



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZA RAUEN SABBAG

**UTILIZAÇÃO DE UM PAINEL DE ANCESTRALIDADE DE 46 MARCADORES
InDel EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS BRASILEIRAS**

CURITIBA

2017

LUIZA RAUEN SABBAG

UTILIZAÇÃO DE UM PAINEL DE ANCESTRALIDADE DE 46 MARCADORES

InDel EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS BRASILEIRAS

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Danielle Malheiros

Co-orientadora: Dra. Marianna Maia Taulois do Rosário

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Danielle Malheiros, por ter me recebido de braços abertos e ter me apoiado em todos os momentos.

Ao colaborador, chefe e inspiração profissional e peça indispensável deste trabalho, Dr. Marcelo Malaghini por ter me proporcionado esse trabalho e se comprometido em fazer dar certo, mesmo embaixo d'água!

À Dra. Fernanda Manta, primeiramente por ter feito doutorado e eu ter encontrado sua tese, em seguida por ter sido tão maravilhosa quando fui agradecer e por toda ajuda posterior! Me alegra ter pessoas como você no mundo da ciência!!

Aos pesquisadores Dra. Leonor Gusmão e Dr. Rui Pereira, por terem desenvolvido um trabalho tão apaixonante.

À toda equipe do LGMF, por terem sido os melhores companheiros de trabalho que eu poderia sonhar e por hoje serem a minha família. Além de eu ter conseguido realizar o sonho da minha carreira de ter trabalhado com genética forense, eu carreguei um sorriso enorme no coração todos os dias em que fui trabalhar, só por saber que teria mais um dia recheado de momentos maravilhosos com vocês.

À equipe do LGMH, por terem me recebido com tanto carinho, especialmente a Veronica Calongas, eu não teria conseguido se não fosse sua paciência e conhecimento!

Aos meus pais, Rosane e Julio, por terem me proporcionado a vida que me trouxe até aqui e me tornado a mulher que sou hoje. Eu não seria nada sem vocês!

À minha falecida avó Lucila Rauen, que ecoou na minha cabeça em todos os momentos difíceis dizendo “O estudo é a única coisa que ninguém nunca vai tirar de você, continue”. A mulher mais honesta e forte que conheci, minha maior inspiração e razão de eu nunca deixar faltar uma flor em casa, só pra ela se fazer presente.

Ao meu avô, Dr. Farid Sabbag, um grande exemplo que me apoiou desde o início me deixando roubar seus livros, me dando outros de presente e sempre

me instigando a saber e estudar cada vez mais, sendo com certeza um dos precursores da minha paixão pela ciência, que eu mal consigo expressar minha gratidão.

À minha madrinha Rosanne Sabbag, que desde que eu me entendo por gente esteve ao meu lado, me fazendo ser cada dia melhor. Você é um exemplo de mulher forte e guerreira que eu tenho orgulho de dizer que é sangue do meu sangue.

Aos meus amigos da faculdade, Aline, Amanda, Daniel, Paloma e Rafael, que sempre estiveram por perto, sempre a postos para tomar um café e sentar no gramado para fazer o dia valer a pena! Vocês estão para sempre no meu coração e na minha história.

Aos meus amores Claudia, Denise, Eduardo, Leonardo e Marianna por serem os mais dedicados peritos criminais. Morro de orgulho de cada um de vocês e com certeza ainda derrubaremos algum prédio com as nossas risadas.

À Mary Schaffer, obrigada por ter acreditado em mim e me dado tantos colos.

Ao Daniel, por ter enchido meus dias de cor e café! Você deixou tudo muito mais fácil. Obrigada por não permitir que o excel vencesse.

Por último, à minha família, Cassius, Nana, Breno, Helena e Liz. Cassius, você é um exemplo de homem e pai, sou muito grata por você ser o pai dos meus pequenos (e meu irmão mais velho)! Helena, meu raio de sol, você é a criatura mais pura e linda que eu já conheci. O mundo tem muita sorte de você existir e eu mais ainda por ter um pouquinho do seu amor! Breno, afilhado mais maravilhoso de todo o mundo, um dia espero que você saiba que sorrir e pensar em você, pra mim, são sinônimos. Liz! Nesse momento, você deve ser do tamanho de um abacate dentro da barriga da sua mãe e eu já te amo incondicionalmente. Nana, eu devo tudo isso a você. Não tem como pensar na pessoa que eu sou hoje sem pensar em ti. Você, durante toda a minha graduação foi a pessoa que eu mais admirei e me inspirei, uma profissional dedicada, apaixonada, altruísta e que sempre deu tudo de si. Eu me considero honrada em ter te conhecido e hoje poder falar com toda a certeza de que você é minha irmã e nós estaremos sempre juntas.

“Do or do not, there is no try”

Yoda

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFR - Africanos

AIMs - Marcadores Informativos de Ancestralidade

AMOVA - Análise de Variância Molecular

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EBR - Eurobrasileiros

EUR - Europeus

HGDP-CEPH - *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (Centro de Estudos de Polimorfismos Humanos)

H-W - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

INDEL - Polimorfismo de inserção/ deleção

LDD – Laboratório de Diagnósticos por DNA – Rio de Janeiro

LGMF – Laboratório de Genética Molecular Forense

LGMH - Laboratório de Genética Molecular Humana

MCMC - Cadeia de Markov Monte Carlo

MS - Mato Grosso do Sul

NAM - Nativos americanos

pb- Pares de Base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PR - Paraná

qPCR – PCR quantitativa

SNPs - Polimorfismos de Nucleotídeo Único (*Single nucleotide polymorphism*)

STRs – Curtas repetições em tandem (*Short tandem repeat*)

RESUMO

O conceito de raça vem sendo amplamente discutido em diversos âmbitos sociais, inclusive sendo a causa de vários eventos históricos. No Brasil, a colonização das terras indígenas pelos europeus, que trouxeram os escravos africanos, tornou o país altamente miscigenado. Atualmente, através de recursos genéticos, pode-se investigar as origens das populações de uma sociedade com a utilização de marcadores de ancestralidade (AIMs), os quais estão amplamente distribuídos no genoma. As frequências alélicas destes marcadores conforme a localização geográfica do indivíduo e possibilitam a estimativa de uma taxa de ancestralidade tanto individual quanto populacional. Um dos tipos de marcadores de ancestralidade são os polimorfismos do tipo INDEL (inserção/ deleção), os quais estão sendo cada vez mais utilizados em estudos populacionais, forenses e de associação de caso-controle. Muitos painéis de AIMs já foram propostos. No presente trabalho, foi testada a eficiência de um painel de 46 marcadores de ancestralidade do tipo INDEL (46-AI-INDEL), em atribuir ancestralidade a populações ameríndias Guarani (n=44) e Kaingang (n=33) do centro-sul do Brasil, uma vez que tal painel foi desenvolvido com base em ameríndios da América Central e do norte do Brasil. As frequências alélicas dos 46 AIMs foram estimadas para as populações Guarani e Kaingang e comparadas com as populações de referência ancestrais africana (n=105), europeia (n=158) e ameríndia (n=64). As frequências alélicas de Guarani e Kaingang não diferiram estatisticamente das frequências dos demais ameríndios (Colombianos, Karitianos, Mayas, Surui, Pima), mas foram diferentes das populações de outros continentes, como a africana e europeia. Portanto, este conjunto de marcadores é eficiente em caracterizar populações ameríndias do centro-sul do Brasil, agrupando-as com os demais ameríndios do continente e diferenciando estas populações das de outros continentes. Tais resultados demonstram que o painel 46-AI-INDEL pode ser considerado suficiente para inferir proporções de ancestralidade individual e global de populações e indivíduos com mais de uma ancestralidade.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. INDELS. Ancestralidade. Ameríndios

ABSTRACT

The concept of race has been widely discussed in several social spheres, including being the cause of several historical events. In Brazil, the colonization of indigenous lands by the Europeans, who brought African slaves, made the country highly admixed. Currently, through genetic resources, one can investigate the origins of individuals in a society using ancestral markers (AIMs), which are widely distributed in the genome. These genetic markers vary their allelic frequencies according to the geographical location of the population and propose a rate of ancestry to both individual and population. One of the types of ancestral markers is the INDEL (insertion / deletion) polymorphisms, which are increasingly being used in population, forensic and case-control studies in the field of medical genetics. Many AIM panels have already been proposed. In the present work, the efficiency of a 46 INDEL-type ancestry markers panel (46-AI-INDEL) was tested to attribute ancestry to the Guarani (n = 44) and Kaingang (n = 33) Amerindian populations from south-central Brazil, since this panel was developed based on Amerindians from Central America and northern Brazil. The allelic frequencies of the 46 AIMs were estimated for the Guarani and Kaingang populations and compared with the allelic frequencies of African (n = 105), European (n = 158) and Amerindian (n = 64) ancestral populations as reference. The allelic frequencies of Guarani and Kaingang did not differ from the frequencies of the other Amerindians (Colombians, Karitians, Mayas, Surui, Pima), but they were different from the populations from other continents, such as African and European. Therefore, this set of markers is efficient in characterizing Amerindian populations of the center-south of Brazil, grouping them with the other Amerindians of the continent and differentiating these populations from those of other continents. These results demonstrate that the 46-AI-INDEL panel may be considered sufficient to infer proportions of individual and global ancestry of populations and individuals with more than one ancestry.

Key-words: Genetic polymorphism. AIMs. INDELs. Ancestry. Amerindians.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 MISCIGENAÇÃO	2
2.2 POPULAÇÕES INDÍGENAS NO BRASIL.....	3
2.3 POLIMORFISMOS BIALÉLICOS DO TIPO INDEL (INSERÇÃO/DELEÇÃO).....	4
2.4 MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIMS).....	5
3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	6
3.1 GERAL	6
3.2 ESPECÍFICOS	7
4. MATERIAL E MÉTODOS:	7
4.1 AMOSTRAS	7
4.4 PCR E ANÁLISE DOS MARCADORES	10
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	13
5.3. EQUILÍBRIO DE HARDY- WEINBERG	16
5.4. ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL.....	16
6. CONCLUSÕES.....	21
7. PARTICIPANTES	22
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	22
9. APÊNDICES	27

1. INTRODUÇÃO

Estudos genéticos têm cada vez ocupado mais espaço na comunidade científica e os frutos do seu estudo vêm beneficiando as áreas de Ciências Biológicas, Medicina e Antropologia. Atualmente, as informações que obtemos com o avanço do estudo de DNA não se restringem às áreas da saúde, mas podem vir a influenciar assuntos relacionados com o cotidiano da sociedade, como o conceito de raça e etnia, abordados em trabalhos de ancestralidade genética.

Existem muitos estudos diferentes que contribuem para compor o cenário global da heterogeneidade étnica em populações brasileiras. Esses estudos utilizam diferentes tipos de marcadores genéticos e estão focados na comparação de populações em diferentes níveis. Em alguns deles, cada região geográfica é tratada como uma única população homogênea, enquanto outros estudos criam diferentes subdivisões: políticas (por exemplo, agrupamento de populações por estado), demográficas (por exemplo, urbano e rural) ou étnica (por exemplo, cultura, autodeclaração ou cor da pele).

