



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

ESTUDO DE MARCADORES BIALÉLICOS (SNPS) DO CROMOSSOMA Y NUMA POPULAÇÃO AFRICANA (ANGOLA)

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Francisco Corte-Real (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor António Portugal (Universidade de Coimbra)

Pedro Miguel Teixeira Beato Couto de Brito

Agradecimentos

A todos quantos viabilizaram e apoiaram a realização deste trabalho agradeço profundamente e dedico o resultado deste trabalho. Em particular:

Ao Professor Francisco Corte-Real, pela orientação científica e disponibilidade que me proporcionou ao longo deste estudo.

Ao Professor António Portugal, por ter aceite ser meu co-orientador e se ter disponibilizado a ajudar quando fosse preciso.

À Doutora Mónica Carvalho, por me ter dado todo o apoio necessário, marcado pela disponibilidade incondicional, paciência e muito incentivo. Com a sua vasta cultura em Genética Populacional inspirou-me na realização deste trabalho, ajudando a ultrapassar todos os obstáculos.

À Doutora Maria João Porto por me ter permitido a realização deste trabalho no Serviço de Genética e Biologia Forense, e a todos os colegas e não só (Vanessa, Filipa, Dr. Armando, Dr.^a Virgínia, Ana Margarida, Marta, Lisa, Patrícia, Dona Glória, Celeste, Heloísa, Dona Luísa) com quem partilho (ou partilhei) o dia-a-dia de trabalho e me incentivaram, principalmente nos momentos mais desanimadores, dando-me todo o apoio necessário.

Aos meus amigos em geral e cada um deles em particular, que por o serem, estiveram sempre presentes, com uma palavra de conforto. Felizmente para mim, são muitos para poder enumerar, mas vocês sabem quem são.

À minha família, por tudo: apoio, amizade, partilha de experiências, incentivo, muita paciência, motivação, persistência. Muito obrigado Mãe, Pai, Zinha, Tio Xico, Xinha, Raquel, Diogo e Nuno.

Summary

From the study of Y chromosome, it can be evaluated the paternal lineages of an individual or a population. In this study, the polymorphisms of Y chromosome analyzed are biallelic markers of the Y chromosome –SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) - characterized as a single mutation event. The analysis of these polymorphisms allows the assignment of lineages to different groups, defining the haplogroups that characterize a population. This information can reveal the origin of a population, essential to population genetics and of significant importance to forensic genetics. The major advantage is that these markers can be studied in very short amplification products (50bp or less), being very useful in the analysis of highly degraded DNA samples.

In this study, were used samples from unrelated individuals of an Angola population, of three different ethnic groups (Ovimbundo, Mbundu and Bakongo). Taking into account the geographical origin of the population, a hierarchical strategy was adopted to define the haplogroups of the samples (Karafet et al. 2008). The samples were extracted by the Chelex®100 method (Walsh et al. 1991) and characterized for the Multiplex E system (P2, M154, M293, M81, M85, M78, M35, M96, V6, M191, M33, M123, M2) (Gomes et al. 2010) by the Snapshot minisequencing method. It was still necessary to resort to other systems to characterize samples that did not fall into haplogroup E (Multiplex 1 and Multiplex B) (Gomes et al. 2010; Brion et al. 2005). The detection was performed on the ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

After analyzing the results we observed that the samples fit mostly in haplogroup E (E1b1a * (xE1b1a4, 7)), which is characteristic of central-west African populations. Some samples were typed for haplogroup R, present mostly in European populations. This is explained as a result of demographic events, such as the African colonization by European populations.

The aim of this research work is to characterize an Angola population, namely the three main ethnic groups, defining the haplogroups present in this population, for subsequent application to forensic genetics.

Keywords: Y chromosome, SNP, Angola, Ovimbundo, Mbundu, Bakongo.

Resumo

O estudo do cromossoma Y permite definir as linhagens paternas de um indivíduo ou populações. Neste estudo foram analisados polimorfismos do cromossoma Y, nomeadamente marcadores bialélicos ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), caracterizados como um evento mutacional único. A análise destes polimorfismos permite a atribuição de linhagens, definindo assim os haplogrupos característicos de uma população. A informação resultante desta análise permite inferir quanto à origem de uma população, revelando ser essencial em estudos de genética populacional e de grande importância em genética forense. A grande vantagem destes marcadores bialélicos deve-se ao facto de resultarem em produtos de amplificação bastante reduzidos (50pb ou menos), revelando ser muito úteis na análise de amostras de ADN degradadas.

Neste estudo foram utilizadas amostras de indivíduos não aparentados de uma população angolana de três diferentes etnias (Ovimbundo, Mbundu e Bakongo). Tendo em conta a origem geográfica da população, foi adoptada uma estratégia hierárquica para definir os haplogrupos das amostras (Karafet et al. 2008). As amostras foram extraídas segundo o método de Chelex® 100 (Walsh et al. 1991) e caracterizadas para o sistema Multiplex E (P2, M154, M293, M81, M85, M78, M35, M96, V6, M191, M33, M123, M2) (Gomes et al. 2010) pelo método de minisequenciação com o kit Snapshot, da Applied Biosystems. Foi ainda necessário recorrer a outros sistemas para caracterizar amostras que não se enquadravam no haplogrupo E (Multiplex 1 e Multiplex B) (Gomes et al. 2010; Brion et al. 2005). A detecção foi realizada no ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

Após análise dos resultados observou-se que grande parte das amostras se enquadrava no haplogrupo E (E1b1a * (xE1b1a4, 7)), característico das populações do centro e da costa ocidental subsariana de África. Algumas amostras foram definidas para haplogrupo R, presente principalmente em populações europeias. Este facto poderá ser explicado como resultado de eventos demográficos, como a colonização africana por populações europeias.

Este trabalho teve como objectivo caracterizar uma população de Angola, nomeadamente as três principais etnias, definindo os haplogrupos presentes nesta população, para posterior aplicação à genética forense.

Palavras-chave: Cromossoma Y, SNP, Angola, Ovimbundo, Mbundu, Bakongo.

Índice:

1. Introdução.....	1
1.1. Genética populacional e Genética forense.....	2
1.2. Cromossoma Y.....	3
1.2.1. Marcadores bialélicos ou SNPs do cromossoma Y.....	5
1.2.2. Nomenclatura de SNPs e haplogrupos.....	6
1.3. Angola.....	10
1.3.1. História da população.....	10
1.3.2. Etnias.....	12
1.4. Objectivos.....	15
2. Material e Métodos.....	16
2.1. Marcadores Bialélicos estudados.....	17
2.2. Colheita das amostras e Extracção de ADN.....	18
2.3. Tipagem dos marcadores Bialélicos (SNPs).....	19
2.4. Análise estatística.....	24
3. Resultados e Discussão.....	25
4. Conclusão.....	31
5. Bibliografia.....	34
Anexos.....	39

1. Introdução

1.1. Genética populacional e Genética forense

A maioria das espécies mostra evidências de diversidade genética entre as populações. A genética populacional é um campo da biologia que estuda a composição genética das populações e a sua alteração resultante de vários factores. Os genótipos dos indivíduos actuais são o resultado de antigas migrações humanas, padrões de cruzamento determinados por normas culturais e o contínuo aparecimento de novas mutações, bem como da selecção natural e a vantagem conferida na sobrevivência a factores climáticos e patológicos. Com a disponibilidade crescente de marcadores moleculares polimórficos do genoma humano, a caracterização genética de uma população tornou-se uma prática comum no âmbito da biologia evolutiva e da genética populacional, permitindo inferir em relação a eventos demográficos passados.

A análise de marcadores de ADN em genética forense é igualmente uma ferramenta poderosa e indispensável na investigação de parentesco, criminalística e identificação genética individual. Uma das questões mais críticas em genética forense é estimar a probabilidade de correspondência de dois perfis de ADN ao acaso. A fim de determinar a probabilidade de um genótipo específico poder ocorrer de forma aleatória numa dada população é necessário uma amostragem populacional extensiva, de modo a ser possível com o máximo de segurança estimar a frequência de ocorrência de um determinado alelo ou genótipo numa população. No contexto da genética forense uma população pode ser descrita como um grupo de pessoas que partilham uma ancestralidade comum. No entanto, em termos forenses, a classificação de uma determinada população é geralmente mais ampla e, muitos subgrupos que podem diferir em cultura, língua e religião, são incluídos no mesmo grupo, adoptando-se classificações mais abrangentes, como Caucasianos, Africanos, Hispânicos, Subsaarianos, entre outras, as denominadas metapopulações (Butler 2009; Goodwin et al. 2007; Hartl et al. 1997)

A fusão de interesses destas duas áreas levou à criação de projectos como a YHRD (Y Chromosome Haplotype Reference Database), resultado da actividade a nível mundial de geneticistas trabalhando principalmente no campo da ciência forense e populacional. De acesso livre, este projecto online

tem como objectivo armazenar haplótipos do cromossoma Y, de diversas populações em metapopulações, permitindo a partilha de dados de frequências haplotípicas para a utilização quer por analistas forenses, quer por investigadores de diversas áreas com interesse em genética populacional (Willuweit et al. 2007; Carracedo et al. 2010).

1.2. Cromossoma Y

O cromossoma Y é um dos mais pequenos do genoma humano, com cerca de 60 milhões de pares de bases. As extremidades do cromossoma Y, denominadas de pseudoautossómicas, são as únicas regiões deste cromossoma que recombina com as regiões homólogas do cromossoma X. Os restantes 95% da sua sequência são denominados de região não-recombinante (NRY) (Figura 1).

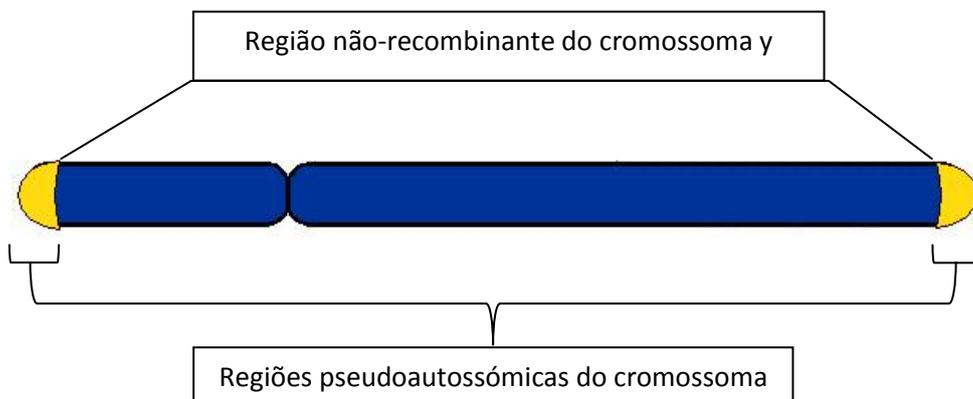


Figura 1 – Estrutura do cromossoma Y (adaptado de <http://www.cstl.nist.gov/strbase/ystrpos1.htm>).

