



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Legado Genético do Cromossoma Y

Caracterização do haplogrupo J em amostras de origem
portuguesa com foco na zona centro

Joana Isabel Silva de Albuquerque

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Legado Genético do Cromossoma Y

Caracterização do haplogrupo J em amostras de origem
portuguesa com foco na zona centro

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Evolução e Biologia Humanas, realizada sob a orientação científica do Doutor Licínio Manco (Universidade de Coimbra).

Joana Isabel Silva de Albuquerque

2014

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is most adaptable to change.”

Charles Darwin

Agradecimentos

A vida é feita de etapas e o sucesso de cada um delas não é possível sem estarmos rodeados de quem nos apoia e acredita em nós. Este trabalho é o final de uma dessas etapas e não podia passar sem apresentar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que de algum modo contribuíram positivamente para o sucesso da mesma e que marcaram esta minha passagem.

Ao Professor Doutor Lícínio Manco, mentor do projeto e orientador da dissertação, pelo imenso apoio, atenção, dedicação e ensinamentos prestados durante todo o processo.

Aos meus amigos do “Oh Bío Bío” pelo Bot’Abaixo, pela Biotuna, pelos sorrisos, pela preocupação, pelos mil copos... Em especial, à Raquel Tavares por ter estado (quase) desde o primeiro dia, à Eliana Soukiazes pela pessoa que é, à Nádía Marques (minha afilhada) pelo que se tornou para mim e à minha pessoa, Catarina Gomes!

À Estudantina Feminina de Coimbra pelo que produzimos, pelo que significamos, pelas partilhas...

Aos amigos de sempre e aos que hão-de ficar... (Diana Amaral estás aqui!)

E, por último e mais importante, à minha família! Ao meu Pai, à minha Mãe, ao meu mano, à minha prima/irmã e aos meus avós... cada um com o seu contributo e todos a contribuir para o mesmo sucesso. Obrigada por me proporcionarem as condições necessárias e por estarem sempre cá!

A todos e a cada um, o meu mais sincero

Muito Obrigada!

Resumo

Portugal revela um particular interesse na análise genética de populações modernas devido à complexidade da sua história nos últimos dois milénios, que envolveu uma estadia a longo prazo de populações bastante distintas ao nível da sua origem geográfica, religião e cultura. O grande contributo para o legado genético português terá sido o processo de povoamento paleolítico a partir do Médio Oriente (Pré-história), no entanto eventos como a difusão démica da agricultura no Neolítico e, mais tarde, a presença dos celtas na Idade do Ferro, as migrações fenícias e gregas, a ocupação romana, a chegada de Judeus, as invasões germânicas e a presença de Árabes-Berberes, também parecem ter contribuído para o *pool* genético.

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização do haplogrupo J-M304 numa amostra populacional portuguesa no sentido de tentar estabelecer uma relação entre a presença deste haplogrupo e seus subtipos com eventos históricos ou demográficos ocorridos no passado.

Para este trabalho, uma amostra de 324 indivíduos do sexo masculino de naturalidade Portuguesa, com distribuição por várias regiões de Portugal (maioritariamente zona centro) foi estudada para 12 Y-SNPs (M9, M304, M267, M172, M365, P56, P58, M410, M12, P55, M205, M241) e 7 Y-STRs (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393).

Registaram-se frequências de 9,9% para o haplogrupo J-M304 na amostra total (324 indivíduos), dos quais 1,9% corresponde a J1-M267 e 8,0% a J2-M172.

O estudo de um total de 56 indivíduos classificados como J-M304 (32 neste estudo e 24 previamente genotipados) permitiu identificar no sub-haplogrupo J1-M267 pelo menos três subtipos: J1*-M267 (21,1%), J1a1-M365 (5,3%) e J1a2b-P58 (73,6%); e no sub-haplogrupo J2-M172 dois subtipos: J2a-M410 (75,7%) e J2b2-M241 (24,3%).