Considerando-se a subdivisão étnica entra em questão o conceito de raça, o qual vem sendo amplamente discutido nos últimos anos por ter um significado incerto tanto para a sociedade quanto para os estudos com marcadores moleculares de ancestralidade. O Brasil, para fins de estudos demográficos, utiliza-se da atual classificação racial do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), que se baseia apenas na autodeclaração. Ou seja, a pessoa questionada diz se considera-se branca, preta, parda, amarela ou indígena (Oliveira, 2004). Embora esses termos aparentemente refiram-se só à cor da pele, na verdade se relacionam a um complexo de pigmentação da pele, cor e textura do cabelo, cor dos olhos, forma do nariz e espessura dos lábios, que conjuntamente compõem o caráter “cor” (Pena, 2005). Tais características fenotípicas podem ser influenciadas por diversos fatores ambientais distintos fazendo-se necessário a análise do genótipo individual para resultados mais confiáveis (Parra *et al.*, 2002).

A investigação de perfis de ancestralidade genética em populações humanas é uma ferramenta valiosa para entender a dinâmica de migrações e eventos de colonização, bem como para determinar padrões de mistura dentro das populações (Manta *et al.*, 2013). Além disso, as estimativas de

ancestralidade desempenham um papel importante na correção de efeitos de estratificação populacional em estudos de associação caso-controle (Zembruski *et al.*, 2006), particularmente em estudos realizados em populações miscigenadas em que associações espúrias de genótipo-fenótipo podem aparecer devido a diferenças na frequências alélicas de grupos parentais que contribuem diferencialmente em amostras de casos e controles. Para se evitar a interpretação errada dos resultados da associação, estimativas da ancestralidade individual podem ser consideradas ao se realizar as análises estatísticas. Ainda, torna-se possível fazer uma pré-seleção para parear controles e casos.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) da Universidade Federal do Paraná há décadas realiza estudos de genética de populações e de associação caso-controle. Portanto, inferir a ancestralidade genética com base em marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) nas populações de estudo é uma ferramenta imprescindível para o refinamento de tais estudos. Sendo assim, o presente projeto destina-se a usar um painel composto de 46 marcadores e verificar se este é eficaz em discriminar populações ameríndias Kaingang e Guarani do centro-sul do Brasil de populações de outras ancestralidades.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MISCIGENAÇÃO

A população brasileira é uma das mais heterogêneas no mundo. Estima-se que antes da chegada dos colonizadores, havia por volta de 2,5 milhões de nativos vivendo em território brasileiro (Cunha, 1995). A investigação de ancestralidade genética e o perfil das populações humanas são uma ferramenta valiosa para entender a dinâmica das migrações e eventos de colonização, assim como para determinar misturas de padrões dentro das populações (Manta *et al.*, 2013). A diversidade das populações humanas é favorecida pela geografia, ou seja, como as barreiras geográficas impostas limitavam a comunicação e relacionamento entre diferentes grupos, à medida que se distanciavam (Buchard *et al.*, 2003). O processo de deriva genética entre

as inúmeras populações, teve início com as migrações para fora da África, que resultaram nas diferentes frequências alélicas nas populações existentes atualmente (Daya *et al.*, 2013).

Devido às políticas de ocupação de um vasto território, o processo de mistura aconteceu de diferentes modos e em diferentes regiões do Brasil. No Nordeste do Brasil, a contribuição de africanos é alta e a de ameríndios é baixa; no Norte, a contribuição de ameríndios é a alta enquanto que no Sul, a influência dos ameríndios e dos africanos é reduzida em comparação com as das outras regiões (Salzano e Bortolini, 2002; Santos e Guerreiro, 1995). Visto isso, os grupos étnicos são, provavelmente, um produto de isolamento reprodutivo e da endogamia (Buchard *et al.*, 2003). Os cromossomos de populações miscigenadas podem ser vistos como mosaicos de DNA de diversas populações ancestrais, devido aos mecanismos de recombinação gênica (Silva *et al.*, 2010).

2.2 POPULAÇÕES INDÍGENAS NO BRASIL

Atualmente no Brasil, encontramos 254 povos indígenas, somando 896.917 pessoas segundo o Censo IBGE 2010, que se dividem em 324.834 vivendo em cidades e 572.083 em áreas rurais. A maior parte dos indígenas reside em aldeias, localizadas em 708 Terras Indígenas ao longo de todo território nacional (PIB, Instituto Socioambiental).

No início da colonização pelos europeus, estima-se que haviam cerca de mais de 1000 povos indígenas, somando entre 2 e 4 milhões de indivíduos (PIB, Instituto Socioambiental). Os primeiros colonizadores a chegar no Brasil foram homens portugueses, o que acarretou na miscigenação principalmente de homens europeus com mulheres ameríndias (Carvalho-Silva, 2001). Até o ano de 1808, a imigração do Brasil era composta quase completamente por portugueses, quando, com o exército de Napoleão, foram abertos os portos marítimos e iniciou-se a chegada de outras populações como espanhóis, alemães, sírios, libaneses e japoneses. Com isso, os brasileiros formam uma das populações mais heterogêneas existentes e é composta majoritariamente por Africanos, Europeus e Ameríndios (Carvalho-Silva, 2001).

2.3 POLIMORFISMOS BIALÉLICOS DO TIPO INDEL (INSERÇÃO/DELEÇÃO)

Desde a estimativa de que 99,7% do genoma humano é igual entre indivíduos, regiões que diferem nesses 0,3% precisam ser descobertas para singularizar cada indivíduo em um nível genético. No genoma humano há várias sequências de repetições de DNA espalhadas e destas, a maioria é localizada entre genes, e podem variar de tamanho de pessoa para pessoa sem impactar a saúde ou o modo de vida do indivíduo (Butler, 2012). Um tipo destes marcadores são os chamados “INDELs”, marcadores moleculares bialélicos que variam seu comprimento a partir de inserções/deleções de um ou mais nucleotídeos em uma sequência de DNA (Weber *et al.*, 2002).

Os INDELs podem ser polimórficos. Um marcador polimórfico é definido pela presença de mais de um alelo na população, nenhum dos quais com frequência superior a 99% (Cavalli-Sforza *et al.*, 1971). O polimorfismo exprime a ideia de “muitas formas” devido a sua etimologia do grego antigo, onde “*poli*” significa “muitos” e “*morphos*” significa “formas”. Atualmente, existem diferentes tipos de polimorfismos ou marcadores genéticos que são amplamente utilizados para estudos de genética médica, genética de populações, identificação humana e análises forenses (Martins, 2007).

Esse tipo de polimorfismo apresenta características interessantes como marcador genético, como por exemplo: i) INDELs são espalhados por todo genoma humano; derivam de um único evento (não apresentam homoplasia); ii) uma vez que as frequências alélicas de muitos INDELs são diferentes em populações separadas, estas podem ser utilizadas como marcadores informativos de ancestralidade (AIMs); iii) INDELs podem ser analisados utilizando-se de pequenos *amplicons*, que melhoram a amplificação de regiões degradadas de DNA e facilitam o processo *multiplex*; e iv) INDELs podem ser facilmente genotipados por uma simples abordagem eletroforética de marcação de fluoróforos (Santos *et al.*, 2010). Portanto, os INDELs combinam características dos SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) como analisar fragmentos curtos, com baixa taxa de mutação com a praticidade dos marcadores STRs (repetições curtas em série, do inglês, *short tandem repeats*) de realizar a genotipagem em uma única PCR seguida da detecção dos fragmentos amplificados por eletroforese capilar (Manta, 2013).

Podem ser utilizados em diversas áreas, porém, duas destacam-se: a genética forense e a genética de populações. Na área da genética forense, por se tratar de um conjunto de marcadores que podem oferecer estimativas de proporções de ancestralidade, tais marcadores podem ajudar a identificar a fonte do doador de uma determinada evidência, o que pode ajudar diretamente a investigação criminal (Amorim *et al.*, 2009).

O emprego de marcadores genéticos de evolução lenta, como os INDELS, em estudos populacionais diminui a probabilidade de mutação recorrente, mas gera uma menor diversidade de alelos, pois cada marcador apresenta apenas dois alelos (Pereira e Gusmão, 2011).

2.4 MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIMS)

Dentre as diversas possibilidades de aplicação dos INDELS, destaca-se o potencial destes serem marcadores informativos de ancestralidade (AIMs, do inglês, ancestry informative markers). AIMs são polimorfismos que exibem frequências substancialmente diferentes entre grupos populacionais separados geograficamente. Por exemplo, se um alelo ocorre com uma frequência de quase 100% em uma determinada população, mas ocorre muito raramente em outras populações, uma pessoa que tenha esse alelo é, portanto, mais propensa a ter ancestrais da primeira.

São, portanto, ferramentas úteis para os estudos de genética de populações, já que os alelos mais recentes apresentam uma distribuição geográfica restrita, enquanto que os alelos mais antigos já foram espalhados por meio dos movimentos migratórios e possuem uma frequência mais alta perto do local de seu surgimento (Santos, *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2012).

Sendo assim, um conjunto (painel) de muitos AIMs pode ser usado para estimar a proporção de ascendência de um indivíduo derivado de cada região geográfica. Os objetivos do desenvolvimento do painel de AIMs são: a habilidade de diferenciar populações; a habilidade de avaliar as subestruturas em diferentes populações; a habilidade de medir com precisão a proporção de ancestralidade individual e global em populações miscigenadas; a genotipagem fácil, rápida e econômica (Santos *et al.*, 2010).

O uso de AIMs demonstra que há uma grande diferença entre a ancestralidade real de uma pessoa e a ancestralidade relatada por ela (Parra

et.al, 2002). Um exemplo disso foi o estudo desenvolvido por Leite *et al.* (2011), que após relacionar os resultados da genotipagem com um painel de AIMs com os índices de melanina de cada indivíduo, relatou que em quase metade dos casos observados, os resultados obtidos eram diferentes dos relatados pelos indivíduos.

Um painel com 46 marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) do tipo INDEL (46-AI-INDELs), selecionado para medir eficientemente proporções de mistura de população de quatro origens diferentes (africano, europeu, leste asiático e nativos americanos) foi descrito por Pereira *et al.* (2012) e utilizado neste trabalho (APÊNDICE 1). Considerando-se os nativos americanos, os autores testaram o painel em tribos ameríndias do Amazonas. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar se o painel 46-AI-INDELs discrimina eficientemente tribos ameríndias do centro-sul do Brasil quando comparado a grupos populacionais de referência com ancestralidades africana, europeia e nativos americanos da América Central e da região norte do Brasil.