A investigação a nível do cromossoma Y tem demonstrado ser muito útil em estudos demográficos pela facilidade de análise e da sua natureza não-recombinante. Na ausência de eventos recombinantes, o cromossoma Y comporta-se como uma unidade e os vários marcadores genéticos existentes na sua sequência (NRY) são herdados em bloco, de pai para filho, à excepção da possível ocorrência de eventos mutacionais (Figura 2).

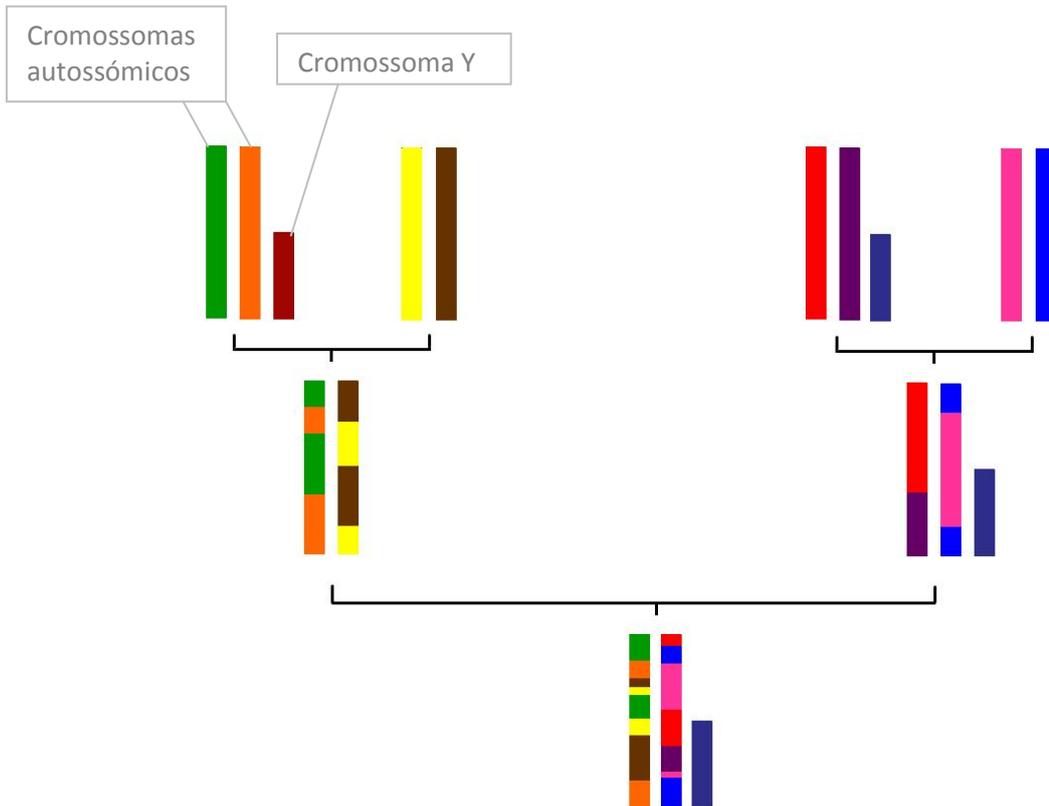


Figura 2 – Padrão de hereditariedade de cromossomas autossómicos (sujeitos a eventos recombinantes) e do cromossoma Y (não sujeito a eventos recombinantes).

A conservação da região não-recombinante do cromossoma Y na transmissão genética gera haplótipos (conjunto de marcadores únicos que são transmitidos em bloco de uma geração a outra). Nos últimos anos, informações sobre a herança haplotípica da região não-recombinante tem sido amplamente aplicada em estudos populacionais de linhagem paterna, bem como na perícia forense. O valor do cromossoma Y em genética forense passa pelo facto de existir unicamente em indivíduos do sexo masculino. Assim, em investigações de paternidade ou em identificação genética individual, a análise destes marcadores pode ser uma mais-valia, complementando a informação de marcadores autossómicos, ou mesmo na ausência do interveniente directo, permitindo a utilização de material biológico referente a outros indivíduos do sexo masculino da mesma linhagem paterna. É igualmente importante em criminalística, nomeadamente em casos de agressões sexuais, uma vez que a grande maioria dos agressores são do sexo masculino, permitindo, em casos de misturas, uma análise diferencial do componente masculino. Os principais

marcadores ou polimorfismos de ADN estudados no cromossoma Y são os STRs (Short Tandem Repeats – repetições nucleótidas de 2 a 6 pares de bases) e os SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms – variação de um único nucleótido na sequência de ADN). Um determinado marcador diz-se polimórfico quando existem pelo menos duas formas alélicas na mesma população, estando a menos frequente presente em mais de 1% dos indivíduos. Os polimorfismos genéticos promovem a diversidade entre indivíduos ou populações e são caracterizados por variações na sequência de ADN num específico locus.

1.2.1. Marcadores bialélicos ou SNPs do cromossoma Y

Os SNPs representam a mais abundante classe de polimorfismos de ADN humano ($\approx 90\%$). É ainda difícil estimar o número de SNPs no genoma humano, mas em diferentes bases de dados foram já reunidos mais de cinco milhões de SNPs e cerca de quatro milhões foram validados para estudos em Genética Humana (Butler 2009; Brookes 1999).

Entende-se por SNP uma variação ou alteração genética de uma única base que pode ocorrer na sequência do ADN humano. Esta alteração ocorre quando uma base nucleótida (A, C, T ou G) substitui a posição de uma das outras três, denominando-se por isso de marcador bialélico. Temos como exemplo na figura 3 a substituição da base nucleótida timina pela adenina.

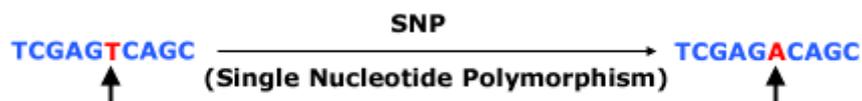


Figura 3 – Ocorrência de mutação de uma única base na sequência de ADN (SNP). Neste exemplo podemos definir as duas formas alélicas: T (forma ancestral) e A (forma mutada) (adaptado de <http://www.dnaheritage.com/masterclass2.asp>).

Os polimorfismos do cromossoma Y, nomeadamente os STRs, fazem já parte da rotina em perícias forenses. Os STRs são utilizados em investigações de paternidade, em que o filho é do sexo masculino e em análises de misturas de material biológico, em que um dos intervenientes é do sexo masculino. Por outro lado, os SNPs do cromossoma Y são uma nova ferramenta no campo da investigação forense. O seu interesse tem aumentado consideravelmente no campo forense como consequência das vantagens que apresentam. Estes marcadores bialélicos permitem uma maior recuperação de informação em amostras de ADN degradadas, uma vez que a região alvo é menor em relação à amplificação com STRs. Outra vantagem dos SNPs é possuírem baixas taxas de mutação, cerca de 100 mil vezes menor, quando comparadas com as dos STRs. Assim, teoricamente sendo os SNPs mais estáveis em termos de herança genética, podem ter um papel importante em investigações de parentesco em vítimas de desastres de massa. No entanto, a possibilidade da substituição dos STRs por SNPs em perícias forenses apresenta também algumas desvantagens. Uma vez que estes marcadores bialélicos não são tão polimórficos quando comparados com os STRs, para atingir o mesmo poder de discriminação usualmente obtido com 13 a 15 loci de STRs, seria necessário a análise de cerca de 40 a 60 SNPs. Embora estejam a ser feitos esforços nesse sentido, a análise de um número tão elevado de marcadores acarreta ainda elevados custos e poderá apresentar alguma complexidade na análise de dados resultantes do número de loci amplificados. No entanto, os SNPs, nomeadamente os do cromossoma Y, poderão ter um papel relevante como marcadores informativos de ancestralidade (AIMS), permitindo estimar a origem étnica e consequentes características fenotípicas referentes a uma amostra biológica (Butler et al. 2007)

1.2.2. Nomenclatura de SNPs e haplogrupos

O interesse no estudo dos SNPs do cromossoma Y tem levado a um aparecimento exponencial de novos marcadores, devidamente caracterizados e disponíveis para consulta. A sua utilização em estudos populacionais e a caracterização dos haplótipos resultantes tem levado à definição de novas linhagens, as quais formam os denominados haplogrupos. Com o intuito de

uniformizar o sistema de nomenclatura e as relações de ancestralidade entre os vários haplogrupos, foi publicada em 2001 pelo Y Chromosome Consortium (YCC) uma árvore filogenética que centralizava a informação referente aos haplogrupos obtidos com base em 243 polimorfismos únicos, representando a maioria dos marcadores bialélicos conhecidos até à data. A posição da raiz da árvore foi determinada com base na análise de regiões (NRY) homólogas de espécies filogeneticamente próximas (chimpanzés, gorilas e orangotangos), com o intuito de determinar o estado ancestral dos polimorfismos da espécie humana. A árvore pode ser vista como um conjunto de linhagens relacionadas, partilhando entre si pontos de ancestralidade ou deriva genética. Este sistema hierárquico foi construído com base numa nomenclatura suficientemente flexível de modo a permitir eventuais mudanças que resultassem da descoberta de novas mutações e conseqüentemente, novas linhagens ou haplogrupos (Y Chromosome Consortium,2002). Aos principais ramos foram atribuídos letras maiúsculas, que representam as principais divisões existentes em termos de diversidade da NRY do cromossoma Y. Começando com a letra A, para o haplogrupo acima da posição da raiz da árvore (que define os sub-haplogrupos mais próximos do estado ancestral), a atribuição continua com o alfabeto até à letra R. Os subgrupos são definidos pela letra correspondente ao haplogrupo principal a que pertencem, seguida de um sistema alfanumérico, alternando números com letras minúsculas, ao longo da divisão subsequente das diferentes linhagens dentro dos principais grupos.

Desde então, mais de 400 SNPs do cromossoma Y foram descobertos, exigindo alterações topológicas na estrutura hierárquica da árvore, bem como na nomenclatura de algumas linhagens previamente definidas, redefinindo relações evolutivas entre as linhagens. Em 2008 foi publicada uma nova árvore, no qual foram incluídos mais dois haplogrupos principais (S e T) (Figura 4) (Karafet et al. 2008).