A análise de STRs revelou a presença de sinais de colonização fenícia, previamente descritas na literatura, em três amostras da Beira litoral J1-M267 e J2-M172, o que sugere uma possível influência das expansões marítimas na antiguidade provenientes do Médio Oriente nesta região litoral do país. Três amostras J1a2b-P58 revelaram ser compatíveis com um haplótipo modal associado aos Judeus. Uma amostra proveniente do Minho J1a1-M365 revelou um haplótipo que parece estar associado a proveniência germânica ou alana, provavelmente com origem nas invasões bárbaras pós-queda do Império Romano.

Em conclusão, este estudo sugere que uma análise mais extensa a nível haplotípico, bem como o aumento de amostragem, poderão ser relevantes no esclarecimento mais aprofundado das diversas linhagens do cromossoma Y em Portugal, e em particular para o haplogrupo J-M304, de modo a confirmar as suas prováveis origens históricas.

Palavras-chave: Portugal; Haplogrupo J-M304; Linhagens; Origem histórica.

Abstract

Portugal shows a particular interest in the genetic analysis of modern populations due to the complexity of its history over the past two millennia, which involved a long-term stay of quite distinct populations in terms of their geographical origin, religion and culture.

The major contribution to the Portuguese genetic legacy has been the Paleolithic settlement process from the Middle East (Prehistory), however events such as the demic diffusion of agriculture in the Neolithic and later, the presence of the celts in the Age of Iron, the phoenician and greek migrations, the roman occupation, the arrival of Jews, the germanic invasions and the presence of Arab-Berber, also appear to have contributed to the gene pool.

The present study aimed to characterize the haplogroup J-M304 in a portuguese population sample in order to try to establish a relationship between the presence of this haplogroup and its subtypes with historical or demographic events in the past.

For this work, a sample of 324 males of portuguese nationality, with distribution through various regions of Portugal (mainly Central Zone) was studied for 12 Y-SNPs (M9, M304, M267, M172, M365, P56, P58, M410, M12, P55, M205, M241) and 7 Y-STRs (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393).

A frequency of 9,9% was found for haplogroup J-M304, in the total sample (324 individuals), of which 1,9% corresponds to J1-M267 and 8,0% to J2-M172.

The study of a total of 56 individuals classified as J-M304 (32 from this study and 24 previously genotyped) allowed to identify in the sub-haplogroup J1-M267 at least three subtypes: J1*-M267 (21,1%), J1a1-M365 (5,3%) and J1a2b-P58 (73,6%) and in the sub-haplogrupo J2-M172 two subtypes: J2a-M410 (75,7%) and J2b2-M241 (24,3%).

The analysis of STRs revealed the presence of Phoenician colonization signals, previously described in the literature, in three samples J1-M267 and J2-M172 from Beira Litoral, suggesting a possible influence of maritime expansions from the Middle East in this coastal region of the country. Three samples J1a2b-P58 showed to be compatible with a modal haplotype associated with Jews. A sample from the Minho J1a1-M365 revealed an haplotype that appears to be associated with Germanic or Alans migrations, probably with origin in the barbaric invasions post-fall of the Roman Empire.

In conclusion, this study suggests that a more extensive haplotype analysis, as well as an increase sampling, may be relevant in further clarification of the various lineages of the Y-chromosome in Portugal, and in particular for the haplogroup J-M304, confirming their likely historical origins.