3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O estudo de AIMs é de grande interesse na pesquisa de genética clínica, particularmente para detectar e corrigir os efeitos da subestrutura populacional em estudos de associação caso-controle, mas também em estudos de genética populacional e forense. O painel 46-AI-INDELs (Pereira *et al.* 2012) foi projetado para discriminar quatro grandes grupos populacionais: africano, europeu, leste asiático e nativos americanos. Entretanto, dentre os nativos americanos não estiveram presentes ameríndios do centro-sul do Brasil. Portanto, os objetivos deste projeto são:

3.1 GERAL

Avaliar a eficácia de um painel de 46 marcadores do tipo INDEL informativo de ancestralidade em populações ameríndias Kaingang e Guarani.

3.2 ESPECÍFICOS

- i) Otimizar a genotipagem do painel 46-AI-INDEL.
- ii) Estimar as frequências alélicas do painel 46-AI-INDEL em populações ameríndias brasileiras Kaingang e Guarani.
- iii) Verificar o potencial do painel 46-AI-INDEL em ameríndios ao comparar com populações referência (AFR, EUR, NAM).
- iv) Averiguar a contribuição de ancestralidade de cada população estudada para compreender a constituição das populações ameríndias brasileiras.
- v) Através das frequências alélicas obtidas, alimentar o banco de dados em construção do LDD – RJ de amostras populacionais de diferentes regiões brasileiras como contribuição para estudos populacionais e forenses.
- vi) Contribuir com a inferência de ancestralidade de amostras para futuros estudos de associação caso-controle desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular Humana.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 AMOSTRAS

Foram selecionados para este estudo 77 indivíduos com a origem ameríndia, sendo estes Guaranis (n=44) e Kaingangs (n=33).

As amostras de Guarani Kaiowá são oriundas das aldeias Amambaí e Limão Verde, no município de Amambaí, no Mato Grosso do Sul (MS). As amostras de Guarani Nandeva foram coletadas em Amambaí e Porto Lindo (MS). Já as amostras de Guarani M'byá e de indígenas Kaingang são provenientes da reserva de Rio das Cobras, no município de Novas Laranjeiras, no estado do Paraná (PR), sendo algumas amostras Kaingang oriundas da reserva de Ivaí, no município de Manoel Ribas (PR) (Figura 1).

O DNA das amostras foi extraído a partir do sangue total, através dos métodos fenol-clorofórmio-álcool isoamílico ou *salting-out* e atualmente encontram-se armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Genética Molecular Humana da Universidade Federal do Paraná.

Figura 1: Mapa da América do Sul, evidenciando as localizações das reservas indígenas das tribos Guaranis e Kaingangs utilizadas neste estudo, onde 1 é Ivaí- PR (Kaingang de Ivaí), 2 Rio das Cobras- PR (Kaingang e Guaraní de Rio das Cobras), 3 Amambaí e Limão Verde- MS e 4 Porto Lindo- MS (Guaraní Ñandeva e Guaraní Kaiowá).



Fonte: Adaptado de Oliveira, 2008.

Segundo Utiyama (2000) em 1990, ano em que as amostras foram coletadas, a população de cada tribo era a seguinte: em Rio das Cobras, 1800 índios Kaingang e 400 Guaraní; e em Ivaí, 700 Kaingang. Os dados levantados durante o estudo demonstraram que, apesar do avançado estágio de aculturação, o grau de miscigenação com outros grupos étnicos ainda era baixo.

As amostras utilizadas no trabalho de Pereira *et al.*, (2012), consistem em dados de populações oriundas de três continentes distintos: i) africano, totalizando 105 indivíduos, com amostras provenientes do Quênia, Botswana, Namíbia, África do Sul, República da África Central, Congo, Senegal, Nigéria e Lesoto; ii) europeu, com 158 indivíduos provenientes da Escócia (Ilhas Órcades), Rússia, Rússia Cáucaso, França e Itália e iii) nativos americanos, contando com 64 indivíduos provenientes da Colômbia, México e Brasil, divididos em Colombianos (n=7), Ameríndios Karitiana (n=14), Ameríndios Surui (n=8), Ameríndios Mexicanos Mayas (n=21), Ameríndios Mexicanos de Pima (n=14).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sobre Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná e pelo CONEP (CAAE: 02727412.4.0000.0096).

4.2 QUANTIFICAÇÃO

Conforme Pereira *et al.*, (2012), a concentração ideal para a genotipagem do painel AIMs-INDEL *Multiplex* é de 0,5 ng/ μ L de DNA por amostra para ser amplificado. Para se estimar precisamente a quantidade de DNA, a concentração de cada amostra foi estimada a partir da PCR quantitativa em tempo real, utilizando o kit PowerQuant® System (Promega) (Tabela 1). O kit consiste em cinco fluoróforos com quatro alvos hidrolisados baseados em uma PCR quantitativa em multiplex, que amplifica várias cópias do alvo para quantificar o DNA humano e masculino presente na amostra (Promega, 2015). Para detecção destes alvos são utilizadas sondas hidrolisadas: FAM/BHQ®-1, para o alvo de 84 pares de base que identificará o valor total de DNA humano na amostra, Quasar®670/ BHQ®-2 detecta e amplifica porções longas (294pb) em alvos degradados, Cal Fluor® Gold 540/ BHQ®-1, que marca o cromossomo Y em duas multicópias diferentes para locos específicos do cromossomo Y (*amplicons* de 81pb e 136 pb), TMR/ BHQ®-2 para o controle interno de PCR (IPC) usado para amplificar e detectar um novo modelo de DNA (Ewing, 2016). O procedimento foi realizado no equipamento 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

Conforme o protocolo de utilização fornecido pela empresa do kit, a placa para realizar a quantificação leva 2 μ L de DNA em 18 μ L de *mix* de reação, que inclui *Master Mix*, *Primer/ Probe/ IPC Mix* e água já fornecidos pela Promega. O *software* tem diferentes classificações em relação à quantidade de DNA em cada amostra, para amostras com a concentração ideal, o *software* de análise classifica como *in range*, as nomeadas como *above target* indicam que possuem mais DNA do que o ideal, porém insuficiente para impossibilitar a amplificação ou requerer uma diluição. Valores indicados como *below target*, estão abaixo da concentração ideal, mas ainda possuem quantidade suficiente para a reação de PCR. As sinalizadas com *underconcentration* não atingiram a quantidade mínima aceitável de DNA e as nomeadas *no target*, não foi detectado DNA algum na amostra (Promega, 2015).

4.4 PCR E ANÁLISE DOS MARCADORES

O material foi submetido a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) juntamente com o *set-up* específico para os marcadores INDEL para amplificação, contando com 1 µL de *Primer 46* (10x), 1 µL de *Primer mix Reforço* (10x), 5 µL de *Qiagen Multiplex PCR Master Mix* (2x), 1 µL de *Taq Gold Applied Biosystems®*, 1 µL de H₂O e 1 µL do extrato de DNA. A ciclagem está representada na Figura 2. O produto amplificado foi submetido à genotipagem por eletroforese capilar, utilizando 24,5 µL de formamida e 0,5 µL de LIZ 500 por amostra, através do sequenciador *Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer* e analisado pelo *GeneMapper® IDX v.3.2* para avaliação da qualidade do perfil genético analisado.

Figura 2: Esquema de ciclagens no termociclador para realizar a PCR.

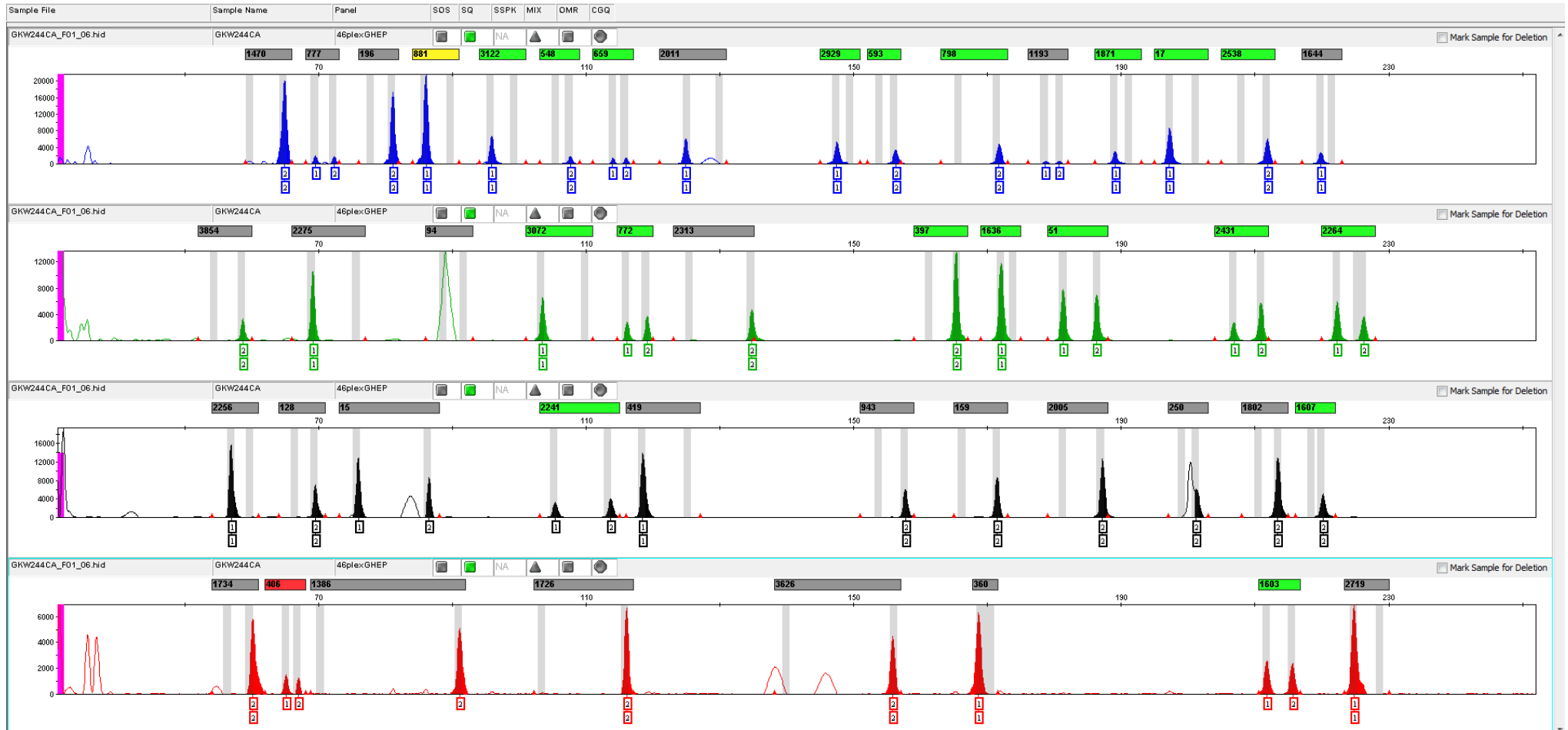
	30x *					
95 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
15 min	30 seg	90 seg	45 seg	60 min	∞	

Fonte: Protocolo AIMs INDEL *Multiplex* (Pereira *et al.*, 2011).