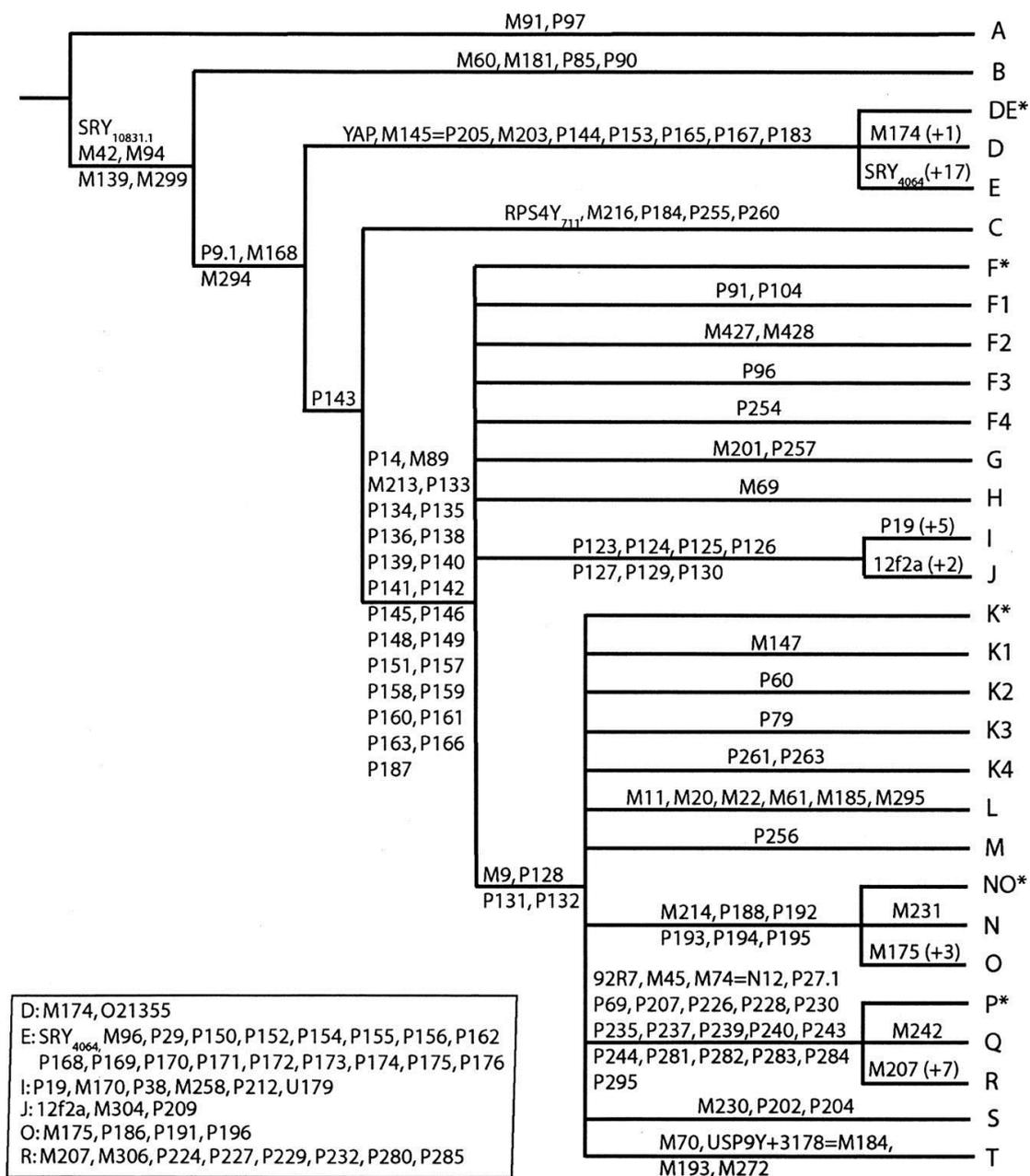


Figura 4 – Árvore filogenética (forma abreviada) dos haplogrupos do cromossoma Y. Nesta representação é possível observar nos “ramos” da árvore, as mutações que definem os haplogrupos (A a T) (Karafet et al. 2008).

O haplogrupo é definido por uma mutação, ou conjuntos de mutações, que ocorrem com pouca frequência ao longo da história, sendo por isso, considerados eventos únicos. As mutações são transmitidas às gerações seguintes, por milhares de anos, permitindo associar os membros de um haplogrupo como fazendo parte de uma descendência comum. Ao longo dos tempos, e fruto dos vários movimentos demográficos, a distribuição dos haplogrupos ficou associada a populações definidas em termos geográficos ou étnicos (Figura 5).

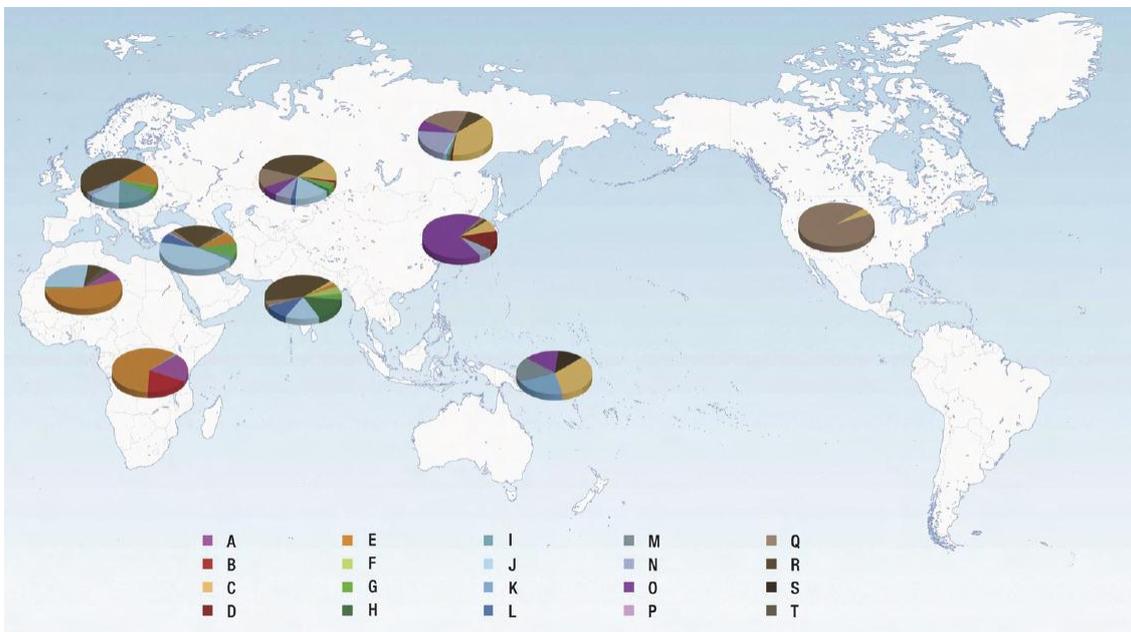


Figura 5 – Distribuição geográfica dos principais haplogrupos, com base nas suas frequências (Karafet et al. 2008).

1.3. Angola

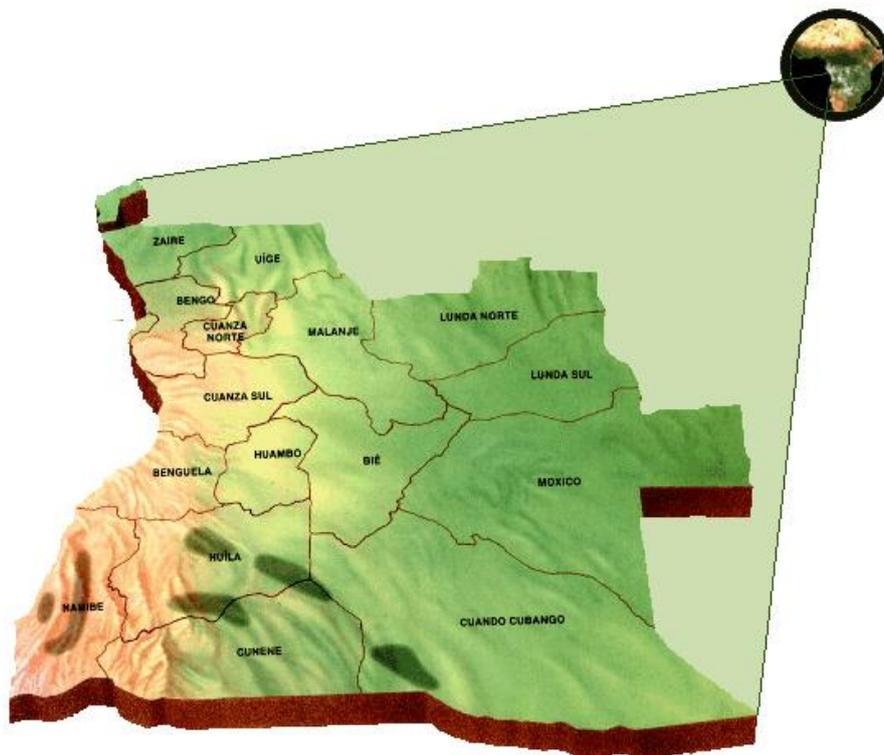


Figura 6 – Representação geográfica de Angola e a sua localização no continente africano.

1.3.1. História da população

Angola localiza-se no sudoeste do continente Africano, o segundo maior continente, depois da Ásia, cobrindo cerca de um quinto da superfície terrestre total da Terra. O território angolano, terá sido povoado há milhares de anos, como o comprovam os fósseis humanos encontrados, pertencentes a caçadores colectores da Idade da Pedra. Há cerca de 2.000 a 3.000 anos atrás ter-se-á dado início à migração dos povos de língua Bantu, provavelmente originárias dos territórios actualmente conhecidos como Nigéria e Camarões. Estes povos, devido à sua superioridade tecnológica de trabalho em metais e conhecimentos na área da agricultura, rapidamente se suplantaram aos Bosquímanos e outros povos considerados menos evoluídos, que habitavam a região, dominando o actual território angolano. O primeiro grande estado e

entidade política terá surgido no séc. XIV, denominado de Reino do Kongo. Este império ocupava uma vasta área, no território que hoje corresponde ao noroeste de Angola, a Cabinda, à República do Congo, à parte ocidental da República Democrática do Congo e à parte centro-sul do Gabão.

Em 1483, navegadores portugueses terão chegado a este reino, dando início a relações diplomáticas e trocas comerciais com este povo. Rapidamente influenciaram os soberanos do império, levando-os a converter o seu povo ao cristianismo, juntamente com a alfabetização da língua portuguesa, bem como a adopção de outros costumes europeus. Após a realização de várias missões, os portugueses estabeleceram uma colónia em Luanda em 1575, fortalecendo a sua posição na costa oeste do continente africano. Explorando as rivalidades e conflitos entre o Reino do Kongo e o Reino de Ndongo, guerras subsequentes foram travadas, nomeadamente com o Reino de Ndongo, a partir de 1617, levando a aumento significativo do território de supremacia portuguesa. A expansão portuguesa terá atingido o seu expoente máximo em 1670, com a ocupação total do território angolano. Os escravos eram o principal produto de exportação de Angola, no qual Portugal teve um papel activo, contribuindo para a ascensão e queda dos Reinos da região. As perdas populacionais foram consideráveis, e a demografia ficou gravemente distorcida, como comprovam os dados dos censos do final do século XVIII, em que o número de indivíduos adultos do sexo feminino era o dobro em relação aos do sexo masculino. A exportação de escravos foi proibida em Angola em 1836, no entanto, o comércio de escravos não terminou até o mercado brasileiro ser encerrado no início de 1850. Apesar da abolição do comércio de escravos, estes eram ainda exportados para São Tomé para plantações de café e cacau, e usados em Angola para a produção de café, algodão e açúcar. As mudanças ocorreram com a revolução industrial que reorganizou a economia mundial. A escravatura passou a ser considerada pouco produtiva e moralmente incorrecta, e em 1875 a escravatura foi abolida em todo o império português. A proclamação da República Portuguesa a 5 de Outubro de 1910, seguida da implantação do Estado Novo em 1926, marcou o advento do colonialismo moderno português, levando a uma modernização da colónia portuguesa e consequente evolução da economia. Na sequência da queda da ditadura em Portugal, a 25 de Abril de 1974, abriram-se perspectivas para a independência

de Angola, que ocorreu posteriormente, a 11 de Novembro de 1975 (Clarence-Smith et al. 2011; Collelo 1991; Hakme 2006)

1.3.2. Etnias

No continente Africano podem-se encontrar centenas de etnias, cada uma com uma língua (ou dialecto) e cultura próprias. O mesmo acontece em Angola, onde apesar do português ser a língua oficial, a grande maioria dos angolanos (mais de 95%) fala línguas de origem Bantu. A variedade linguística do povo angolano reflecte a variedade étnica que existe neste país. Entre os grupos etnolinguísticos mais representativos em Angola encontram-se os Ovimbundu ($\approx 37\%$), os Mbundu ($\approx 25\%$) e os Bakongo ($\approx 13\%$) (Figura 7). Dos restantes 25% da população fazem parte as etnias Lunda-Chokwe, Nganguela, Ovambo, Nyaneka-Humbe, Herero entre outras (Clarence-Smith et al. 2011; Collelo 1991)



Figura 7 – Localização geográfica das principais etnias em Angola (adaptado de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Angola_Ethnic_map_1970-pt.svg?uselang=pt).