Key-words: Portugal, Haplogroup J-M304, Lineages, Historical Origin.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	x
Abreviaturas e siglas	xi
INTRODUÇÃO	1
1. Genética Populacional – conceito e contextualização histórica	2
2. Cromossoma Y	3
3. Haplogrupo J	4
4. Objetivos.....	7
MATERIAL E MÉTODOS	8
1. Amostra populacional.....	9
2. Extração de ADN.....	9
2.1. Extração de ADN por FavorPrep Genomic DNA Mini Kit.....	10
3. Marcadores Bialélicos ou SNPs (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)	10
3.1. PCR – Polymerase Chain Reaction.....	13
3.2. RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism	15
3.3. Electroforese em gel de poliacrilamida.....	15
3.4. Sequenciação.....	16
4. Análise STRs (<i>Short Tandem Repeats</i>) ou Marcadores Multialélicos	17
5. Análise estatística	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
1. Identificação de haplogrupos – Marcadores Bialélicos.....	19
2. Identificação de Short Tandem Repeats (STRs).....	25
3. Frequências obtidas das linhagens do haplogrupo J-M304 e comparação com outras populações	26
4. Análise de Marcadores Multialélicos – STRs	30
5. Análise filogeográfica.....	37
5.1. Haplogrupo J.....	37
5.2. Sub-haplogrupo J1	38
5.3. Sub-haplogrupo J2	41
CONCLUSÕES	43
BIBLIOGRAFIA	46
ANEXOS	51
ANEXO 1 – Protocolo Extração de ADN por <i>FavorPrep Genomic DNA Mini Kit</i> . 52	
ANEXO 2 – Protocolo de coloração <i>Silver-Staining</i>	53
ANEXO 3 (Tabela 6)	54

Índice de figuras

Figura 1. Mapa identificativo das zonas geográficas com maior presença do haplogrupo J.....	6
Figura 2 – Figura representativa de Portugal enfatizando as regiões das quais foram analisadas amostras para este trabalho	9
Figura 3: Árvore filogenética do cromossoma Y apresentando os marcadores bialélicos utilizados na identificação do haplogrupo J e seus subgrupos	12
Figura 4 – Exemplo de um resultado obtido de PCR - Electroforese em gel de agarose de amostras amplificadas para o marcador M9	20
Figura 5 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição Hinf I para o marcador M9	21
Figura 6 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição Tsp 45I para o marcador M304 que define o haplogrupo J.	21
Figura 7 – Sequenciação do fragmento de estudo para o marcador M267 que define o haplogrupo J1	22
Figura 8 – Sequenciação do fragmento de estudo para o marcador M365	22
Figura 9 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição Dde I para o marcador P58 que define o subtipo J1a2b	23
Figura 10 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição Hpy 188I para o marcador M410 que define o haplogrupo J2a.....	23
Figura 11 – Sequenciação do fragmento de estudo para os marcadores M12 (A) e M241 (B).....	24
Figura 12 – Figura exemplificativa de Multiplex 1.....	25
Figura 13 – Figura exemplificativa de Multiplex 2.....	25
Figura 14 – Frequência do haplogrupo J e seus subtipos identificados na amostra populacional estudada (n=324) – são apenas apresentados os marcadores estudados... ..	26
Figura 15 – Mapa da zona centro de Portugal com distribuição geográfica (por número de indivíduos) obtida para o haplogrupo J (J1-M267 e J2-M172).	27
Figura 16 – Frequência dos subtipos do sub-haplogrupo J1-M267, (inclui amostras previamente genotipadas)	28

Figura 17 – Frequência dos subtipos do sub-haplogrupo J2-M172, (inclui amostras previamente genotipadas).....	29
Figura 18 – Multidimensional scaling (MDS) baseado nos valores de FST de distância genética entre populações com base nos dados dos STRs estudados em amostras do haplogrupo J-M304 (marcador M304), obtidas na zona centro de Portugal.....	30
Figura 19 – Multidimensional scaling (MDS) baseado nos valores de FST de distância genética entre populações com base nos dados dos STRs estudados em amostras do sub-haplogrupo J1-M267 (marcador M267), obtidas em Portugal.....	31
Figura 20 – Multidimensional scaling (MDS) baseado nos valores de FST de distância genética entre populações com base nos dados dos STRs estudados em amostras do sub-haplogrupo J2-M172 (marcador M172), obtidas na zona centro de Portugal.....	32
Figura 21 – <i>Median-joining network</i> para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J1-M267.....	33
Figura 22 – <i>Median-joining network</i> para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J1-M267, apenas para as regiões de Portugal.....	34
Figura 23 – <i>Median-joining network</i> para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J2-M172.....	35
Figura 24 – <i>Median-joining network</i> para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J2-M172, apenas para as regiões de Portugal.....	36
Figura 25 – Mapa de projeção da presença do haplótipo J1a1-M365 no Mundo, obtido na base de dados Y-HRD.....	40
Figura 26 – Mapa Península Ibérica no séc. V ocupada pelos povos germânicos pós-invasões bárbaras.....	40