Na etapa de eletroforese, os locos são divididos por fluorescência, onde se apresentam em azul, verde, amarelo, e vermelho e cada cor representa um fragmento de onda que, dependendo da intensidade do espectro de luz emitida, determinará o tamanho do pico (Butler, 2012). Os fragmentos foram separados por tamanho, apresentando os alelos 1 e/ ou 2 em cada loco (Figura 3). O loco 94 apresentou um artefato de eletroforese em todas as amostras, razão pela qual este marcador foi desconsiderado da análise.

Para realizar a análise, foi utilizado o programa *GeneMapper® IDX v.3.2*, onde foi ajustado os padrões de tamanho e localização dos picos do eletroferograma conforme o controle 9947A, que correu junto com as amostras populacionais.

Figura 3 – Eletroferograma gerado pelo programa *GeneMapper*® IDX v.3.2 para uma das amostras deste estudo. Os 46 marcadores (locos) são mostrados nos retângulos enquanto que os picos representam os alelos. As cores refletem os quatro fluoróforos diferentes utilizados nas reações.



4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados resultou na caracterização das populações para os principais parâmetros de importância e utilização populacional. As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta através *software* GenAEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012), a partir das frequências genotípicas. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pela aplicação do teste de Guo e Thompson (1992). Os valores de P abaixo de 0,05 foram considerados significativos.

A comparação das frequências alélicas observadas neste estudo entre si e também com as demais descritas por Pereira *et al.* (2012), foram realizados por testes de qui-quadrado utilizando tabelas de contingência 2x2, comparando as frequências absolutas dos alelos 1 e 2 entre os pares de populações. Esta análise foi realizada através do site VassarStats (*American Library Association*), empregando a correção de Yates, quando aplicável, e considerando o limiar de significância de $P = 0,05$.

A análise de variância molecular (AMOVA) e os cálculos de F_{ST} foram realizados utilizando o pacote de programas ARLEQUIN v. 3.5.2.2 (Excoffier e Lischer, 2010).

Análises das proporções individuais e globais de ancestralidade pela inferência do número do grupo de indivíduos (K) geneticamente relacionados na amostra foram feitas utilizando o *software* STRUCTURE v.2.2 (Falush *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 2000). Para tanto se utilizou o modelo que assume que há miscigenação entre as populações (*admixture model*) e o modelo que assume frequências alélicas independentes entre as diferentes populações. Não foram incluídas quaisquer informações sobre a população de origem dos indivíduos. Os outros parâmetros utilizados foram: 100.000 *burn-ins*, seguidos por 100.000 repetições da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), testando valores de K entre 1 e 12, com cinco corridas para cada valor de K . Para inferir a ancestralidade individual e global no *software* Structure, foi utilizado como padrão de referência, o genótipo dos parentais já genotipados pelo painel de diversidade HGDP-CEPH (Centro de Estudos de Polimorfismos Humanos), conforme Pereira *et al.*, (2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

As frequências alélicas estimadas para as populações ameríndias Guarani (n=44) e Kaingang (n=33) estão descritas na Tabela 1. As frequências alélicas de populações de referência Africana (n=105), Européia (n=158), Ameríndios Colombianos (n=7), Ameríndios Karitiana (n=14), Ameríndios Surui (n=8), Ameríndios Mexicanos Mayas (n=21), Ameríndios Mexicanos de Pima (n=14), juntamente com as populações de Guarani e Kaingang são mostradas na Tabela 2.

As frequências alélicas foram comparadas através de qui quadrado e os resultados também são mostrados nas Tabelas 1 e 2. As populações Guarani e Kaingang apresentaram valores de P significativos ($P < 0,05$) para 11 locos (24%).

Tabela 1: Estimativa e comparação das frequências do alelo 1 para os 46 marcadores que compõem o painel 46-AI-INDEL entre as populações Guarani (GUA) $n = 44$ e Kaingang $n = 33$ (KAI). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e estão em vermelho..

Loco	Alelo	GUA	KAI	P
1470	1	0,023	0,029	0,596
777	1	0,762	0,853	0,115
196	1	0,071	0,088	0,464
881	1	1,000	0,971	0,193
3122	1	1,000	0,985	0,441
548	1	0,151	0,015	0,002
659	1	0,279	0,353	0,209
2011	1	0,919	0,939	0,435
2929	1	0,977	0,985	0,587
593	1	0,000	0,000	1
798	1	0,140	0,059	0,084
1193	1	0,326	0,074	0
1871	1	0,512	0,441	0,24
17	1	0,802	0,985	0
2538	1	0,012	0,000	0,387
1644	1	0,465	0,500	0,396
3854	1	0,023	0,000	0,31
2275	1	0,430	0,397	0,401
94	1	*	*	*
3072	1	0,977	0,985	0,587
772	1	0,605	0,706	0,127
2313	1	0,698	0,750	0,296
397	1	0,198	0,529	0
1636	1	0,965	0,971	0,61
51	1	0,860	0,853	0,536
2431	1	0,384	0,397	0,498
2264	1	0,105	0,250	0,016
2256	1	0,907	0,824	0,099
128	1	0,140	0,147	0,536
15	1	0,791	0,897	0,058
2241	1	0,105	0,091	0,501
419	1	0,500	0,441	0,286
943	1	0,558	0,368	0,014
159	1	0,640	0,765	0,066
2005	1	0,221	0,088	0,021
250	1	0,535	0,412	0,087
1802	1	0,012	0,000	0,558
1607	1	0,465	0,750	0
1734	1	0,581	0,735	0,033
406	1	0,709	0,735	0,431
1386	1	0,583	0,426	0,038
1726	1	0,779	0,838	0,238
3626	1	0,058	0,015	0,178
360	1	0,686	0,691	0,543
1603	1	0,860	0,735	0,04
2719	1	0,826	0,426	2

Legenda: GUA=Guarani; KAI=Kaingang. “*” não foi possível genotipar.

Tabela 2: Frequências do alelo 1 para as populações analisadas neste trabalho: africana, europeia e ameríndios.

Loco	Alelo	AFR	EUR	COL	KAR	SURUI	MAYA	PIMA	GUA	KAI
1470	1	0,162	0,563	0,071	0,000	0,063	0,024	0,036	0,023	0,029
777	1	0,390	0,288	0,714	0,964	1,000	0,714	0,893	0,762	0,853
196	1	0,538	0,472	0,071	0,000	0,000	0,167	0,000	0,071	0,088
881	1	0,324	0,880	1,000	1,000	1,000	0,976	1,000	1,000	0,971
3122	1	0,552	0,991	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,985
548	1	0,338	0,196	0,429	0,000	0,250	0,214	0,107	0,151	0,015
659	1	0,276	0,104	0,071	0,214	0,250	0,262	0,393	0,279	0,353
2011	1	0,162	0,791	0,786	1,000	0,688	0,905	1,000	0,919	0,939
2929	1	0,790	0,655	1,000	1,000	1,000	0,929	1,000	0,977	0,985
593	1	0,695	0,006	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000
798	1	0,295	0,642	0,143	0,000	0,125	0,167	0,143	0,140	0,059
1193	1	0,178	0,098	0,143	0,000	0,313	0,143	0,179	0,326	0,074
1871	1	0,081	0,326	0,286	0,393	0,063	0,190	0,464	0,512	0,441
17	1	0,795	0,338	0,786	1,000	1,000	0,810	0,929	0,802	0,985
2538	1	0,000	0,494	0,071	0,000	0,000	0,119	0,071	0,012	0,000
1644	1	0,229	0,953	0,286	0,000	0,063	0,286	0,286	0,465	0,500
3854	1	0,748	0,013	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,023	0,000
2275	1	0,486	0,095	0,143	0,607	0,438	0,643	0,500	0,430	0,397
94	1	0,071	0,155	0,643	0,464	0,500	0,690	0,857	*	*
3072	1	0,100	0,940	1,000	1,000	1,000	0,929	1,000	0,977	0,985
772	1	0,943	0,968	0,929	1,000	0,875	0,595	0,714	0,605	0,706
2313	1	0,110	0,247	0,929	0,786	0,563	0,643	0,808	0,698	0,750
397	1	0,771	0,766	0,286	0,071	0,125	0,500	0,536	0,198	0,529
1636	1	0,148	0,785	0,929	1,000	1,000	1,000	1,000	0,965	0,971
51	1	0,057	0,642	0,929	0,929	0,875	0,810	0,857	0,860	0,853
2431	1	0,052	0,111	0,214	0,286	0,000	0,238	0,321	0,384	0,397
2264	1	0,162	0,465	0,214	0,071	0,000	0,190	0,143	0,105	0,250
2256	1	0,000	0,222	0,857	0,857	0,500	0,905	0,893	0,907	0,824
128	1	0,024	0,481	0,071	0,000	0,000	0,071	0,071	0,140	0,147
15	1	0,195	0,453	0,857	0,929	0,875	0,810	0,750	0,791	0,897
2241	1	0,814	0,293	0,000	0,000	0,000	0,071	0,214	0,105	0,091
419	1	0,919	0,810	0,857	0,357	0,750	0,643	0,393	0,500	0,441
943	1	0,176	0,791	0,429	0,429	0,500	0,405	0,286	0,558	0,368
159	1	0,752	0,570	0,643	0,857	0,750	0,738	0,643	0,640	0,765
2005	1	0,029	0,671	0,500	0,286	0,000	0,405	0,346	0,221	0,088
250	1	0,824	0,715	0,071	0,500	0,063	0,357	0,393	0,535	0,412
1802	1	0,543	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000
1607	1	0,424	0,161	0,500	0,500	0,625	0,476	0,714	0,465	0,750
1734	1	0,852	0,835	0,429	0,071	0,250	0,571	0,429	0,581	0,735
406	1	0,048	0,823	0,500	0,929	0,625	0,548	0,857	0,709	0,735
1386	1	0,138	0,218	0,786	0,786	1,000	0,643	0,786	0,583	0,426
1726	1	0,176	0,700	0,929	0,964	0,875	0,786	0,357	0,779	0,838
3626	1	0,124	0,699	0,000	0,000	0,000	0,119	0,000	0,058	0,015
360	1	0,591	0,864	0,714	0,500	0,938	0,429	0,357	0,686	0,691
1603	1	0,081	0,389	0,929	0,750	0,875	0,786	0,857	0,860	0,735
2719	1	0,448	0,345	0,357	0,357	0,313	0,595	0,536	0,826	0,426

Legenda: AFR (africanos), EUR (europeus), COL (ameríndios Colombianos), KAR (Karitianas), SUR (Surui), MAY (Maya), PIMA (Pima), GUA (Guarani) e KAI (Kaingang).

“*” não foi possível genotipar.

5.3. EQUILÍBRIO DE HARDY- WEINBERG

Todos os locos analisados para ambas as populações de Guarani e Kaingang se encontram em equilíbrio de Hardy- Weinberg, conferindo uma alta confiabilidade da genotipagem e um tamanho amostral adequado, conforme consta em Apêndice 3 e em Apêndice 4.