Ovimbundu

Os Ovimbundu, também denominados Umbundu (nome que se refere também ao seu dialecto linguístico), são o grupo etnolinguístico mais representativo da população angolana. Esta etnia localizava-se essencialmente na região centro-oeste de Angola. Este grupo étnico desempenhava um importante papel na sociedade, na altura da época colonial, como intermediários no comércio de escravos, marfim e cera de abelha, agindo como transportadores. Com o declínio do comércio de escravos, voltaram-se para o comércio da borracha, até ao início do século XX. Com a consolidação da supremacia portuguesa sobre o território angolano, os Ovimbundu viram-se forçados a virar-se para a exploração agrícola (tarefa que até então só cabia às mulheres por motivos de subsistência). Na década de 1940, os Ovimbundu organizaram o que foi, provavelmente, a mais unida comunidade angolana da época colonial. Com ajuda externa de missionários cristãos, estabeleceram uma rede de aldeias cristãs, cada uma com a sua própria liderança, escolas e igrejas. Deste modo, foram capazes de manter as suas raízes culturais proporcionando uma educação com base nos seus costumes para os seus filhos. A geração que emergiu desta estrutura tornou-se a base do partido UNITA (União Nacional para a Independência Total de Angola), que contribuiu para a coesão na sociedade Ovimbundu (Collelo 1991).

Mbundu

A norte do território Ovimbundu, situava-se o território Mbundu, o segundo maior grupo etnolinguístico, também denominado Kimbundu (nome que se refere também ao seu dialecto linguístico). A localização do seu território e a proximidade com Luanda terá tornado este grupo étnico mais susceptível a influências portuguesas, nomeadamente a nível linguístico e cultural. Esta aproximação potenciou uma maior interacção e cruzamento inter-racial. À semelhança dos Ovimbundu, também os Mbundu estiveram na base da formação de um partido político, tendo sido os mais fortes apoiantes do MPLA (Movimento Popular de Libertação de Angola), que uma vez mais terá levado a uma maior união dentro da sociedade Mbundu (Collelo 1991).

Bakongo

O grupo etnolinguístico Bakongo, também denominado Kongo (cujo dialecto linguístico denomina-se de Kikongo), situava-se ao longo da costa Atlântica Africana, a norte do território Mbundu. Os Bakongo representam o terceiro maior grupo etnolinguístico angolano e dedicavam-se essencialmente à cultura de mandioca, banana, milho, batata-doce, amendoim, feijão, inhame, bem como outras culturas de maior rendimento como o café, o cacau e o óleo de palma. Para além destas actividades, foram uma das poucas etnias africanas dedicadas à pesca. Essa proximidade com o oceano levou a um contacto mais permanente com o povo português. Uma vez mais, à semelhança das outras etnias, devido à coesão social que mantinham no grupo étnico, foram responsáveis pela criação do partido político FNLA (Frente Nacional de Libertação de Angola), que se tornou um dos três principais grupos nacionalistas (juntamente com o MPLA e a UNITA). A criação e envolvimento no partido terá contribuído para conservar a integridade etnolinguística (Collelo 1991).

1.4. Objectivos

Este estudo teve como principal objectivo a caracterização das linhagens paternas de uma população angolana, nomeadamente das três principais etnias representativas desta população (Ovimbundu, Mbundu e Bakongo). Para este efeito, foram analisados 29 SNPs da região não recombinante do cromossoma Y, divididos em três multiplexs em função das linhagens ou haplogrupos a definir. A implementação destes multiplexes, nomeadamente do multiplex E, na rotina laboratorial, contribuiu para a sua futura utilização na perícia.

A população estudada foi ainda comparada com outras populações (europeias e africanas) já referenciadas na bibliografia. Com esta análise pretende-se enquadrar a genética da população na história do continente africano numa tentativa de explicar os movimentos demográficos que estiveram na origem das populações actuais, e em particular de Angola.

2. Material e Métodos

2.1. Marcadores Bialélicos estudados

A caracterização da população em estudo, teve em consideração o facto de ser uma população da África subsariana, nomeadamente da costa ocidental, tendo-se adoptado uma estratégia hierárquica de tipagem, com base na representação filogenética da árvore do YCC (Karafet et al., 2008). Esta abordagem permite definir os haplogrupos das amostras estudadas, sem ter que recorrer à tipagem de todos os polimorfismos de SNPs presentes na NRY do cromossoma Y. Deste modo procedeu-se preferencialmente à caracterização das amostras para o Multiplex E (P2, M154, M293, M81, M85, M78, M35, M96, V6, M191, M33, M123, M2) (Gomes et al., 2010), permitindo a tipagem das amostras que se enquadravam nas linhagens definidas pelo haplogrupo E. Nas amostras que não apresentavam a posição M96 na forma mutada, prosseguiu-se com a amplificação com o Multiplex 1 (M22, P25, 92R7, SRY1532, M70, M173, Tat, M213, M9) (Brion et al., 2004). A escolha deste multiplex deveu-se ao facto de, tendo em conta a história do País, poderem estar representadas na população estudada, linhagens representativas de populações europeias.

Após a análise com o Multiplex 1, verificou-se que algumas amostras não se enquadravam nas linhagens definidas por este sistema. Tendo em conta as migrações intra-continentais, optou-se por utilizar o Multiplex B (M168, M60, M182, M150, M109, M112, M30) (Gomes et al., 2010). Este multiplex define essencialmente as linhagens do haplogrupo B, característico de populações da costa oriental da África subsariana.

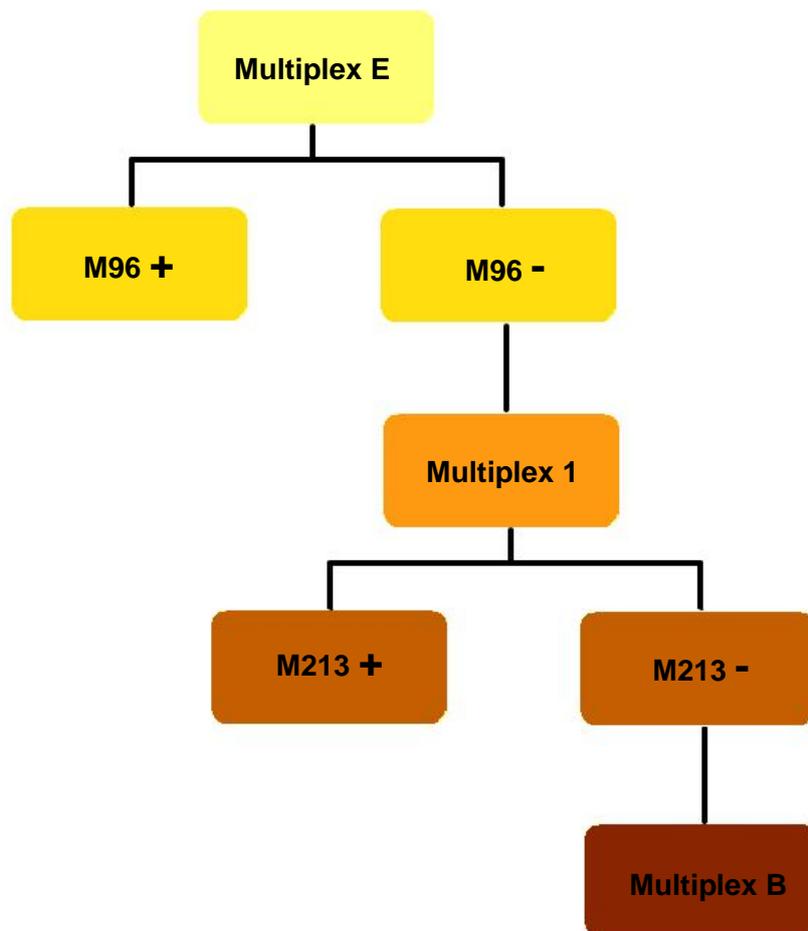


Figura 8 – Estratégia hierárquica adoptada na selecção de multiplexs para caracterização das amostras estudadas.

2.2. Colheita das amostras e Extração de ADN

Foram recolhidas amostras sanguíneas sob a forma de mancha de sangue, após consentimento informado, de 112 indivíduos pertencentes à população de Angola de três diferentes etnias (Ovimbundu N=44, Mbundu N=36 e Bakongo N=32). É importante referir ainda que se trata de uma amostragem de indivíduos saudáveis, não aparentados, com ascendência residente em Angola até pelo menos três gerações. Após a colheita, as manchas de sangue foram deixadas a secar à temperatura ambiente e, posteriormente foram colocadas, individualmente, em envelopes de papel devidamente identificados.

A amostra biológica, sob a forma de mancha de sangue, contém grande número de substâncias, entre as quais, proteínas celulares que envolvem e protegem a molécula de ADN no ambiente celular, e que, no entanto, podem inviabilizar a sua análise. O método de extracção foi então desenvolvido para separar proteínas e outros materiais celulares da molécula de ADN, preservando-a.

O método de extracção utilizado foi método adaptado de Chelex® 100 (Walsh et al. 1991). O Chelex contém iões que actuam como grupos quelantes, ligando-se a iões metálicos polivalentes (como o magnésio) que degradam o ADN, actuando como catalisadores na sua destruição. Ao remover o magnésio, as enzimas responsáveis pela destruição do ADN (nucleases) ficam inactivas e a molécula de ADN fica assim protegida. O pH da solução de Chelex (entre 10 e 11) e as elevadas temperaturas a que as amostras estão sujeitas durante o processo de extracção, provocam o rompimento da membrana celular conduzindo à desnaturação do ADN e à inactivação de proteínas celulares.