Índice de tabelas

Tabela 1 – Mistura da reação para amplificação por PCR das regiões do cromossoma Y	13
Tabela 2 – Dados relativos aos <i>primers</i> utilizados no estudo dos marcadores bialélicos, com indicação do tamanho dos fragmentos amplificados, temperatura de <i>annealing</i> e respetiva referência bibliográfica	14
Tabela 3 – Marcadores bialélicos estudados por RFLP com as respetivas enzimas, temperatura de digestão, polimorfismos e tamanho (em pb) dos fragmentos obtidos após digestão.....	15
Tabela 4 – Características dos Y-STRs estudados	17
Tabela 5 – Protocolo QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen).....	17
Tabela 6 (Anexo 3) – Haplótipos obtidos pela análise dos Y-STRs :DYS19, DYS389I, DYS389IIb, DYS390, DYS392, DYS393 com apresentação do respetivo haplogrupo e indicando a presença dos sinais fenícios definidos por Zalloua <i>et al.</i> (2008).	55
Tabela 7 – Frequências obtidas (%) do haplogrupo J-M304 e seus subtipos por distritos de Portugal, apresentando também frequências obtidas de outras populações por outros autores.....	27

Abreviaturas e siglas

a.C. – antes de Cristo

ADN – Ácido desoxirribonucleico

C – Celcius

d.C. – depois de Cristo

ddNTPs – Didesoxirribonucleotídeos trifosfatados

dNTPs – Desoxirribonucleotídeo trifosfatados

h – horas

ISOGG – International Society of Genetic Genealogy

MDS – Multidimensional scaling

min. – minutos

ml – mililitros

ng – nanogramas

NRY – Non-recombining region of the Y-chromosome

pb – pares de bases

PCR – Polymerase chain reaction

PCS – Phoenician colonization signal

pH – Potencial de hidrogénio

rpm – rotações por minuto

séc. - século

seg. – segundos

SNP – Single nucleotide polymorphisms

SRY – Sex determining region Y

STR – Short tandem repeats

V – Volts

YCC – Y-Chromosome Consortium

INTRODUÇÃO

1. Genética Populacional – conceito e contextualização histórica

A genética populacional ou genética de populações é um ramo da biologia que estuda a distribuição e as alterações nas frequências alélicas. Estas alterações surgem pela influência de quatro diferentes processos evolutivos: seleção natural, deriva genética, mutação e fluxo genético.

A genética populacional surgiu num culminar de trabalhos dos investigadores Fisher, Haldane e Wright, considerados os fundadores desta disciplina (Gillespie, 1998). Fisher, com o seu trabalho que originou o livro *The Genetical Theory of Natural Selection* (1930), mostrou que a variação contínua podia ser produzida pela ação combinada de muitos genes discretos, e que a seleção natural podia modificar as frequências alélicas numa população, resultando em evolução. Haldane com o seu trabalho com *Biston betularia* mostrou que a evolução se dava a taxas ainda mais elevadas do que Fisher tinha mostrado e, finalmente, Wright introduziu o conceito de paisagens de aptidão, que permite visualizar a relação entre genótipos e/ou fenótipos e o seu sucesso de replicação (Bowler, 2003; Larson, 2004).