5.4. ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL

Em 1921, Wright definiu índice de fixação para quantificar o efeito de endocruzamento das subdivisões populacionais. O índice de fixação F_{st} , compara todos os níveis da população e mede os efeitos da estrutura populacional combinada, nos permitindo visualizar a semelhança entre indivíduos (Hartl, 2010). A análise de variância molecular (AMOVA), estima a variação de componentes na estrutura de uma população, podendo mensurar a distribuição de variabilidade genética e utilizamos 999 permutações (Excoffier *et al.*, 1992). A estimativa de diferenciação genética entre as populações Africanas, Européias e ameríndias Colombiana, Karitiana, de Surui, Maya, de Pima, Guarani e Kaingag estão representadas na Tabela 4, com os valores de F_{st} . Os valores de F_{st} variam de 0 a 1, em que zero indica que não há estruturação populacional, ou seja, não há diferenciação genética significativa entre as populações analisadas. O valor igual a 1 implica que as populações comparadas são completamente diferentes e a variação genética observada é decorrente da estruturação populacional, refletindo a ausência de fluxo gênico entre as populações. Embora não haja um consenso entre os valores de F_{ST} que representem uma alta diferenciação genética, para WRIGHT (1978) valores entre 0 e 0,05, entre 0,05 e 0,15 e superiores a 0,15 indicam baixa, média e alta diferenciação genética, respectivamente. Todos os valores de F_{st} deste trabalho, apresentaram significância estatística ($p < 0,05$). Pode-se verificar que as populações africana e europeia em comparação com todas as demais, apresentam valores de F_{st} superiores a 0,15, o que indica uma alta diferenciação genética, enquanto que, entre as populações ameríndias, não teve nenhum valor superior a 0,15, sugerindo uma diferenciação baixa ou média nos indivíduos dessas populações.

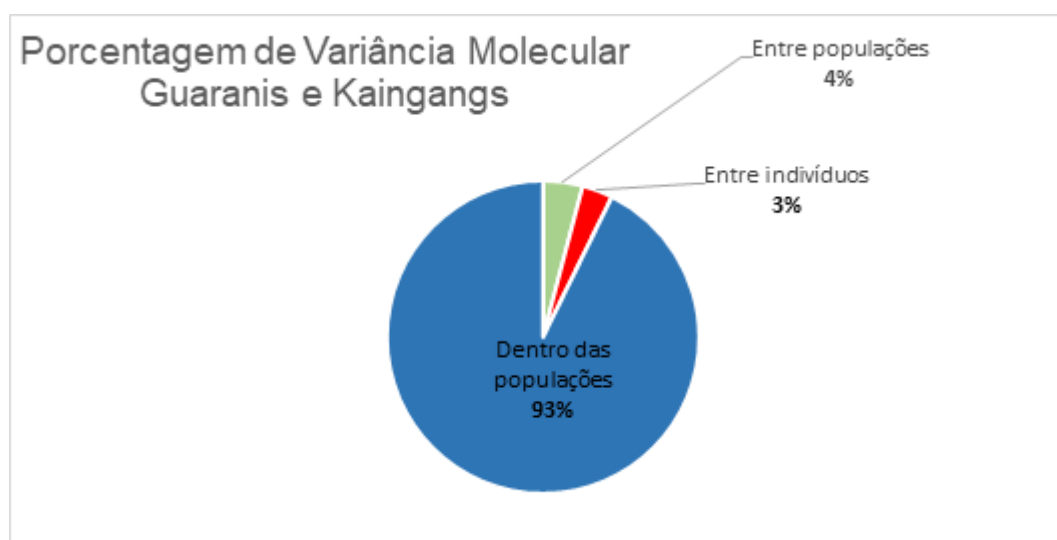
Tabela 4: Distâncias genéticas (Fst) entre as populações africana, europeia e ameríndios.

População	AFR	EUR	COL	KAR	SURUI	MAYA	PIMA	GUA	KAI
AFR	0								
EUR	0,36846	0							
COL	0,44492	0,26295	0						
KAR	0,49451	0,35568	0,12328	0					
SURUI	0,44649	0,33051	0,0561	0,12415	0				
MAYA	0,40247	0,24805	0,02966	0,08974	0,08974	0			
PIMA	0,44063	0,30065	0,0828	0,08652	0,13267	0,02938	0		
GUA	0,43628	0,26559	0,06304	0,09561	0,11255	0,03117	0,04762	0	
KAI	0,43229	0,27272	0,08241	0,10709	0,12817	0,04477	0,04685	0,04182	0

Legenda: AFR (africanos), EUR (europeus), COL (ameríndios Colombianos), KAR (Karitianas), SUR (Surui), MAY (Maya), PIMA (Pima), GUA (Guarani) e KAI (Kaingang).

A análise de variância molecular (AMOVA) das amostras de Guarani e Kaingang (Figura 3) mostra que a maior parte da variação genética ocorre dentro das populações (93%), enquanto que apenas 4% ocorre entre os grupos Guarani e Kaingang.

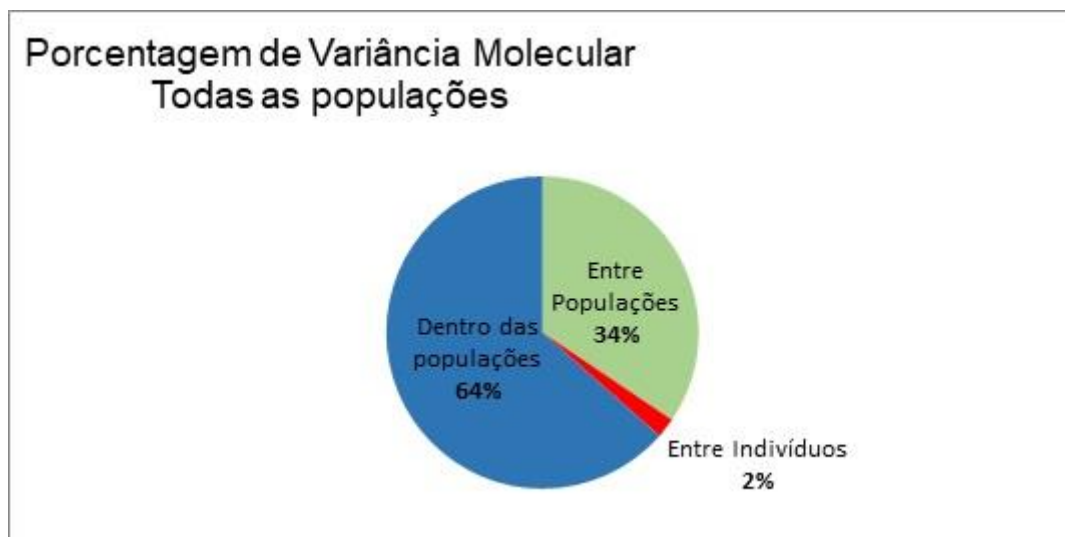
Figura 3: Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações Guarani e Kaingang, mostrando as porcentagens de diferenças moleculares entre as populações, entre os indivíduos e dentro das populações. Neste gráfico observamos que a maior diferença está entre os indivíduos dentro das populações separadas (93%), enquanto que a diferença entre as duas populações é de 4%.



Fonte: A autora (2017).

A AMOVA também foi realizada com todas as demais populações (Figura 4). Pode ser observado que embora a maior parte da variação genética ocorra dentro das populações (64%), a variação que ocorre entre elas é alta (34%). Já a diferença interindividual é baixa (2%).

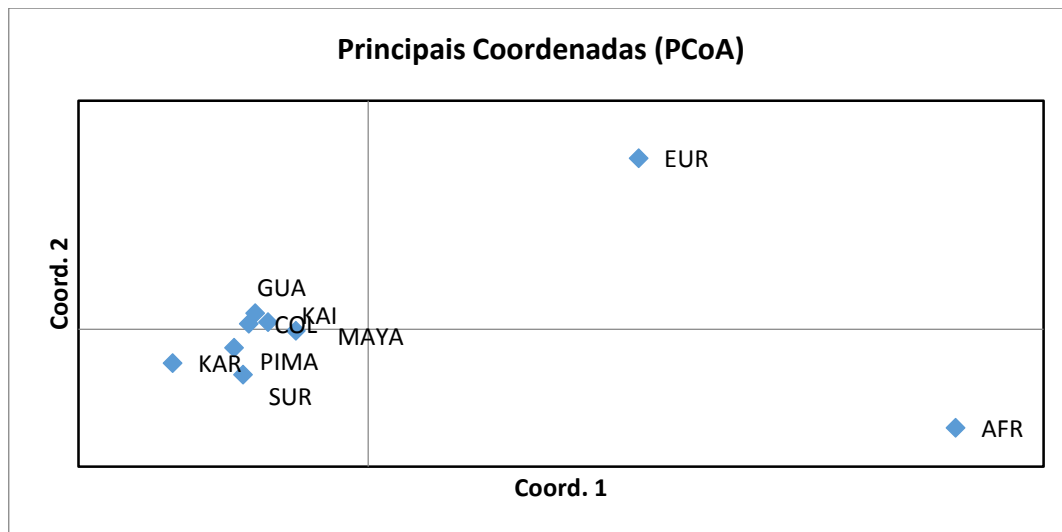
Figura 4: AMOVA para as populações de Africanos, Europeus, Ameríndios, Guaranis e Kaingang, mostrando as porcentagens de diferenças entre populações, entre indivíduos e dentro das populações. Comparando todas as populações, obtivemos uma diferença significativa entre elas de 34%, mas a diferença majoritária continua sendo entre os indivíduos dentro das populações, com 64% de diferenciação genética.



Fonte: A autora (2017).

A análise de coordenadas principais (PCoA) é um método que nos permite visualizar as relações entre os componentes analisados, neste caso, entre as populações de diferentes origens (Dray, 2006). A partir dele, podemos observar em dois eixos, a discrepância nas populações Africana e Europeia, distantes entre si e das ameríndias, e uma aproximação de todas as populações nativo americanas. Tal resultado permite-nos concluir que o painel 46-AI-INDEL é capaz de diferenciar os grandes grupos populacionais de acordo com suas populações ancestrais e distância geográfica e agrupa os ameríndios do centro-sul do Brasil com os demais ameríndios analisados (Figura 5).

Figura 5: Análise das coordenadas principais (PCoA) para todas as populações analisadas neste trabalho. Nesta análise podemos observar o agrupamento de todas as populações ameríndias, incluindo as ameríndias do Centro-Sul do Brasil, enquanto há uma diferenciação entre os três grupos continentais.