O método de extracção Chelex® 100 permite a obtenção de amostras com uma concentração final de ADN em solução entre 0,5 µL a 1,5 µL.

Após o procedimento de extracção, as amostras foram conservadas a -20°C, com o intuito de prevenir a degradação das moléculas de ADN em solução, até posterior utilização. (Butler 2009)

2.3. Tipagem dos marcadores Bialélicos (SNPs)

A amplificação (PCR) das amostras foi realizada com recurso ao kit de amplificação QIAGEN® Multiplex PCR. A versatilidade deste kit reflecte-se no facto de ser constituído por uma mistura de dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados), tampão de reacção, enzima polimerase e H₂O desionizada, permitindo a sua utilização em reacções de PCR com diferentes multiplexs de primers. Para um volume final de reacção de 10 µL foram adicionados 3 µL de RNase-Free Water, 5 µL de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 1 µL de mistura de primers específica de cada Multiplex (na qual os diferentes primers deverão estar a uma concentração de 2 µM) (Tabela 1) e 0,5 µL de amostra de ADN (com uma concentração média entre 0,5 µL a 1,5 µL). A reacção de PCR desenvolveu-se num termociclador, com uma desnaturação inicial a 96°C

durante 15 minutos, seguida de 35 ciclos de temperaturas (30 segundos a 94°C, 90 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 1 – Sequências dos primers dos vários multiplex utilizados.

Multiplex	Y-SNP	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Tamanho do fragmento de PCR (bp)
E	M96	GTGATGTGTAAC TTGGAAAACAGG	GGACCATATATTTTGCCATAGGTT	88
	M33	CACAACTTCATTGGCTACGG	GTTGAAGCCCCCAAGAGAGAC	190
	P2	GCTCCAGCCATCTTTTCCTTA	CTTCTCTCATGAGGGTTTTGGA	180
	M2	AAGTCCAGACCCAGGAAGGT	ACAGCTCCCCCTTTATCCTC	162
	M154	TACTCACACAAACCAAGAAGAAACA	AACCATTGTGTTACATGGCCTA	130
	M191	AAAAATGGAGTGTTTATCAGAGCTT	CCCAGACACACCAAATATCTC	122
	M35	GCATGGTCCCTTTCTATGGAT	GAGAATGAATAGGCATGGGTTC	198
	M78	GGATGGCTGTATGGGTTTCT	ATAGTGTTCCTTCACCTTTCTT	235
	M81	GCACTATCATACTCAGCTACACATCTC	AACCATTGTGTTACATGGCCTA	203
	M123	TGCTCTCAGGGGAAAATCTG	AGCAAAGTTGAGGTTGCACA	213
	V6	GATGGCACAGTGTTCGACAG	CTTCTCTCAAATGCCTGCT	102
	M293	AAAGAGATTGATCGGTGCATA	GCTGGCTAATACTCCACAGAG	230
M85	TGGCATCCAATACTAGCTGATAAAC	AATGCTCACGCTTGTGTTCT	283	
B	M168	GGAGTATGTGTTGGAGGTGAGT	CATCTCTTACCCAAACTGCTAAA	72
	M60	CCAACACTGAGCCCTGATG	GAGAAGGTGGGTGGTCAAGA	215
	M182	TTCAAAGACTTAAAGCAGTGGTTA	TGTGCCATCACACCATCTTT	176
	M150	AAGTGAGACTGGGCTTTGGA	AAGGAAGGGGAACAGAAGGA	235
	M109	GTCCCCAACTCTGCAACAAT	GGGTATCAAATGTCTTCAACCT	96
	M112	AAAAGCAAAAGAGAACTGCCTCT	TTCAATTCTTGTCTGTTGCAGAA	160
	M30	GTGTGGTAGACAGAACAGCAG	GCACAGCCAGATAACCCTAC	155
1	92R7	TGCATGAACACAAAAGACGTA	GCATTGTTAAATATGACCAGC	55
	M70	TCATAGCCCACTATACTTTGGAC	CTGAGGGCTGGACTATAGGG	81
	M22	GCTGATAGTCCTGGTTCCCTA	TGAGCATGCCTACAGCAGAC	106
	Tat	GACTCTGAGTGTAGACTTGTGA	GAAGGTGCCGTAAGTGTGAA	112
	P25	GGACCATCACCTGGGTAAAGT	AGTGCTTGTCCAAGGCAGTA	121
	SRY1532	TCCTTAGCAACCATTAATCTGG	AAATAGCAAAAAGTACACAAGGC	167
	M173	GCACAGTACTCACTTTAGGTTTGC	GCAGTTTTCCAGATCCTGA	172
	M213	GGCCATATAAAAACGCAGCA	TGAATGGCAAATTGATTCCA	208
	M9	GCAGCATATAAAAACCTTCAGG	AAAACCTAACTTTGCTCAAGC	340

Os primers e dNTP's remanescentes da reacção de amplificação em solução, foram posteriormente removidos, de modo a não interferirem com a subsequente reacção de minisequenciação. Para este efeito foi realizada uma purificação enzimática com ExoSAP-IT® (Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase) (USB Corporation), na qual se adicionou a 1 µL de produto de PCR, 0,5 µL de ExoSAP-IT®. A purificação foi realizada a 37°C durante 15 minutos, seguida de 15 minutos a 85°C, para inactivação total da enzima.

Após a purificação do produto de PCR, procedeu-se à minisequenciação ou extensão de uma única base (SBE - Single base extension), com recurso ao kit ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex (Applied Biosystem). À semelhança do kit de amplificação da Quiagen, o kit Snapshot contém apenas ddNTPs (di-desoxinucleótidos trifosfatados) marcados com diferentes fluorescências (Adenina – dR6G – verde; Guanina – dR110 - azul; Citosina – dTAMRA – amarelo; Timina – dROX - vermelho), tampão de reacção e enzima polimerase, tornando-o genérico para qualquer multiplex de primers de extensão, também denominados sondas. Estas são desenhadas de modo a haver uma ligação à zona da cadeia imediatamente precedente à posição do SNP a analisar. Deste modo, um único ddNTP irá ligar-se à base complementar, permitindo a detecção do SNP em causa (Figura 9). Para volume final de reacção de 5 µL por amostra, foi adicionado 1 µL de SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix, 1,5 µL de H₂O desionizada, 1 µL de mistura de sondas específicas para cada Multiplex (Tabela 2) e 1,5 µL de produto amplificado e purificado. A reacção ocorreu num termociclador, onde as amostras foram sujeitas a 25 ciclos de temperaturas (10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 30 segundos a 60°C). O produto final da reacção foi posteriormente purificado com 1 µL de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (USB Corporation), a 37°C durante uma hora, seguido de 15 minutos a 85°C para a inactivação da enzima.

Tabela 2 - Sequências das sondas dos vários multiplex utilizados.

Multiplex	Y-SNP	SBE Primer (5'→3')	Tamanho do fragmento de PCR (bp)
E	M96	CCCCCCCCCGTAACTTGGAAAACAGGTCTCTCATAATA	40
	M33	gtgccacgtcgtgaaagtctgacaaCAGTTACAAAAGTATAATATGTCTGAGAT	54
	P2	GCCCCCTAGGAGGAGAA	16
	M2	gtgccacgtcgtgaaagtctgacaaTTTATCCTCCACAGATCTCA	45
	M154	aaACATGGCCTATAATATTCAGTACA	26
	M191	ggtgccacgtcgtgaaagtctgacaaCATTTTTTCTTTACAACCTTGACTA	51
	M35	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGTCTCTGCCTGTGTC	36
	M78	CCCCCCCCCACAACCTTAACAAAGATACTTCTTTC	34
	M81	CCCCCTAAATTTTGTCTTTTTTTGAA	27
	M123	taggtgccacgtcgtgaaagtctgacaaTTCTAGGTATTAGGCGATG	48
	V6	gccacgtcgtgaaagtctgacaaTGCTGTGATTCTGATGTG	42
	M293	AAAGAGATTGATCGGTGCATA	21
	M85	CTTGTGTTCTATTAAGTGTAGTTTTGTTAG	30
B	M168	aagtctgacaaGGAGTATGTGTTGGAGGTGAGT	33
	M60	ACCACTGTGTGCCTGAT	18
	M182	tctgacaaGCAGTGGTTAATGTAAACAAA	29
	M150	gtgccacgtcgtgaaagtctgacaaGCCACACACACAGATAGAAGT	47
	M109	aaTCAAGGAAGTCAAGTCAATCCAAA	26
	M112	GAGGTGAGATAAAAACAAGCAGT	24
	M30	gtcgtgaaagtctgacaaCACCTTTTCCCAATATGATAATT	41
1	92R7	CCCCGCATGAACACAAAAGACGTAGAAG	28
	M70	CCCCCCCCTAGGGATTCTGTTGTGGTAGTCTTAG	34
	M22	CCGCCATTCTGGTGGCTCT	20
	Tat	CCCCCCCCCCCCCCCCCTCTGAAATATTAATTAACAAC	42
	P25	CCCCCCTCTGCCTGAAACCTGCCTG	26
	SRY1532	CCCCCTTGATCTGACTTTTTTACACAGT	30
	M173	CCCCCCCCCTTACAATTCAAGGGCATTTAGAAC	34
	M213	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTCAGAACTTAAAACATCTCGTTAC	45
	M9	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGAAACGGCCTAAGATGGTTGAAT	48

As amostras foram posteriormente aplicadas no sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem), onde ocorreu a electroforese capilar (Figura 9), e analisadas com o auxílio do software GeneMapper versão 3.2 (Applied Biosystem).

