o teste para marcadores dos haplogrupos R1, Q, J2, F e K individualmente, porém quando agrupados apenas se obteve resultados positivos para R1Q e J2F, os outros resultados persistiram em não se consolidar.

Devido as dificuldades encontradas, a padronização dos conjuntos Triplex não foram definidos, entretanto, com a determinação dos grupos individualmente abriu-se a possibilidade de investigar os haplogrupos separadamente conforme o propósito de futuros trabalhos.

Refletindo sobre os resultados alcançados pode-se afirmar que a interação entre os conjuntos de *primers* utilizados se mostra de grande complexidade e precisa ser mais bem estudado para evitar futuras frustrações para a comunidade científica. Após uma revisão de suas interações se vê de importância que ocorra uma padronização para o protocolo *multiplex* no qual seja replicável. Mesmo após o contato com os autores do artigo utilizado como base e o compartilhamento de informações mais detalhadas sobre o protocolo, houve a falta de resultados, que mesmo com o auxílio direto de pelo menos quatro autores o *Multiplex* não se fez replicável.

Foi possível levantar algumas hipóteses em relação às dificuldades encontradas no decorrer do trabalho, podendo ter como causa a má condição das amostras, que com certa frequência se mostraram degradadas, refletindo um problema que pode ter ocorrido durante seu armazenamento por vários anos, uma vez que se referem a coletas realizadas há mais de 7 anos. A sugestão é que haja novas coletas e novas extrações utilizando protocolos mais modernos, que o armazenamento e conservação da integridade dessas novas amostras sejam cuidados com extrema cautela para que seu tempo de “vida útil” seja prolongado ao máximo.

Outra possibilidade se refere à interação dos *primers*, que não mostraram grande afinidade entre si e muitas vezes não se conseguiu trabalhar com eles quando agrupados demonstrando possível competição de recursos durante PCR.

Pela falta de afinidade entre os *primers* também parece necessário fazer um levantamento bibliográfico, na busca de possíveis novos *primers*, para então realizar novos testes, buscando uma melhor padronização de protocolo.

Analisando as temperaturas e tempos do programa do termociclador há suspeita que a temperatura demasiada baixa para a anelação (55° C), esteja causando um excesso de ligações não específicas, inviabilizando

bons resultados. A opinião sobre esse caso é que se examine melhor quais *primers* estão sendo utilizados ao mesmo tempo e que se procure uma temperatura mais elevada que ocorra o anelamento. Se não for de bom uso a alteração da temperatura, que faça a alteração dos conjuntos de *primers*, ou que se utilize uma quantia menor de *primers* durante a PCR.

A partir dos estudos realizados nesse trabalho é possível se testar novas combinações e pesquisar melhorias para a interação desses *primers*, desde alterações de concentrações de *primers*, soluções e diluições, alteração do protocolo de extração, melhoria no armazenamento de amostras, ou até mesmo uma revisão nos tempos e temperaturas utilizadas no termociclador. Outra possibilidade seria a tentativa de utilizar diferentes *primers*, que possam identificar os haplogrupos desejados.

6 REFERÊNCIAS

ALANÍS, G. F. G. Reconstrução da Contribuição Européia na População de Santa Catarina através do Marcador M207 (rs2032658) do Cromossomo Y. 2016.

BALANOVSKY, O. et al. Europe PMC Funders Group Parallel Evolution of Genes and Languages in the Caucasus Region. v. 2011, n. 10, p. 2905–2920, 2012.

BATINI, C. et al. Large-scale recent expansion of European patrilineages shown by population resequencing. **Nature Communications**, v. 6, n. May 2014, p. 7152, 19 maio 2015.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares V.1**. 2. ed. Viçosa, MG: [s.n.].

BORTOLINI, M. et al. Y-Chromosome Evidence for Differing Ancient Demographic Histories in the Americas. p. 524–539, 2003.

BRUMFIELD, R. T. et al. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 5, p. 249–256, maio 2003.

CANÇADO, G. M. DE A. et al. **Marcadores moleculares de DNA e suas aplicações na caracterização, identificação e melhoramento genético da oliveira**. 1. ed. [s.l.] EPAMIG, 2012.

COOMBER, N. et al. Validation of a short tandem repeat multiplex typing system for genetic individualization of domestic cat samples. **Croatian medical journal**, v. 48, n. 4, p. 547–55, ago. 2007.

EREN, M. I. et al. Refuting the technological cornerstone of the Ice-Age Atlantic crossing hypothesis. **Journal of Archaeological Science**, v. 40, n. 7, p. 2934–2941, jul. 2013.

FERNANDES, V. et al. The Arabian Cradle: Mitochondrial Relicts of the First Steps along the Southern Route out of Africa. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 2, p. 347–355, fev. 2012.

FRANCISCO, W. DE C. E. **Aspectos da população de Santa Catarina**. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/brasil/aspectos-populacao->

santa-catarina.htm>. Acesso em: 27 jun. 2017.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Introduction to Conservation Genetics. **Kardiologia polska**, v. 61, n. 9, p. 277–81, 24 set. 2004.

GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. **História do Estado de Santa Catarina**. Disponível em:

<<http://www.sc.gov.br/index.php/conhecasc/historia>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

HAMEISTER, M. D. Notas sobre a construção de uma “identidade açoriana” na colonização do sul do Brasil ao século XVIII. **Anos 90, Porto Alegre**, v. 12, n. n. 21/22, p. 53–101, 2005.

HAMMER, M. F. et al. Out of Africa and Back Again: Nested Cladistic Analysis of Human Y Chromosome Variation. **Society for Molecular Biology and Evolution**, v. 15(4), p. 427–441, 1998.

ISOGG. **Y-chromosome DNA haplogroups Mitochondrial DNA haplogroups**. Disponível em: <<https://isogg.org/wiki/Haplogroup>>. Acesso em: 23 jun. 2017a.

ISOGG. **International Society of Genetic Genealogy**. Disponível em: <<https://isogg.org>>. Acesso em: 1 jun. 2017b.

JOBLING, M. A.; TYLER-SMITH, C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 8, p. 598–612, ago. 2003.

JOCHEM, T. **180 anos de Imigração Alemã em Santa Catarina**.

Disponível em:

<<http://www.aguasmornas.sc.gov.br/imigracao/toni/hr3.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

KARAFET, T. M. et al. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 830–838, 21 fev. 2008.

KARAFET, T. M. et al. Improved phylogenetic resolution and rapid diversification of Y-chromosome haplogroup K-M526 in Southeast Asia. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 3, p. 369–373, 4 mar. 2015.

KIVISILD, T. et al. The Genetic Heritage of the Earliest Settlers Persists Both in Indian Tribal and Caste Populations. **The American Journal of**

Human Genetics, v. 72, n. 2, p. 313–332, fev. 2003.

LELL, J. T. et al. The dual origin and Siberian affinities of Native American Y chromosomes. **American journal of human genetics**, v. 70, n. 1, p. 192–206, jan. 2002.

LI, Y.-C. et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 6, p. 991–1007, 12 jun. 2004.

LIMA, H. E. **Da escravidão à liberdade na Ilha de Santa Catarina**, 2012. Disponível em: <https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/561801/mod_resource/content/1/B9EscravLiberd.pdf>

MACHADO, R. B. et al. Filogeografia do cromossomo y em uma população negra do rio de janeiro. **UFRGS**, p. 434, 2005.

MALHI, R. S. et al. Distribution of Y chromosomes among Native North Americans : **Am J Phys Anthropol**, v. 137, n. 4, p. 412–424, 2008.

MANTA, F. S. DE N. et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. **PLoS one**, v. 8, n. 9, p. e75145, 20 set. 2013.

NASIDZE, I. et al. Mitochondrial DNA and Y-Chromosome Variation in the Caucasus. **Annals of Human Genetics**, v. 68, n. 3, p. 205–221, maio 2004.

OPPENHEIMER, S.; BRADLEY, B.; STANFORD, D. Solutrean hypothesis: genetics, the mammoth in the room. **World Archaeology**, v. 46, n. 5, p. 752–774, 20 out. 2014.

OVEN, M. VAN et al. Seeing the Wood for the Trees: A Minimal Reference Phylogeny for the Human Y Chromosome Seeing the Wood for the Trees: A Minimal Reference Phylogeny for the Human Y Chromosome. **Human mutation**, v. 35, n. 2, p. 187–91, fev. 2014.

PALHA, T. et al. Disclosing the Genetic Structure of Brazil through Analysis of Male Lineages with Highly Discriminating Haplotypes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40007, 10 jul. 2012.

RAGHAVAN, M. et al. Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 87–91, 20 nov. 2013.

RAGHAVAN, M. et al. Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans. v. 505, n. 7481, p. 87–91, 2014.

REIDLA, M. et al. Origin and Diffusion of mtDNA Haplogroup X. **The American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 5, p. 1178–1190, nov. 2003.

ROSSETTI, V. **Sahelanthropus tchadensis – NOSSO ÚLTIMO ANCESTRAL COMUM CHIMPANZÉ-HUMANO, ATÉ O MOMENTO**. Disponível em:

<<https://netnature.wordpress.com/2016/07/13/sahelanthropus-tchadensis-nosso-ultimo-ancestral-comum-chimpanze-humano-ate-o-momento/>>.

SANT’ANNA, F. C. M. DE. RECONSTRUÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO AMERÍNDIA DA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA ATRAVÉS DO MARCADOR M242 (rs8179021) DO CROMOSSOMO Y. 2016.

SEMINO, O. et al. The Genetic Legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in Extant Europeans: A Y Chromosome Perspective. **Science**, v. 290, n. 5494, p. 1155–1159, 2000.

SEMINO, O. et al. Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean area. **American journal of human genetics**, v. 74, n. 5, p. 1023–34, maio 2004.

STANFORD, D. J.; BRADLEY, B. A. Across Atlantic Ice: The Origins of America’s Clovis Culture. **PaleoAnthropology**, p. 470–471, 2012.

STRAUS, L. G.; MELTZER, D. J.; GOEBEL, T. Ice Age Atlantis? Exploring the Solutrean-Clovis ?connection? **World Archaeology**, v. 37, n. 4, p. 507–532, dez. 2005.

ZEGURA, S. L. et al. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 1, p. 164–75, 31 jan. 2004.