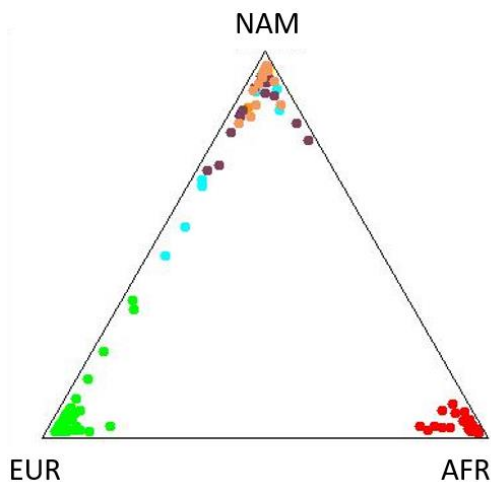
Legenda: AFR (africanos), EUR (europeus), COL (ameríndios Colombianos), KAR (Karitianas), SUR (Surui), MAYA (Maya), PIMA (Pima), GUA (Guarani) e KAI (Kaingang).

Fonte: A autora (2017).

O *software Structure* foi usado para buscar por subpopulações de indivíduos geneticamente similares. O maior valor de delta K (delta K = 783.633.801) foi para K = 3. Tal resultado indica que este seria o número de agrupamentos (*clusters*) que melhor se ajusta ao conjunto de dados genéticos em estudo. A análise de estruturação populacional corrobora a eficiência do painel utilizado em agrupar as populações ameríndias e diferenciá-las das de outros continentes (Figura 6).

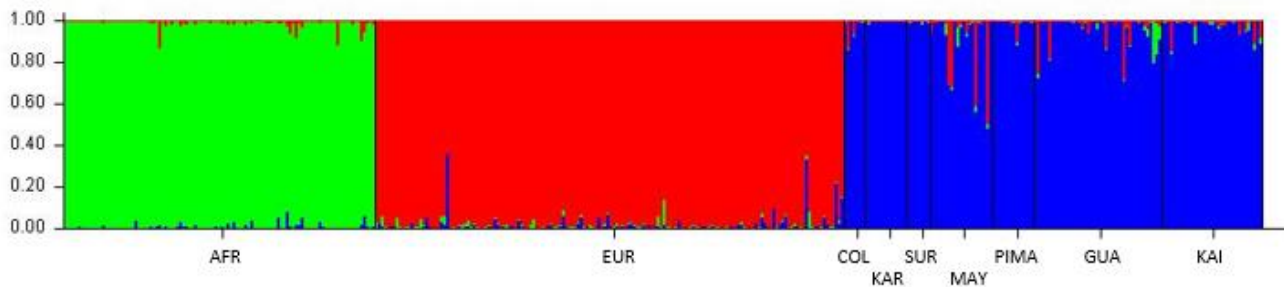
As proporções de ancestralidade estimadas para cada indivíduo dos três agrupamentos (africanos, europeus e ameríndios) são mostradas na Figura 7. No gráfico (*bar plot*) cada indivíduo é representado por uma linha vertical composta por até três cores (verde, vermelho e azul). As cores indicam às proporções de ancestralidade (africana, europeia e ameríndia) de cada indivíduo e dos agrupamentos em geral. Pode-se observar uma miscigenação significativa de europeus com ameríndios, tanto nos utilizados como referência quanto os ameríndios Guarani e Kaingang. Isso era esperado a partir do que se sabe sobre a colonização e contato dos ameríndios com os colonizadores europeus, no início doséculo 16.

Figura 6: Representação esquemática por *Triangle plot* do *software Structure*, onde em vermelho são africanos (AFR), em verde europeus (EUR) e no pico superior, os nativos americanos (NAM). O agrupamento entre todos os ameríndios indica o êxito da utilização deste painel de 46 marcadores informativos de ancestralidade para os ameríndios do Centro-Sul do Brasil.



Fonte: A autora (2017).

Figura 7: *Bar plot* representando as proporções de ancestralidade estimadas para os indivíduos e para as populações africana, europeia e ameríndias, considerando $K = 3$. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical com três cores (verde, vermelho e azul), em que a proporção de cada cor está relacionada às proporções de ancestralidade de cada um dos grupos populacionais inferidos.



Legenda: AFR (africanos), EUR (europeus), COL (ameríndios Colombianos), KAR (Karitianas), SUR (Surui), MAY (Maya), PIMA (Pima), GUA (Guarani) e KAI (Kaingang).

Fonte: A autora (2017).

6. CONCLUSÕES

A partir de todas as análises e testes estatísticos pode-se verificar que as populações de diferentes continentes (África, Europa e Nativos Americanos) são eficientemente diferenciadas pelo painel de marcadores utilizados neste trabalho.

O painel de marcadores 46-AI-INDEL desenvolvido por Pereira *et al.* (2012), foi ideal para as análises propostas de ancestralidade incluindo as populações ameríndias brasileiras com as demais ameríndias e diferenciando estas das de outros continentes.

Considerando-se a otimização do painel 46-AI-INDEL, apenas para o loco 94 foram evidenciados problemas de genotipagem. Um artefato de eletroforese que se apresentou em todas as amostras do *bin* do alelo 1, impossibilitou a análise do loco.

Apesar de alguns locos mostrarem diferenças de frequências alélicas entre os ameríndios, estes poucos não foram suficientes para separar as populações ameríndias nos testes de diferenciação populacional (F_{st}).

As frequências genotípicas para todos os locos analisados para as populações Kaingang e Guarani estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Tal resultado demonstra que a genotipagem foi confiável.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que as maiores diferenças estão dentro das populações. A comparação entre Guaranis e Kaingangs apresentou uma variação genética baixa (4%), visto que há uma proximidade maior em questão de sua evolução. Já comparações com populações mais distantes, a variação genética entre populações foi alta (34%), atingindo o objetivo da utilização desse painel.

Observa-se uma alta diferenciação genética entre todas as populações principais (AFR, EUR, NAM), sendo que os africanos apresentaram o maior grau de diferenciação quando comparados com as demais populações e, também com alta diferenciação, os europeus apresentaram valores de F_{st} superiores a 0,15. Entre as populações ameríndias, os valores de F_{st} se apresentaram entre 0 e 0,13, indicando uma baixa ou média diferenciação genética.

Como próximos objetivos, pretendemos aumentar o número de indivíduos de origens ameríndias, europeus e africanos e ainda ampliar a gama de indivíduos, incluindo também asiáticos.

7. PARTICIPANTES

Este projeto envolveu colaboração de pesquisadores do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, através da Prof. Dra. Danielle Malheiros Ferreira como orientadora e a Prof. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler como colaboradora e dos peritos criminais, Dra. Marianna Maia Taulois do Rosário e Dr. Marcelo Malaghini do Laboratório de Genética Molecular Forense do Instituto de Criminalística do Paraná.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMORIM CEG, FALCÃO-ALENCAR G, GODINHO NMO, DINIZ MECG, GONTIJO CC *ET AL.*, (2009) **Forensic application of an individual ancestry index in Brazilian populations**. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2: 479-480.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. 2ª ed. Ribeirão Preto: Editora SBG, p.95 e 179-180, 1995.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. Academic Press, 2005.

CARVALHO-SILVA, D. R, SANTOS, F. R., ROCHA J., PENA S. D. J., **The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages**, *Am. J. Hum. Genet.* 68:281–286, 2001.

DAYA, M., VAN DER MERWE, L., GALAL, U., MÖLLER, M., SALIE, M., CHIMUSA, E. R., HOAL, E. **A panel of ancestry informative markers for the complex five-way admixed South African Coloured population**. *PloS one*, 8(12), e82224. 2013.

DRAY, S., LEGENDRE, P., PERES-NETO, P. R., **Spatial modelling: a comprehensive framework for principal coordinate analysis of neighbour matrices (PCNM)**, ELSEVIER, Volume 196, Issues 3–4, 25 July 2006, Pages 483-493, 2006.

EWING, M. M., THOMPSON, J. M., MCLAREN, R. S., PURPERO, V. M., THOMAS, K. J., DOBROWSKI, P. A., DEGROOT, G. A., ROMSOS, E. L.,

STORTS, D. R. **Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant® system.** Forensic Science International: Genetics 23 166-177, 2016.

EXCOFFIER, L., LISCHER, H. E. L. **Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** Molecular Ecology Resources. v. 10, p. 564-567, 2010.

FBI – FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION. **PCR-based typing protocols FBI Laboratory.** Albuquerque: FBI, 1999.

FRANCEZ, P. **Variabilidade Genética nos sistemas STR autossômico, Y-STR e INDEL na população do Macapá: Aspectos populacionais e forenses.** Tese de doutorado em genética. Universidade Federal do Pará, 2011.

GALANTER, J. M., FERNANDEZ-LOPEZ, J. C., GIGNOUX, C. R., BARNHOLTZ-SLOAN, J., FERNANDEZ-ROZADILLA, C., VIA, M.; JIMENEZSANCHEZ, G. **Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas.** PLoS Genet, 8(3), e1002554. 2012.

GUO, S. W., THOMPSON, E. A., **Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.** Biometrics. Jun;48(2):361-72, 1992.

HARTL, D. L., CLARK, A. G., **Princípios de genética de populações.** Artmed, 4 ed., Porto Alegre, 2010.

JEFFREYS, A. J; WILSON, V; THEIN S. L; **Hypervariable ‘minisattelite’ regions in human DNA.** Nature, 1985a; 314:67-73, 1985.

JOBLING, M. A; HURLES, M. E; TYLER-SMITH, C. **Human Evolutionary Genetics: Origins, Peoples and Disease.** New York, Garland Science. 2004.

KAYSER, M.; DE KNIJFF, P. **Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology.** Nat Rev Genet, v. 12, n. 3, p. 179-92, 2011.

KRUGLYA, L.; NICKERSON, D. **Variation in the spice of life.** Nature genetics, v.27, p.234-236, 2001.

LANDER, E. S; LINTON, L. M; BIRREN, B; NUSBAUM, C; ZODY, M. C; BALDWIN J *et al.*. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** Nature, 409: 860-921, 2001.

LEITE, T. K., FONSECA, R. M., DE FRANÇA, N. M., PARRA, E. J.; PEREIRA, R. W. **Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings.** PLoS One, 6(11), e 27162. 2011.

MANTA, F. S. N; **Marcadores Inserção/ Deleção (INDEL): estudo da ancestralidade e identificação humana na população brasileira.** 2013.

MANTA, F. S. N; PEREIRA, R; VIANNA, R; DE ARAÚJO, A. R. B; GITAÍ, D. L. G; DA SILVA, D. A; WOLFGRAMM, E. V; PONTES, I. M; AGUIAR, J. I; MORAES, M. O; DE CARVALHO, E. F; GUSMÃO, L; **Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels.** PLoS One, 8(9), e75145. 2013.

MARTINS, A. M; **Análise Genético-Histórica de Haplótipos do Cromossomo Y Humano no Nordeste Brasileiro.** Tese de mestrado em genética – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 190p. 2007.

OLIVEIRA, F. **Ser negro no Brasil, alcances e limites.** 2004.

OLIVEIRA, L. A., RIBAS, F., BICALHO, M. G., TSUNETO, L. T., PETZL-ERLER, M. L. **High frequencies of alleles MICA*020 and MICA*027 in Amerindians and evidence of positive selection on exon 3.** Nature, Genes and Immunity (2008) 9, 697–705, 2008.