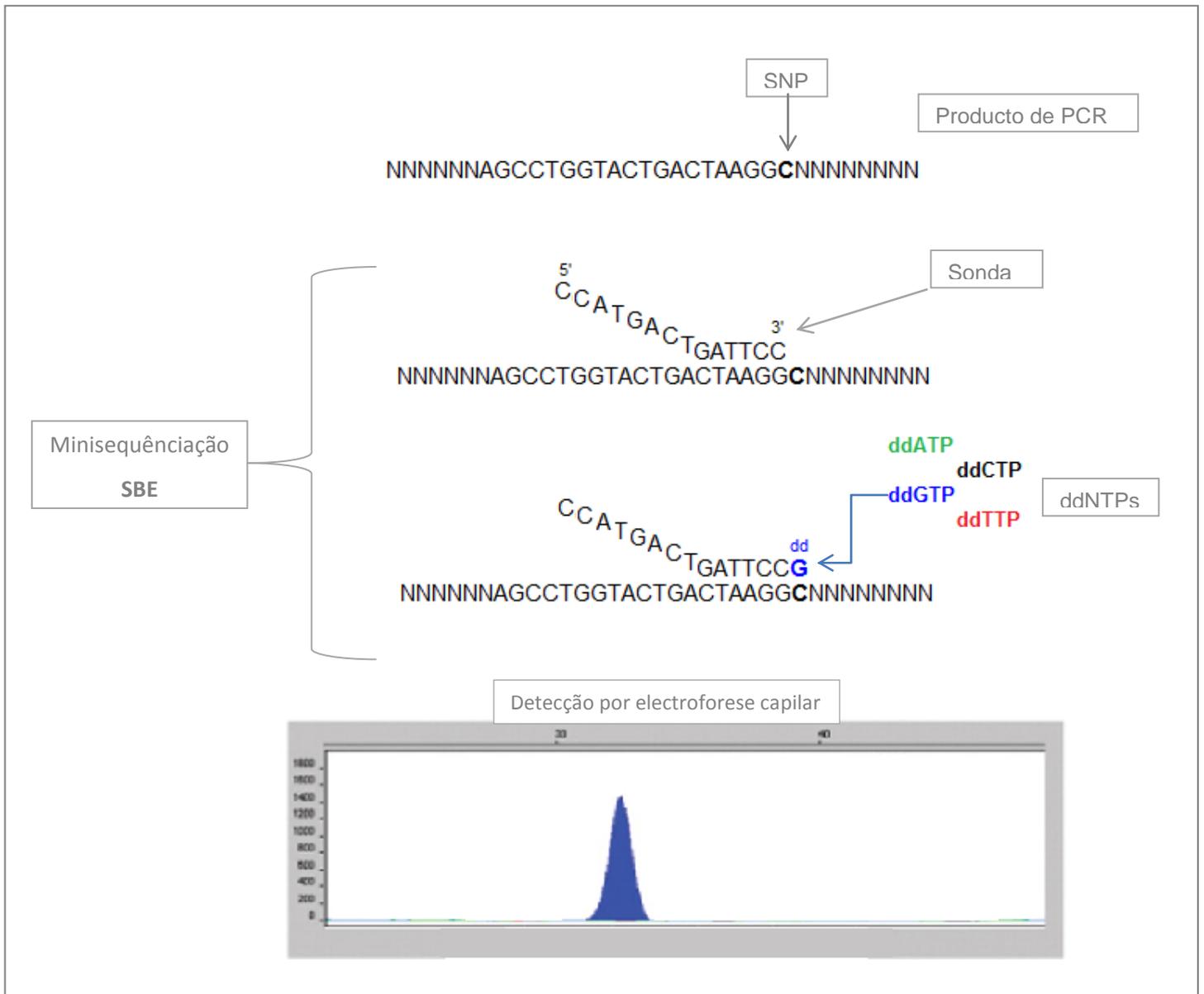


Figura 9 – Reacção de minisequenciação (SNaPshot) e representação do fragmento obtido por electroforese capilar.

2.4. Análise estatística

As frequências dos haplogrupos foram estimadas por contagem directa. A três etnias foram ainda comparadas com outras populações africanas e europeias. Para este efeito, foi calculado o grau de diferenciação (F_{ST}) entre as diversas populações, com base nas frequências dos haplogrupos. Este parâmetro foi obtido com recurso ao software Arlequin ver3.1 (Excoffier et al., 2005), resultando numa matriz de distâncias que reflecte a diversidade genética entre as populações analisadas. Para permitir um melhor visualização e interpretação dos resultados, foi desenvolvido um MDS (MultiDimensional Scaling) com base na matriz de distâncias genéticas, através do software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc. 2007). Neste modelo a duas dimensões, os objectos de estudo (populações) são representados por pontos. A distância entre os pontos determina o grau de semelhança entre os diferentes objectos de estudo. Deste modo, quanto maior for a correlação entre duas populações, menor a distância entre os pontos.

3. Resultados e Discussão

Nas amostras analisadas, tipadas para um total de 29 SNPs do cromossoma Y, foram definidos 9 haplogrupos diferentes. Os resultados apresentam-se em anexo nas tabelas A1, A2 e A3 e figura A1.

Nas amostras estudadas referentes à etnia Ovimbundu observou-se uma grande representação das linhagens paternas definidas pelo haplogrupo E (91%), característico das populações da costa ocidental da África subsariana. Foi ainda possível definir dois haplogrupos com menor representatividade o haplogrupo B (5%) e o haplogrupo R (2%) (Figura 10).

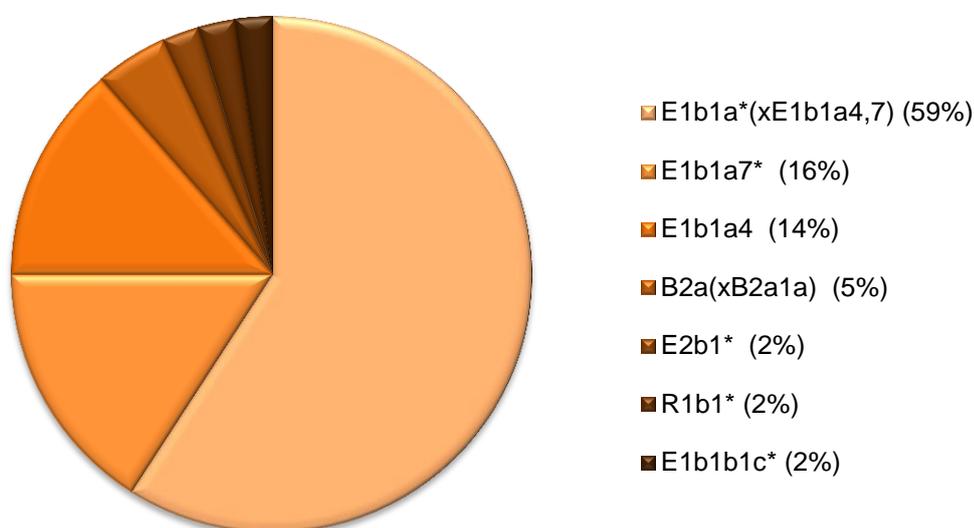


Figura 10 – Frequências dos haplogrupos definidos para SNPs do cromossoma Y na etnia Ovimbundu.

Na análise das amostras relativas à etnia Mbundu, e à semelhança dos dados obtidos para a etnia Ovimbundu, verificou-se que a grande maioria se define no Haplogrupo E (94%). Observou-se ainda uma representação minoritária das linhagens definidas pelo haplogrupo R (6%) (Figura 11).

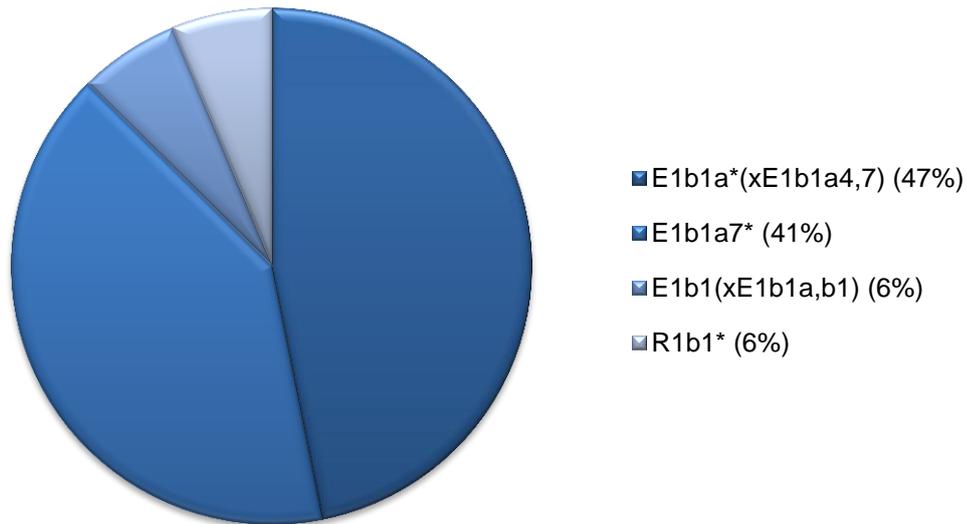


Figura 11 - Frequências dos haplogrupos definidos para SNPs do cromossoma Y na etnia Mbundu.

Na etnia Bakongo, os resultados observados estavam em concordância com os dados das etnias anteriormente referidas. Uma vez mais, verificou-se que as amostras estudadas se enquadravam, na sua maioria, nas linhagens definidas pelo haplogrupo E (90%). No entanto, nesta etnia observou-se uma maior representação do haplogrupo R (11%), quando comparada com as outras duas (Figura 12).

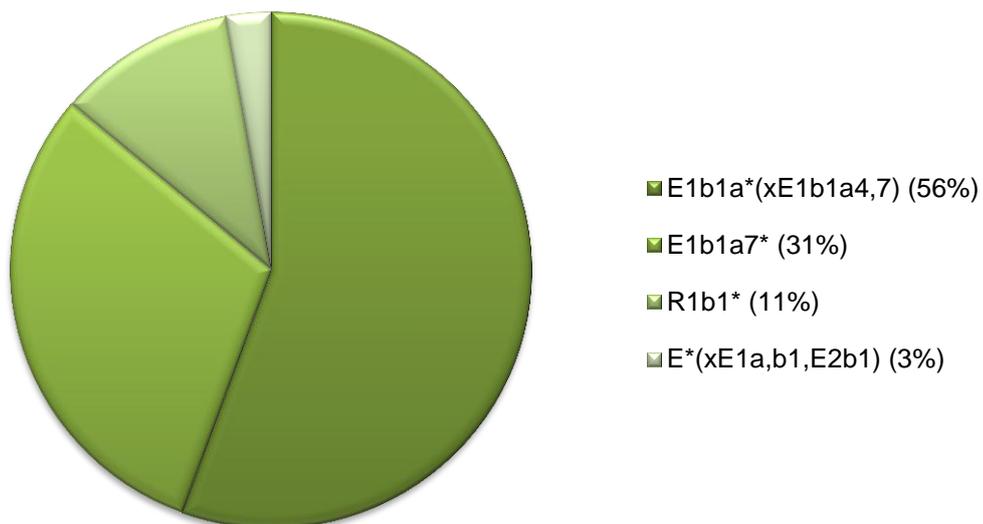


Figura 12 - Frequências dos haplogrupos definidos para SNPs do cromossoma Y na etnia Bakongo.

Haplogrupo E

O haplogrupo E é actualmente definido por 18 mutações principais (também denominadas de mutações diagnóstico), no entanto é possível determinar no total 83 polimorfismos e definir 56 linhagens paternas distintas. Por esta razão, este haplogrupo é o que apresenta uma maior diversidade em termos mutacionais, apresentando uma maior frequência nas populações da África subsariana. No entanto, é ainda possível observar, com menor frequência, linhagens definidas pelo haplogrupo E no resto do continente Africano, Médio Oriente, sul da Europa e ainda ocasionalmente no centro e sul da Ásia (Gomes et al. 2010; Karafet et al. 2008). Após a análise dos dados referente às três etnias estudadas, verificou-se que o haplogrupo E1b1a* [E1b1a*(xE1b1a4,7), E1b1a7*, E1b1a4] apresenta os valores de frequências mais elevados. Este haplogrupo é um reflexo da expansão Bantu que estará na origem da actual população angolana (Gomes et al. 2010).