Desde o surgimento deste ramo que a diversidade genética de populações tem vindo a ser alvo de vários estudos, e com isto surgem os primeiros marcadores clássicos que permitem a sua execução. A maioria destes marcadores focou-se na identificação de variações de grande amplitude e a sua interpretação ao nível de grandes eventos da Pré-História (Richards *et al.*, 1996). As relações, daqui concluídas, são perfeitamente plausíveis tendo em conta que esses eventos ocorreram quando o tamanho populacional era muito reduzido tornando os efeitos deste tipo de contribuições genéticas muito grandes e podendo, assim, serem detectáveis no presente. Grande objeto destes estudos têm sido as populações humanas da Europa (Adams *et al.*, 2008).

A Europa, durante a sua História, foi alvo de migrações e invasões que poderão ter desempenhado um papel importante na formação dos atuais padrões de diversidade genética. Estes factos tornam também mais difícil distinguir as diferentes contribuições genéticas e sua respetiva origem (Rower *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2008).

A análise genética de populações modernas permite reconhecer o impacto das migrações e das invasões especialmente quando as populações *fonte* estão claramente diferenciadas das populações *recipiente* (Adams *et al.*, 2008). A Península Ibérica tem um particular interesse a este nível devido à complexidade da sua história nos últimos

dois milénios e que envolveu uma estadia a longo prazo de populações bastante distintas ao nível da sua origem geográfica, assim como a nível religioso e cultural (Roewer *et al.*, 2005; Pereira e Ribeiro, 2009).

O grande contributo para o legado genético português terá sido o mais antigo - o processo de povoamento paleolítico a partir do Médio Oriente (Pré-história) - onde o Homem Moderno vem substituir progressivamente o Homem Neandertal (há cerca de 40.000 anos) (Pereira e Ribeiro, 2009). Na era Neolítica deu-se a chamada difusão démica da agricultura, também a partir do Médio Oriente (acerca de 7.000 anos). Ainda de relevância a nível cultural e, em muitos casos, contribuindo para o *pool* genético temos, mais tarde, a presença dos celtas na Idade do Ferro, as migrações fenícias e gregas durante o primeiro milénio a.C. devido ao seu comércio marítimo, o período de ocupação romana na Idade Antiga, a chegada dos Judeus originários de tribos israelitas (Judeus sefarditas), as invasões germânicas (suevos, vândalos e alanos) pós-queda do Império Romano pela altura da Idade Média e, ainda, a presença mais recente de Árabes-Berberes no território a partir do séc. VIII.

2. Cromossoma Y

O cromossoma Y é o cromossoma sexual masculino e os seus genes, localizados na sua maioria na região não-recombinante (NRY), tendem a estar associados a funções na determinação do sexo (gene SRY) e no seu desenvolvimento. Os estudos de genética populacional envolvendo os polimorfismos do cromossoma Y têm sido relevantes porque permitem conhecer o legado genético paterno da linhagem humana desde a antiguidade até ao presente (Lahn *et al.*, 2001).

O que confere ao cromossoma Y esta capacidade de preservação do legado genético são os polimorfismos localizados na sua região não recombinante que permitem inferências sobre a evolução, história e demografia humanas, e medir afinidades entre populações (Hammer e Zegura, 1996). Os polimorfismos descritos no cromossoma Y, com diferentes taxas e mecanismos de mutação, podem ser bialélicos (sendo os mais comuns conhecidos por SNPs-*single nucleotide polymorphisms*) e multialélicos (conhecidos por STRs-*short tandem repeats*) (Underhill *et al.*, 2000). Os polimorfismos denominados SNPs ou marcadores bialélicos são criados por mutações

raras caracterizadas pela substituição de um único nucleótido na sequência de ADN. Os marcadores multialélicos consistem em sequências repetitivas múltiplas em determinados *loci* com um número de repetições variável. Nos estudos do cromossoma Y, os SNPs permitem definir o haplogrupo do indivíduo através da sua mutação (alelo derivado), enquanto os STRs permitem definir haplótipos e medir o grau de variação dentro de um mesmo haplogrupo o que possibilita inferir acerca da sua possível origem (Francalacci e Sanna, 2008).