PARRA, F. C., AMADO, R. C., LAMBERTUCCI, J. R., ROCHA, J., ANTUNES, C. M., PENA, S. D. **Color and genomic ancestry in Brazilians**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(1), 177-182. 2003.

PEAKALL, R.; SMOUSE P. E. **GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update**. Bioinformatics, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PENA, S. D., **Reasons for banishing the concept of race from Brazilian medicine**. Hist Cienc Saude Manguinhos 12(2):321-346 2005.

PEREIRA, R., PHILLIPS, C., PINTO, N., SANTOS, C., DOS SANTOS, S. E. B., AMORIM, A.; GUSMÃO, L. **Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing**. PLoS One, 7(1), e29684. 2012.

PETZL-ERLER, M. L.; LUZ, R.; SOTOMAIOR, V. S. **The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: The Kaingang and the Guarani**. Tissue Antigens, Copenhagen, v. 41, p. 227-237, 1993.

POVOS INDÍGENAS NO BRASIL (PIB); INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. Disponível em: <<https://pib.socioambiental.org/pt>>. Acesso em 16 de novembro de 2017.

PROMEGA, **PowerQuant™ System Technical Manual**, 2015.

SANCHEZ, J. J; PHILLIPS, C; BORSTING, C; BALOGH, K; BOGUS, M; FONDEVILLA, M *et al.*. **A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification**. Eletrophoresis. 2006

SANTOS, N. P. C., RIBEIRO-RODRIGUES E. M., RIBEIRO-DOS-SANTOS A. K. C., PEREIRA R., GUSMÃO L., AMORIM A, GUERREIRO J, ZAGO M, MATTE C, HUTZ M. H., SANTOS S. E. B. **Assessing Individual Interethnic**

Admixture and Population Substructure Using a 48-InsertionDeletion (INDEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) Panel. Human Mutation 31: 184-190. 2009.

UTIYAMA, S. R., GUARDIANO J., PETZL-ERLER M.L., MOCELIM V., DE MESSIAS-REASON, I.J. **Autoantibody profile among Kaingang and Guarani tribe Indians in Southern Brazil**, Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health [01 Jun 2000], 7(6):371-376].2000.

VassarStats: **Statistical Computation Web Site. American Library Association**, Disponível em <<http://vassarstats.net/>>. Acesso em 27 nov. 2017.

ZEMBRZUSKI VM, CALLEGARI-JACQUES SM, HUTZ MH. **Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. Ann Hum Genet 70: 822-828. 2006**

WEBER J. L., DAVID D., HEIL J., FAN Y., ZHAO C., MARTH G. **Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. Am J Hum Genet, 71: 854- 62. 2002.**

9. APÊNDICES

Apêndice 1 - Paineis de marcadores INDEL que foram utilizados neste trabalho

MID*	rs number	Chromosome	Position (bp)**	Alleles described in dbSNP
MID-1470	rs2307666	11	64729920	-/GTTAC
MID-777	rs1610863	16	6551830	-/GAA
MID-196	rs16635	6	99789775	-/CAT
MID-881	rs1610965	5	79746093	-/ACTT
MID-3122	rs35451359	18	45110983	-/ATCT
MID-548	rs140837	6	3708909	-/CT
MID-659	rs1160893	2	224794577	-/CT
MID-2011	rs2308203	2	109401291	-/CTAGA
MID-2929	rs33974167	8	87813725	-/TA
MID-593	rs1160852	6	137345857	-/TT
MID-798	rs1610884	5	56122323	-/GGGAAA
MID-1193	rs2067280	5	89818959	-/AT
MID-1871	rs2308067	7	127291541	-/TT
MID-17	rs4183	3	3192524	-/TAAC
MID-2538	rs3054057	15	86010538	-/AACA
MID-1644	rs2307840	1	36099090	-/GT
MID-3854	rs60612424	6	84017514	-/TCTA
MID-2275	rs3033053	14	42554496	-/TCAGCAG
MID-94	rs16384	22	42045009	-/AAC
MID-3072	rs34611875	18	67623917	-/GCCCCCA
MID-772	rs1610859	5	128317275	-/TAG
MID-2313	rs3045215	1	234740917	-/ATTATAACT
MID-397	rs25621	6	139858158	-/TTCT
MID-1636	rs2307832	1	55590789	-/AA
MID-51	rs16343	4	17635560	-/TTTAT
MID-2431	rs3031979	8	73501951	-/ATTG
MID-2264	rs34122827	13	63778778	-/AAGT
MID-2256	rs133052	22	41042364	-/CAT
MID-128	rs6490	12	108127168	-/ATT
MID-15	rs4181	2	42577803	-/AAATACACAC
MID-2241	rs3030826	6	67176774	-/GTCCAATA
MID-419	rs140708	6	170720016	-/AATGGCA
MID-943	rs1611026	5	82545545	-/TGAT
MID-159	rs16438	20	25278470	-/CCCCA
MID-2005	rs2308161	10	69800909	-/AACAAT
MID-250	rs16687	7	83887882	-/CA
MID-1802	rs2307998	5	7814345	-/GGA
MID-1607	rs2307803	3	108981031	-/TG
MID-1734	rs2307930	6	84476378	-/CCAT
MID-406	rs25630	6	14734341	-/AG
MID-1386	rs2307582	1	247768775	-/AAACTATTCATTTTCCACCT
MID-1726	rs2307922	1	39896964	-/CAAGAACTATAAT/CACTATCTATTAT
MID-3626	rs11267926	15	45526069	-/AATATAATTTCTCCA
MID-360	rs25584	12	112145217	-/AA
MID-1603	rs2307799	5	70828427	-/TTGT
MID-2719	rs34541393	20	30701405	-/AACT

Fonte: Pereira *et al.* (2012).

Apêndice 2 - Quantificação do DNA das amostras utilizadas neste trabalho.

Sample Name	[Auto]	[Deg]	[Y]	IPC Cq	Closest IPC	IPC Shift	IPC Threshold	[Auto]/[Y]	[Auto]/[Y] Threshold	[Auto] / [D]	[Auto]/[D] Threshold	Diluição Indel
GKW201FA	2,1027	1,9949	0,0058	20,81	20,78	0,03	Below	360,87	At or Above	1,05	Below	5,256716609
GKW202WC	0,2164	0,2165	0,2529	20,52	20,76	-0,24	Below	0,86	Below	1,00	Below	ABAIXO
GKW203SB	0,6376	0,5092		20,74	20,76	-0,02	Below	Undetermined		1,25	Below	1,594103128
GKW204MM	0,5961	0,4219	0,5132	20,68	20,76	-0,09	Below	1,16	Below	1,41	Below	1,490362734
GKW208RA	0,3348	0,3051	0,3828	20,68	20,76	-0,09	Below	0,87	Below	1,10	Below	ABAIXO
GKW210LA	0,1978	0,1755		20,89	20,76	0,13	Below	Undetermined		1,13	Below	ABAIXO
GKW215JR	0,3064	0,2615		20,56	20,76	-0,21	Below	Undetermined		1,17	Below	ABAIXO
GKW216OM	0,4953	0,4137	0,4817	20,57	20,76	-0,19	Below	1,03	Below	1,20	Below	1,238154992
GKW217AF	0,2270	0,2102		20,77	20,76	0,01	Below	Undetermined		1,08	Below	ABAIXO
GKW220IM	1,0908	0,8594	0,0003	20,66	20,78	-0,12	Below	4234,80	At or Above	1,27	Below	2,726916373
GKW221EB	0,2871	0,2560		20,47	20,76	-0,30	Below	Undetermined		1,12	Below	ABAIXO
GKW222IS	0,4263	0,4012		20,47	20,76	-0,29	Below	Undetermined		1,06	Below	1,065756679
GKW228AR	1,7772	1,5620	0,0001	20,48	20,78	-0,30	Below	14968,04	At or Above	1,14	Below	4,443072975
GKW230GC	0,3777	0,2323		20,52	20,76	-0,24	Below	Undetermined		1,63	Below	ABAIXO
GKW232CR	0,7462	0,4675	0,0004	20,54	20,76	-0,23	Below	1973,87	At or Above	1,60	Below	1,865430772
GKW233RA	0,5076	0,3056		20,73	20,76	-0,03	Below	Undetermined		1,66	Below	1,268994063
GKW234DC	0,7705	0,4881		20,67	20,76	-0,09	Below	Undetermined		1,58	Below	1,926324666
GKW235EC	0,7455	0,5248		20,40	20,76	-0,36	Below	Undetermined		1,42	Below	1,863869727
GKW236IN	0,7098	0,5902	0,6894	20,54	20,76	-0,22	Below	1,03	Below	1,20	Below	1,77454263
GKW237LN	0,6106	0,5068		20,50	20,76	-0,26	Below	Undetermined		1,20	Below	1,526455432
GKW238NF	0,4355	0,3566	0,0001	20,41	20,76	-0,35	Below	3073,74	At or Above	1,22	Below	1,088710502
GKW244CA	1,5170	1,1207		20,51	20,78	-0,27	Below	Undetermined		1,35	Below	3,792472184
GKW245MB	0,7496	0,5343	0,7746	20,66	20,76	-0,10	Below	0,97	Below	1,40	Below	1,87400192

Sample Name	[Auto]	[Deg]	[Y]	IPC Cq	Closest IPC	IPC Shift	IPC Threshold	[Auto]/[Y]	[Auto]/[Y] Threshold	[Auto] / [D]	[Auto]/[D] Threshold	Diluição Indel
GKW251AG	1,1276	0,8376		20,34	20,78	-0,44	Below	Undetermined		1,35	Below	2,818908989
GKW255FM	1,6102	1,1636		20,65	20,78	-0,13	Below	Undetermined		1,38	Below	4,025380611
GKW257MR	0,5185	0,3949		20,47	20,76	-0,29	Below	Undetermined		1,31	Below	1,296305805
GKW258SR	0,9232	0,6739		20,38	20,76	-0,38	Below	Undetermined		1,37	Below	2,307995409
GKW280RC	0,6086	0,4016		20,43	20,76	-0,34	Below	Undetermined		1,52	Below	1,521428525
GND802AL	0,3131	0,2191		20,41	20,76	-0,35	Below	Undetermined		1,43	Below	ABAIXO
GND804JD	1,3153	1,1257	1,3024	20,43	20,78	-0,35	Below	1,01	Below	1,17	Below	3,288213909
GND805OL	0,3762	0,2204	0,3349	20,47	20,76	-0,29	Below	1,12	Below	1,71	Below	ABAIXO
GND806CF	0,3664	0,2531	0,3785	20,39	20,76	-0,37	Below	0,97	Below	1,45	Below	ABAIXO
GND810VM	0,3870	0,2981	0,4446	20,50	20,76	-0,26	Below	0,87	Below	1,30	Below	ABAIXO
GND813FD	0,2780	0,2246	0,2938	20,52	20,76	-0,24	Below	0,95	Below	1,24	Below	ABAIXO
GND815CF	0,1994	0,1543	0,2244	20,36	20,76	-0,40	Below	0,89	Below	1,29	Below	ABAIXO
GND816GM	0,3123	0,2566	0,3277	20,48	20,76	-0,28	Below	0,95	Below	1,22	Below	ABAIXO
GND838AR	0,3539	0,2806		20,49	20,76	-0,28	Below	Undetermined		1,26	Below	ABAIXO
GRC138	0,1823	0,1361	0,1831	20,50	20,76	-0,26	Below	1,00	Below	1,34	Below	ABAIXO
GRC145	0,0760	0,0535		20,37	20,76	-0,39	Below	Undetermined		1,42	Below	ABAIXO
GRC147	0,7978	0,4311		20,42	20,76	-0,35	Below	Undetermined		1,85	Below	1,994386911
GRC148	0,0904	0,0706	0,1007	20,45	20,76	-0,32	Below	0,90	Below	1,28	Below	ABAIXO
GRC149	0,5562	0,0199	0,0004	20,24	20,76	-0,52	Below	1332,66	At or Above	27,90	At or Above	1,390482783
GRC150	0,1768	0,0930	0,1610	20,30	20,76	-0,46	Below	1,10	Below	1,90	Below	ABAIXO
KIV001	0,0791	0,0284	0,0694	20,26	20,76	-0,50	Below	1,14	Below	2,78	At or Above	ABAIXO
KIV013				20,23	20,97	-0,74	Below					
KIV016	1,1729	0,9401	1,2113	20,34	20,78	-0,44	Below	0,97	Below	1,25	Below	2,932228446