Haplogrupo B

O haplogrupo B é definido por 4 mutações diagnóstico e actualmente permite caracterizar 17 linhagens paternas. Embora este haplogrupo esteja representado em populações da África subsariana, encontra-se essencialmente restrito a grupos étnicos de Pigmeus (Karafet et al. 2008). Este haplogrupo (B2a(xB2a1a)) foi definido em duas amostras da etnia Ovimbundu. Embora alguns autores refiram que esta linhagem possa estar relacionada com a expansão Bantu, este haplogrupo ainda não foi muito estudado. Será importante investigar novos polimorfismos neste haplogrupo com o intuito de clarificar as linhagens por ele definidas (Gomes et al. 2010).

Haplogrupo R

O haplogrupo R é caracterizado por 8 mutações diagnóstico. Com o total de 42 mutações, actualmente é possível definir 28 linhagens neste haplogrupo, maioritariamente representado em populações europeias. A presença deste haplogrupo (R1b1*) nas três etnias deverá estar relacionada com a colonização

européia. O mesmo foi já descrito por outros autores que constataram frequências elevadas em algumas populações da África central. (Brion et al. 2005; Karafet et al. 2008)

Estudo Comparativo

Com o intuito de fazer uma interpretação das linhagens paternas obtidas nas três etnias angolanas analisadas, foi realizado um estudo comparativo com populações europeias (Portugal continental, Açores, Espanha Itália e Alemanha) e africanas (Somália, Egito, Marrocos e Tunísia). Esta análise realizada com base nas diferenças genéticas entre as populações (F_{ST}), pode ser visualizada em MDS (Figura 13).

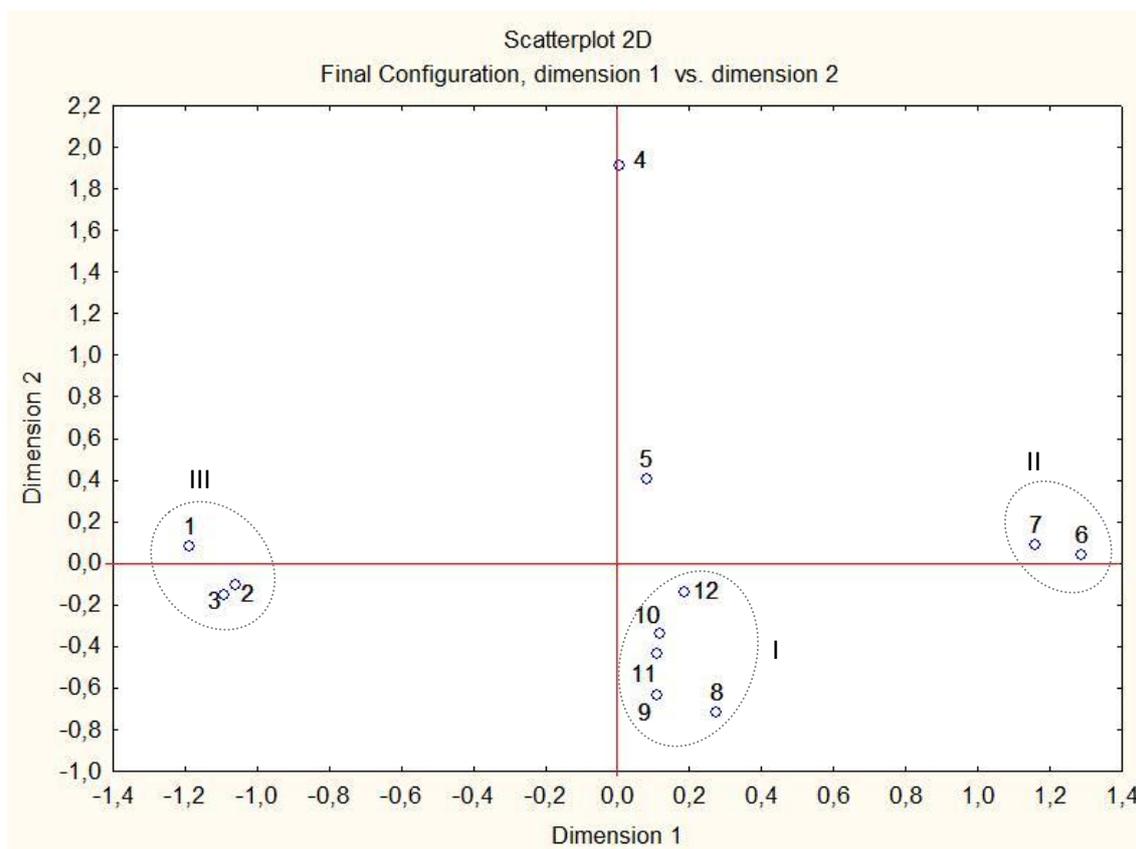


Figura 13 – MDS representativo das distâncias genéticas (F_{ST}) entre as etnias estudadas e as populações europeias e africanas utilizadas no estudo comparativo.

Legenda: 1: Ovimbundu
2: Bakongo
3: Mbundu
4: Somália (Sanchez et al. 2005)
5: Egito (Luis et al. 2004)
6: Marrocos (Onofri et al. 2008)
7: Tunísia (Onofri et al. 2008)
8: Portugal (Beleza et al. 2006)
9: Espanha (Flores et al. 2003)
10: Itália (Capelli et al. 2006; Capelli et al. 2007)
11: Alemanha (Guerreiro-Junior et al. 2009)
12: Açores (Gonçalves et al. 2005)

Na representação gráfica foi possível observar a formação de três grupos principais. O grupo I, formado pelas populações europeias, reflecte a proximidade genética entre as populações, em particular devido à elevada frequência do haplogrupo R, muito comum em populações europeias (Brion et al. 2005). As populações de Marrocos e Tunísia formam o grupo II. A proximidade deste grupo em relação às populações europeias reflecte-se por haver alguma representatividade nestas populações do haplogrupo R. A proximidade geográfica poderá estar na causa desta partilha genética, potenciando movimentos populacionais entre os dois continentes (Bosch et al. 2001). Estas populações são ainda definidas pelo haplogrupo J, característico de populações do norte de África (Onofri et al. 2008). A população da Somália aparece isolada das outras populações africanas. Embora esta população apresente elevados valores de frequência do haplogrupo E, é ainda possível encontrar uma grande representação das linhagens definidas pelo haplogrupo K2 (característico de populações da Oceânia, Indonésia, e Austrália) (Karafet et al. 2008). Na população do Egipto, para além do haplogrupo E foi também caracterizado com alguma representatividade o haplogrupo G, característico de populações do médio Oriente, o que está de acordo com a sua localização geográfica (Karafet et al. 2008). Como foi observado anteriormente, as três etnias estudadas (grupo III) são essencialmente definidas pelo haplogrupo E. Embora estas populações partilhem a herança genética de linhagens definidas pelo haplogrupo E com as restantes populações africanas (nomeadamente Egipto, Marrocos e Tunísia), a forte presença dos haplogrupos J e G nestas últimas estará na origem da distância genética entre os grupos populacionais. Algumas amostras referentes às três etnias foram ainda caracterizadas para o haplogrupo R, como maior representação nas etnias Bakongo e Mbundu, como se pode observar pela aproximação destas em relação às populações europeias, quando comparando com a população Ovimbundu.

4. Conclusão

Diversos estudos têm sido realizados em populações africanas com o intuito de caracterizar a diversidade genética do continente Africano, bem como clarificar os eventos demográficos que deram origem às actuais populações. A análise do cromossoma Y e o estudo das linhagens paternas têm contribuído em muito para esclarecer relações de ancestralidade entre diversas populações.

Várias populações de origem Bantu foram já caracterizadas para SNPs do cromossoma Y, ajudando a perceber os movimentos migratórios deste povo que esteve na origem de muitas populações africanas actuais, como é o caso de Angola. Embora a população angolana já tenha sido caracterizada para outros polimorfismos de ADN, até à data foram publicados um número reduzido de trabalhos com dados referentes aos SNPs do cromossoma Y (Beleza et al., 2005; Coelho e tal. 2009), não aludindo às etnias aqui estudadas.

Com este estudo pretendeu-se caracterizar as linhagens paternas das três principais etnias angolanas. Em concordância com os dados históricos, observou-se na amostragem populacional estudada uma predominância do Haplogrupo E, mais especificamente do E1b1a*. Estudos realizados noutras populações defendem que este haplogrupo terá surgido em consequência da expansão Bantu, sendo um reflexo desta migração populacional. Seguindo uma ordem cronológica, a presença do haplogrupo R1b1*, característico de populações europeias, uma vez mais vai de encontro à história da população. A colonização portuguesa no território actualmente conhecido como Angola terá contribuído para o surgimento de linhagens paternas definidas por este haplogrupo. No entanto a presença deste haplogrupo não é uniforme, com uma maior frequência nas etnias Bakongo e Mbundu. Como foi já referido, estas duas etnias terão tido uma maior influência e aproximação com o povo português, o que poderá explicar esta ocorrência.

Este estudo permitiu através da caracterização genética das linhagens paternas de Angola, elucidar quanto à sua origem e influências genéticas a que esteve sujeita.

Os dados resultantes deste trabalho serão ainda inseridos na YHRD (Y Chromosome Haplotype Reference Database), contribuindo para aumentar a base de dados referentes às populações da África subsariana, e em particular Angola, com a respectiva atribuição étnica.

Este trabalho contribuiu ainda para a implementação deste multiplex no Serviço de Genética e Biologia Forense, permitindo a sua utilização em trabalhos futuros. Este sistema possibilitará caracterizar outras populações que possam ser definidas para o haplogrupo E. Poderá também ter aplicações no campo forense, uma vez que a atribuição de uma etnia a um vestígio biológico poderá ser um dado importante na investigação criminal.

5. Bibliografia

- Beleza S., Gusmão L., Amorim A., Carracedo A. & A. Salas (2005). The genetic legacy of western Bantu migrations. *Human Genetics* 117(4): 366-75.
- Beleza S., Gusmão L., Lopes A., Alves C., Gomes I., Giouzele M., Calafell F., Carracedo A. & A. Amorim (2006). Micro-phylogeographic and demographic history of Portuguese male lineages. *Annals of Human Genetics* 70(Pt 2):181-94.
- Bosch E., Calafell F., Comas D., Oefner P.J., Underhill P.A. & J. Bertranpetit (2001). High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula. *The American Journal of Human Genetics* 68(4): 1019-29.
- Brion M., Sobrino B., Blanco-Verea A., Lareu M.V. & A. Carracedo (2005). Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. *International Journal of Legal Medicine* 119(1): 10-5.
- Brookes A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234(2): 177-86.
- Butler J.M., Coble M.D. & P.M. Vallone (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 3: 200-205.
- Butler J.M. (2009). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Elsevier.
- Capelli C., Redhead N., Romano V., Calì F., Lefranc G., Delague V., Megarbane A., Felice A.E., Pascali V.L., Neophytou P.I., Poulli Z., Novelletto A., Malaspina P., Terrenato L., Berebbi A., Fellous M., Thomas M.G. & D.B. Goldstein (2006). Population structure in the Mediterranean basin: a Y chromosome perspective. *Annals of Human Genetics* 70(Pt 2): 207-25.
- Capelli C., Brisighelli F., Scarnicci F., Arredi B., Caglia' A., Vetrugno G., Tofanelli S., Onofri V., Tagliabracci A., Paoli G. & V.L. Pascali (2007). Y chromosome genetic variation in the Italian peninsula is clinal and

supports an admixture model for the Mesolithic-Neolithic encounter. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(1): 228-39.