Segundo ISOGG (International Society Of Genetic Genealogy) a árvore filogenética do cromossoma Y identifica os principais haplogrupos com as letras do abecedário de A a T e estes estão subdivididos em ramos. A nomenclatura criada em 2008 pelo YCC (Y-Chromosome Consortium), e publicada por Karafet *et al.* (2008), inclui 311 haplogrupos e sub-haplogrupos diferentes resultantes de 599 eventos mutacionais. Entre eles é apresentado o nosso haplogrupo de interesse - o haplogrupo principal J - com 34 sub-haplogrupos e 42 eventos mutacionais.

3. Haplogrupo J

O haplogrupo J tem a sua origem focada no Médio Oriente, é caracterizado pela mutação M304 (A<C), e bifurca-se em 2 sub-haplogrupos principais: J1-M267 e J2-M172 (Chiaroni *et al.*, 2010). A difusão démica dos agricultores que se deu no Neolítico para a Europa com origem no Médio Oriente parece ter afetado as frequências destes subhaplogrupos pois ambos apresentam um gradiente decrescente dos diferentes países do Médio Oriente para a Europa Ocidental (Underhill *et al.*, 2001).

O sub-haplogrupo J1-M267 apresenta maior frequência no Médio Oriente, Norte de África e Etiópia (Figura 1). Foram feitos, até à data, vários estudos acerca deste haplogrupo que permitem tal conclusão. Como exemplos, para o Norte de África, Semino *et al.* (2004) apresentam percentagens elevadas deste sub-haplogrupo na Argélia (35%) e na Tunísia (30,1%) e Tofanelli *et al.* (2009) apresentam para o Sudão, mais precisamente em Khartoum (capital), uma percentagem elevadíssima de J1-M267 (74,3%). No que concerne à Etiópia, para um grupo étnico designado Amhara, Chiaroni *et al.* (2010) revelou uma percentagem também significativa ($\approx 29\%$). Finalmente, quanto ao Médio Oriente, como exemplo, novamente Chiaroni *et al.* (2010) que

apresentam uma percentagem de 33,3% para a Arábia Saudita e Regueiro *et al.* (2006) que apresentam uma percentagem de 11,3% para o Sul do Irão.

Na Europa o sub-haplogrupo J1-M267 encontra-se, principalmente, em regiões junto ao Mar Mediterrâneo, o que pode ser explicado, segundo Capelli *et al.* (2006), pelas expansões marítimas, provavelmente desempenhadas pelos povos do Médio Oriente incluindo fenícios e gregos no 1º milénio a.C.. Através do trabalho de King *et al.* (2008), verificamos frequências um pouco acima da média na Grécia (5,3%). O mesmo é evidente em Portugal através do estudo feito por Gonçalves *et al.* (2005) onde no sul a taxa é superior ao resto do país (7% no Sul de Portugal *versus* 5,9% em Portugal total). Para este sub-haplogrupo Beleza *et al.* (2006) encontrou frequências de 3,7% para o total do país e frequências superiores de 6,2% no Alentejo. No estudo de Martiniano *et al.* (2013) realizado no distrito de Coimbra, com uma amostra populacional proveniente sobretudo da zona litoral do distrito, foi estimada uma frequência de 7,2% para J1-M267.