Sample Name	[Auto]	[Deg]	[Y]	IPC Cq	Closest IPC	IPC Shift	IPC Threshold	[Auto]/[Y]	[Auto]/[Y] Threshold	[Auto] / [D]	[Auto]/[D] Threshold	Diluição Indel
KIV022	0,2632	0,0512	0,2066	20,33	20,76	-0,43	Below	1,27	Below	5,14	At or Above	ABAIXO
KIV028	0,1109	0,0282		20,43	20,76	-0,33	Below	Undetermined		3,94	At or Above	ABAIXO
KIV031	1,5615	1,3835		20,67	20,78	-0,12	Below	Undetermined		1,13	Below	3,903786838
KIV037	0,1851	0,1075	0,1364	20,24	20,76	-0,53	Below	1,36	Below	1,72	Below	ABAIXO
KIV039	0,2124	0,1482	0,2200	20,33	20,76	-0,43	Below	0,97	Below	1,43	Below	ABAIXO
KIV048	0,0397	0,0282	0,0450	20,51	20,97	-0,46	Below	0,88	Below	1,41	Below	ABAIXO
KIV050	1,9684	0,3658		20,32	20,78	-0,47	Below	Undetermined		5,38	At or Above	4,920910895
KIV061	0,5244	0,3640	0,4941	20,31	20,76	-0,45	Below	1,06	Below	1,44	Below	1,311064661
KIV065	0,4600	0,3083		20,44	20,76	-0,33	Below	Undetermined		1,49	Below	1,150048152
KIV069				20,40	20,97	-0,57	Below					
KIV074	0,0537	0,0355		20,25	20,76	-0,51	Below	Undetermined		1,52	Below	ABAIXO
KIV086	0,0662	0,0725	0,0738	20,28	20,76	-0,48	Below	0,90	Below	0,91	Below	ABAIXO
KIV093	0,0188	0,0161	0,0246	20,30	20,97	-0,66	Below	0,76	Below	1,16	Below	ABAIXO
KIV110	0,0004	0,0004	0,0003	20,30	20,97	-0,67	Below	1,16	Below	1,08	Below	ABAIXO
KIV118	0,1696	0,1173	0,1331	20,40	20,76	-0,37	Below	1,27	Below	1,45	Below	ABAIXO
KRC001	0,1677	0,1654	0,1863	20,37	20,76	-0,39	Below	0,90	Below	1,01	Below	ABAIXO
KRC002	0,2062	0,1405	0,2142	20,44	20,76	-0,32	Below	0,96	Below	1,47	Below	ABAIXO
KRC031	0,1089	0,0697	0,1252	20,40	20,76	-0,36	Below	0,87	Below	1,56	Below	ABAIXO
KRC034	0,6961	0,6093	0,6604	20,29	20,76	-0,48	Below	1,05	Below	1,14	Below	1,740365326
KRC060	0,4499	0,3941	0,4570	20,33	20,76	-0,43	Below	0,98	Below	1,14	Below	1,12485446
KRC062	0,0607	0,0562	0,0712	20,39	20,76	-0,38	Below	0,85	Below	1,08	Below	ABAIXO
KRC064	0,0875	0,0929	0,1011	20,36	20,76	-0,40	Below	0,87	Below	0,94	Below	ABAIXO
KRC065	0,1181	0,1183	0,1619	20,41	20,76	-0,36	Below	0,73	Below	1,00	Below	ABAIXO

Sample Name	[Auto]	[Deg]	[Y]	IPC Cq	Closest IPC	IPC Shift	IPC Threshold	[Auto]/[Y]	[Auto]/[Y] Threshold	[Auto] / [D]	[Auto]/[D] Threshold	Diluição Indel
KRC066	0,1587	0,1655	0,1928	20,46	20,76	-0,31	Below	0,82	Below	0,96	Below	ABAIXO
KRC067	0,1116	0,0980	0,1189	20,73	20,76	-0,03	Below	0,94	Below	1,14	Below	ABAIXO
KRC080	0,3078	0,2767		20,46	20,76	-0,30	Below	Undetermined		1,11	Below	ABAIXO
KRC089	0,3119	0,1082		20,65	20,76	-0,11	Below	Undetermined		2,88	At or Above	ABAIXO
KRC093				21,07	20,97	0,10	Below					
KRC094	19,7296	14,8790	0,0001	20,49	20,78	-0,29	Below	146387,50	At or Above	1,33	Below	49,32398796
KRC096	0,1155	0,0931	0,0002	20,46	20,76	-0,30	Below	705,59	At or Above	1,24	Below	ABAIXO
KRC098	0,2236	0,2270	0,2693	20,64	20,76	-0,12	Below	0,83	Below	0,98	Below	ABAIXO
KRC099	1,2910	0,9121	1,2148	20,58	20,78	-0,20	Below	1,06	Below	1,42	Below	3,227423131
KRC102	0,1278	0,1214		20,67	20,76	-0,09	Below	Undetermined		1,05	Below	ABAIXO
KRC104	4,3014	4,2545		20,53	20,78	-0,25	Below	Undetermined		1,01	Below	10,75353384
KRC107	0,0663	0,0561		20,82	20,76	0,05	Below	Undetermined		1,18	Below	ABAIXO

Fonte: A autora (2017).

Apêndice 3- Cálculos de Hardy- Weinberg para população Guarani.

POPULAÇÃO GUARANI				
Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-valor
1470	43	0.04651	0.04596	100000
777	42	0.38095	0.36718	100000
196	42	0.14286	0.13425	100000
881	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
3122	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
548	43	0.20930	0.25964	0.22370
659	43	0.37209	0.40711	0.70523
2011	43	0.11628	0.15130	0.23283
2929	43	0.04651	0.04596	100000
593	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
798	43	0.27907	0.24295	0.57607
1193	43	0.41860	0.44432	0.73588
1871	43	0.41860	0.50561	0.35939
17	43	0.34884	0.32093	100000
2538	43	0.02326	0.02326	100000
1644	43	0.55814	0.50342	0.54546
3854	43	0.04651	0.04596	100000
2275	43	0.53488	0.49603	0.75583
94	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
3072	43	0.04651	0.04596	100000
772	43	0.46512	0.48372	100000
2313	43	0.46512	0.42681	0.71882
397	43	0.34884	0.32093	100000
1636	43	0.06977	0.06813	100000
51	43	0.27907	0.24295	0.57620
2431	43	0.48837	0.47852	100000
2264	43	0.23256	0.21040	100000
2256	43	0.13953	0.17073	0.30010
128	43	0.27907	0.24295	0.57633
15	43	0.32558	0.33488	100000
2241	43	0.16279	0.18960	0.37102
419	43	0.58140	0.50588	0.37130
943	43	0.46512	0.49904	0.75885
159	43	0.44186	0.46648	0.74972
2005	43	0.34884	0.34829	100000
250	43	0.41860	0.50342	0.35766
1802	43	0.02326	0.02326	100000
1607	43	0.46512	0.50342	0.75951
1734	43	0.37209	0.49248	0.12597
406	43	0.34884	0.41724	0.28853
1386	43	0.59524	0.49197	0.21055
1726	43	0.34884	0.34829	100000
3626	43	0.11628	0.11081	100000
360	43	0.44186	0.43584	100000
1603	43	0.27907	0.24295	0.57657
2719	43	0.25581	0.29138	0.58723

Fonte: A autora (2017).

Apêndice 4: Cálculos de Hardy-Weinberg para população Kaingang.

POPULAÇÃO KAINGANG				
Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-valor
1470	34	0.05882	0.05795	100000
777	34	0.29412	0.25461	100000
196	34	0.17647	0.16330	100000
881	34	0.05882	0.05795	100000
3122	34	0.02941	0.02941	100000
548	33	0.03030	0.03030	100000
659	34	0.47059	0.46356	100000
2011	33	0.12121	0.11562	100000
2929	34	0.02941	0.02941	100000
593	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
798	34	0.11765	0.11238	100000
1193	34	0.08824	0.13828	0.14585
1871	34	0.41176	0.50044	0.32059
17	34	0.02941	0.02941	100000
2538	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
1644	33	0.39394	0.50769	0.29367
3854	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
2275	34	0.61765	0.48595	0.15405
94	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
3072	34	0.02941	0.02941	100000
772	34	0.47059	0.42142	0.68300
2313	34	0.50000	0.38060	0.08179
397	34	0.47059	0.50571	0.73916
1636	34	0.05882	0.05795	100000
51	34	0.23529	0.25461	0.53900
2431	34	0.44118	0.48595	0.72125
2264	34	0.32353	0.38060	0.38861
2256	34	0.35294	0.29500	0.55814
128	34	0.29412	0.25461	100000
15	34	0.14706	0.18745	0.28957
2241	33	0.18182	0.16783	100000
419	34	0.52941	0.50044	100000
943	34	0.44118	0.47191	0.72421
159	34	0.35294	0.36523	100000
2005	34	0.11765	0.16330	0.21379
250	34	0.52941	0.49166	0.73190
1802	Locus monomórfico, o teste não se aplica			
1607	34	0.32353	0.38060	0.38841
1734	34	0.47059	0.39508	0.38836
406	34	0.41176	0.39508	100000
1386	34	0.55882	0.49649	0.50128
1726	34	0.20588	0.27524	0.17936
3626	33	0.03030	0.03030	100000
360	34	0.38235	0.43327	0.68604
1603	34	0.35294	0.39508	0.66023
2719	34	0.32353	0.49649	0.07564

Fonte: A autora (2017).