Carracedo A., Butler J.M., Gusmão L., Parson W., Roewer L. & P.M. Schneider (2010). Publication of population data for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics* 4(3): 145-7.

Clarence-Smith W.G. & J.K. Thornton (2011). Angola. *Encyclopedia Britannica*.

Coelho M., Sequeira F., Luiselli D., Beleza S. & J. Rocha (2009). On the edge of Bantu expansions: mtDNA, Y chromosome and lactase persistence genetic variation in southwestern Angola. *BMC Evolutionary Biology* 9:80.

Collelo T. (1991). *Angola, a Country Study*. U.S. Government Printing Office.

Excoffier L., Laval G., & S. Schneider (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.

Flores C., Maca-Meyer N., Pérez J.A., González A.M., Larruga J.M. & V.M. Cabrera (2003). A predominant European ancestry of paternal lineages from Canary Islanders. *Annals of Human Genetics* 67(Pt 2):138-52.

Goodwin W., Linacre A. & S. Hadi (2007). *An Introduction to Forensic Genetics*. Wiley.

Gomes V., Sánchez-Diz P., Amorim A., Carracedo A. & L. Gusmão (2010). Digging deeper into East African human Y chromosome lineages. *Human Genetics* (5): 603-13.

Gonçalves R., Freitas A., Branco M., Rosa A., Fernandes A.T., Zhivotovsky L.A., Underhill P.A., Kivisild T. & A. Brehm (2005). Y-chromosome lineages from Portugal, Madeira and Açores record elements of Sephardim and Berber ancestry. *Annals of Human Genetics* 44(1): 228-39.

- Gonçalves R., Spínola H. & A. Brehm (2007). Y-chromosome lineages in São Tomé e Príncipe islands: evidence of European influence. *American Journal of Human Biology* 19(3): 422-8.
- Guerreiro-Junior V., Bisso-Machado R., Marrero A., Hünemeier T., Salzano F.M. & M.C. Bortolini (2009). Genetic signatures of parental contribution in black and white populations in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* (1):1-11.
- Gusmão L. & A. Carracedo (2003). Y Chromosome-Specific STR. Profiles in *DNA* 6(1): 3-6.
- Halme R. (2006). Angola: Language Situation. *Encyclopedia of Language & Linguistics*, pp. 260-263.
- Hartl D.L. & G.C. Andrew (1997). *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc.
- Jobling M.A. & C. Tyler-Smith (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature Reviews Genetics* 4(8): 598-612.
- Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B., Underhill P.A., Zegura S.L. & M.F. Hammer (2008). New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Research* 18(5):830-8.
- Luis J.R., Rowold D.J., Regueiro M., Caeiro B., Cinniöglu C., Roseman C., Underhill P.A., Cavalli-Sforza L.L. & R.J. Herrera (2004). The Levant versus the Horn of Africa: evidence for bidirectional corridors of human migrations. *The American Journal of Human Genetics* 74(3): 532-44.
- Onofri V., Alessandrini F., Turchi C., Pesaresi M. & A. Tagliabracci (2008). Y-chromosome markers distribution in Northern Africa: High-resolution SNP and STR analysis in Tunisia and Morocco populations. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1: 235-236.

- Sanchez J.J., Hallenberg C., Børsting C., Hernandez A. & N. Morling (2005). High frequencies of Y chromosome lineages characterized by E3b1, DYS19-11, DYS392-12 in Somali males. *European Journal of Human Genetics* 13(7): 856-66.
- StatSoft Inc. (2007). *Statistica data analysis software system version 8.0*.
- Walsh, P.S., Metzger, D. A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10(4): pp.506-513.
- Willuweit S. & L. Roewer (2007). Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Science International: Genetics* 1(2): 83-7.
- Y Chromosome Consortium (2002). A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Research* 12(2): 339-48.

Anexos

Tabela 1A – Resultados obtidos na etnia Ovimbundu, para os SNPs do cromossoma Y estudados (“-“ forma ancestral; “+” forma mutada; “-1” a amostra não foi analisada para esse marcador).

Amostra	M96	M33	P2	M85	M2	M35	M154	M191	M78	M81	M123	V6	M293	M213	M9	M22	Tat	92R7	M70	M173	SRY1532	P25	M60	M168	M182	M150	M112	M109	M30	Haplogupo
Ov1	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov2	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov3	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov4	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov6	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov7	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov8	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov9	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov10	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov11	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov12	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov13	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov14	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov15	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov16	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov17	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov18	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov19	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov20	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov21	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov22	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov23	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov24	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov25	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov26	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ov27	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ov28	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ov29	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ov30	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ov31	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ov32	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ov33	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ov34	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a4
Ov35	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a4
Ov36	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a4
Ov37	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a4
Ov38	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a4
Ov39	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a4
Ov40	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1b1c*
Ov41	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E2b1*
Ov42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	R1b1*
Ov43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	B2a(xB2a1a)
Ov44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	B2a(xB2a1a)

Tabela 2A – Resultados obtidos na etnia Mbundo, para os SNPs do cromossoma Y estudados (“-“ forma ancestral; “+” forma mutada; “-1” a amostra não foi analisada para esse marcador).

Amostra	M96	M33	P2	M85	M2	M35	M154	M191	M78	M81	M123	V6	M293	M213	M9	M22	Tat	92R7	M70	M173	SRY1532	P25	Haplogupo	
Mb1	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb2	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb3	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb4	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb6	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb7	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb8	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb9	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb10	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb11	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb12	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb13	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb14	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb15	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Mb16	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb17	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb18	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb19	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb20	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb21	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb22	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb23	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb24	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb25	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb26	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb27	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb28	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Mb29	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1(xE1b1a,b1)
Mb30	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1(xE1b1a,b1)
Mb31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	R1b1*
Mb32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	R1b1*

Tabela 3A – Resultados obtidos na etnia Bakongo, para os SNPs do cromossoma Y estudados (“-” forma ancestral; “+” forma mutada; “-1” a amostra não foi analisada para esse marcador).

Amostra	M96	M33	P2	M85	M2	M35	M154	M191	M78	M81	M123	V6	M293	M213	M9	M22	Tat	92R7	M70	M173	SRY1532	P25	Haplogupo
Ba1	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba2	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba3	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba4	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba6	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba7	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba8	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba9	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba10	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba11	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba12	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba13	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba14	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba15	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba16	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba17	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba18	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba19	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba20	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a*(xE1b1a4,7)
Ba21	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba22	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba23	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba24	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba25	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba26	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba27	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba28	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba29	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba30	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba31	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E1b1a7*
Ba32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	E*(xE1a,b1,E2b1)
Ba33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	R1b1*
Ba34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	R1b1*
Ba35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	R1b1*
Ba36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	R1b1*

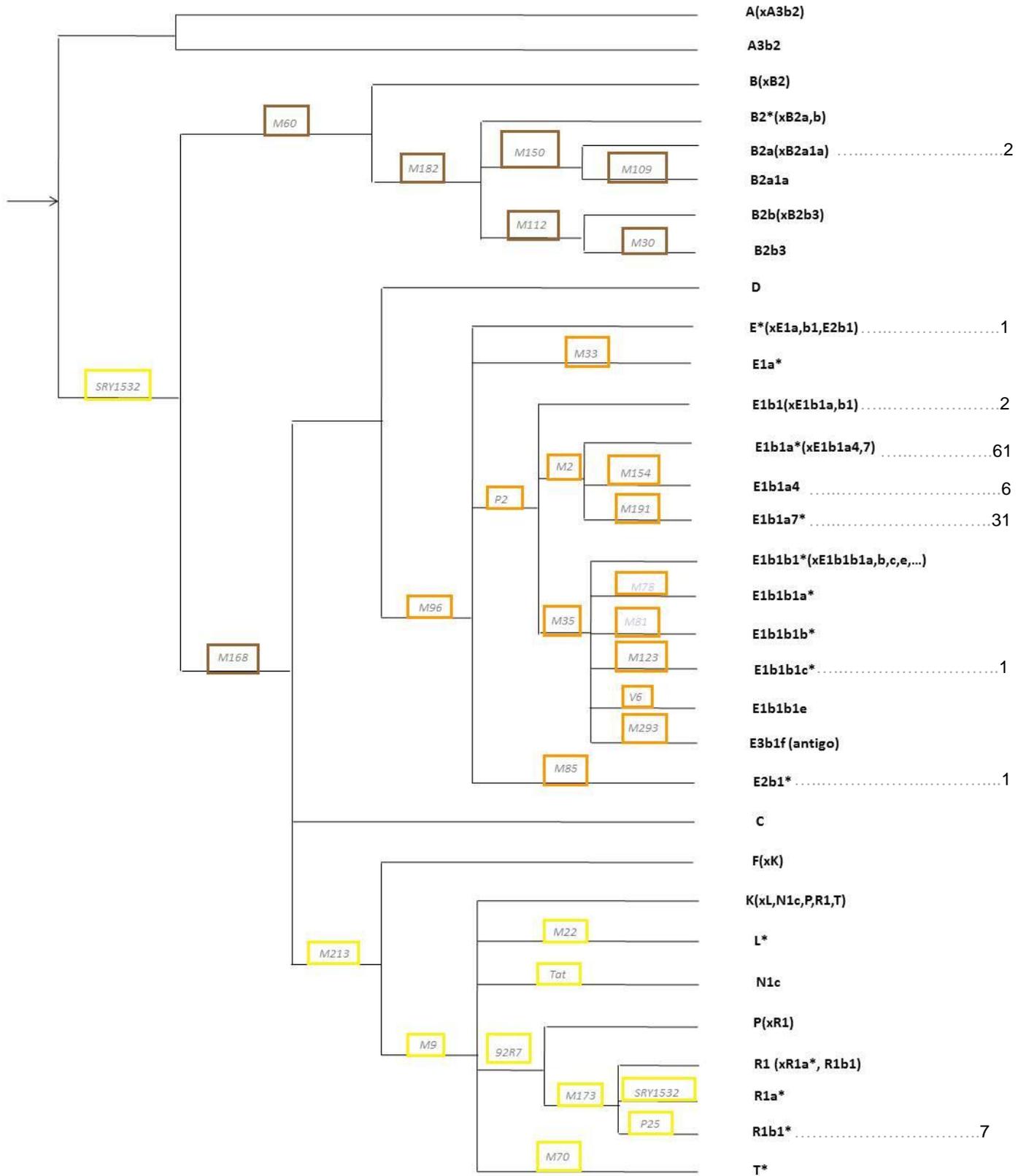


Figura A1 – Representação adaptada da árvore de Karafet et al. (2008), onde são apresentados os haplogrupos definidos nas amostras estudadas para SNPs do cromossoma Y (N – número de amostras).