O sub-haplogrupo J2-M172 dispersou-se mais pela Europa que o J1-M267. Este sub-haplogrupo parece ter a sua origem mais focada numa região designada Anatólia ou, também conhecida como, Ásia Menor (Figura 1) e é nesta que apresenta frequências mais elevadas, e tal como J1-M267, também em zonas do litoral Mediterrâneo (Semino *et al.*, 2004). A maior dispersão pela Europa do sub-haplogrupo J2-M172 é possível ser verificada através de vários estudos, tais como o de Capelli *et al.* (2007) que usaram várias amostras populacionais de diferentes zonas de Itália e obtiveram frequências relativamente elevadas (8% - 35%) e o de Di Giacomo *et al.* (2003) que estudou amostras populacionais em Itália e Grécia onde obtiveram frequências também elevadas (20,6% e 18,1%, respetivamente). O trabalho de Nogueiro *et al.* (2010) realizado com uma amostra populacional de Trás-os-Montes de ascendência Judaica, caracterizados com base numa combinação de critérios geográficos, religiosos, etno-históricos e individuais, registou uma frequência de 24,5% para o sub-haplogrupo J2-M172. Gonçalves *et al.* (2005) estimaram, para Portugal total, uma prevalência de 6,9% e, ainda no estudo de Beleza *et al.* (2006) estimou-se uma frequência de 7% para o sub-haplogrupo J2-M172 no conjunto do país. Para o distrito de Coimbra, o trabalho de Martiniano *et al.* (2013) estimou uma frequência de 8,8%.



Figura 1. Mapa identificativo das zonas geográficas com maior presença do haplogrupo J (sub-haplogrupo J1-M267, sub-haplogrupo J2-M172) – Médio Oriente, Norte de África, Etiópia e Ásia Menor.

Estes sub-haplogrupos J1-M267 e J2-M172 dividem-se em vários ramos, ou seja, incluem subtipos mais específicos, sendo possível verificar cada subtipo e seu respetivo marcador no *site* do ISOGG (<http://www.isogg.org/tree/>). Segundo a proposta do ISOGG 2014, o ramo do sub-haplogrupo J1-M267 está subdividido em J1* e J1a; o J1a por sua vez divide-se em J1a1, J1a2 e J1a3, que estão também ramificados. O ramo do sub-haplogrupo J2-M172 está subdividido em J2*, J2a e J2b que têm também as suas ramificações.

A identificação de cada ramo ou subtipo do haplogrupo J-M304, bem como a sua caracterização haplotípica, podem contribuir para a clarificação de eventos históricos ou demográficos ocorridos nas populações humanas no passado que podem ser responsáveis pela presença destes sinais genéticos nas populações contemporâneas.

4. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização do haplogrupo J-M304 numa amostra populacional portuguesa no sentido de tentar estabelecer uma relação entre a presença deste haplogrupo e seus subtipos com eventos históricos ou demográficos ocorridos no passado. Para isso foram colhidas amostras de indivíduos naturais maioritariamente da zona centro de Portugal, e definidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Identificar e estimar a frequência do haplogrupo J-M304 e respetivos subgrupos J1-M267 e J2-M172 na amostra populacional em estudo;
- 2) Identificar subtipos dos sub-haplogrupos J1-M267 e J2-M172 através de marcadores bialélicos;
- 3) Proceder a uma análise da diversidade haplotípica dos subtipos do haplogrupo J-M304 pela análise de sete marcadores STRs;
- 4) Relacionar a presença destes subgrupos no território português com eventos históricos ou demográficos ocorridos no passado – análise filogeográfica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostra populacional

Para este trabalho foram estudadas 324 amostras de esfregaço bucal de indivíduos do sexo masculino de naturalidade portuguesa, com distribuição por quase todas as regiões de Portugal (Figura 2) sendo o maior foco na zona centro de Portugal: Coimbra – 137; Aveiro – 60; Guarda – 47; Castelo Branco – 23; outras localizações – 57.



Figura 2 – Figura representativa de Portugal enfatizando as regiões das quais foram analisadas amostras para este trabalho (círculos a verde), com ênfase para a zona centro (círculo a vermelho).

Na análise dos subtipos dos sub-haplogrupos J1-M267 e J2-M172 foram, ainda, utilizadas 24 amostras previamente genotipadas, 13 para o sub-haplogrupo J1 (12 indivíduos do distrito de Coimbra e um do distrito de Viana do Castelo) e 11 para o sub-haplogrupo J2 (nove indivíduos naturais do distrito de Coimbra e dois do distrito de Setúbal).

2. Extração de ADN

Foram utilizadas amostras de ADN genómico previamente isolado para estudos diversos de genética populacional e amostras de células bucais colhidas recentemente.

O material biológico foi recolhido por fricção no epitélio bucal com escovas apropriadas esterilizadas (*sterile swabs*) (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). As células do epitélio bucal recolhidas foram armazenadas em tubos esterilizados e conservadas a -20°C para posterior extração do ADN.

Foi previamente obtido o consentimento informado de cada voluntário para a realização dos estudos genéticos.

2.1. Extração de ADN por *FavorPrep Genomic DNA Mini Kit*

O ADN foi extraído utilizando o kit *FavorPrep Genomic DNA Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp., Twain). A utilização deste kit permite isolar o ADN por um método simples, recorrendo a uma “coluna-tipo”.

Numa primeira etapa, utiliza-se um sal caotrópico e proteinase K para lisar as células e degradar a proteína. De seguida, o ADN liga-se a uma membrana de sílica presente na coluna e submete-se a várias lavagens com tampões apropriados do fabricante. Numa última etapa, faz-se uma eluição com tampão para a extração segura e conveniente do ADN. Os tampões utilizados neste procedimento estão otimizados de forma a permitir a libertação do ADN mantendo um pH ideal, de modo a estabilizar os ácidos nucleicos e promover a absorção seletiva do material genético para a membrana de sílica. O protocolo utilizado por este tipo de extração encontra-se descrito no anexo 1.

3. Marcadores Bialélicos ou SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

Marcadores bialélicos ou SNPs são alterações ao nível de um único nucleótido na sequência de ADN.

Neste trabalho estudaram-se 12 marcadores bialélicos com o objetivo de identificar as amostras pertencentes ao haplogrupo de interesse – haplogrupo J – e identificar os seus diferentes subgrupos (Figura 3).

A estratégia a aplicar foi delineada a partir da filogenia das mutações proposta pela *International Society of Genetic Genealogy* (ISOGG) correspondente ao ano de 2014.

Na estratégia hierárquica delineada para a identificação do haplogrupo nas amostras, o primeiro marcador a ser estudado foi o M9. Este marcador possui um alelo derivado M9-G que identifica o nó K da árvore filogenética do cromossoma Y. As amostras com o alelo ancestral M9-C seriam as de interesse para o nosso trabalho, as quais foram então, seguidamente, estudadas para o marcador M304. Este marcador identifica o haplogrupo J quando este apresenta o alelo derivado M304-C. Amostras definidas como pertencentes ao haplogrupo J foram estudadas para o marcador M267, que identifica o sub-haplogrupo J1 quando presente o alelo derivado M267-G. Amostras com o alelo ancestral M267-C foram estudadas para o sub-haplogrupo J2 definido pelo marcador M172. Este marcador identifica o sub-haplogrupo J2, quando presente o alelo derivado M172-G.

Amostras identificadas para os sub-haplogrupos J1-M267 e J2-M172 foram, de seguida, submetidas a estudos para outros marcadores de modo a identificar os seus subgrupos. Amostras identificadas para o sub-haplogrupo J1-M267 foram estudadas para os marcadores M365, P56 e P58 que definem os subtipos J1a1, J1a2a e J1a2b, respetivamente (alelos derivados M365-G, P56-G e P58-C). No caso do sub-haplogrupo J2-M172, foi estudado o marcador M410 que define o subtipo J2a e em caso positivo, ou seja, as amostras apresentarem o alelo derivado M410-G, estudaram-se para o marcador P55 que define o subtipo J2a1 (alelo derivado P55-A). No caso de não se confirmar o alelo derivado M410-G, ou seja não se tratarem de amostras J2a, foram estudadas para o marcador M12 que define o subtipo J2b quando presente o alelo derivado M12-T. Em amostras confirmadas como J2b-M12 estudaram-se os marcadores

M205 e M241 que definem os subtipos J2b1 e J2b2, respectivamente (alelos derivados M205-A e M241-A).

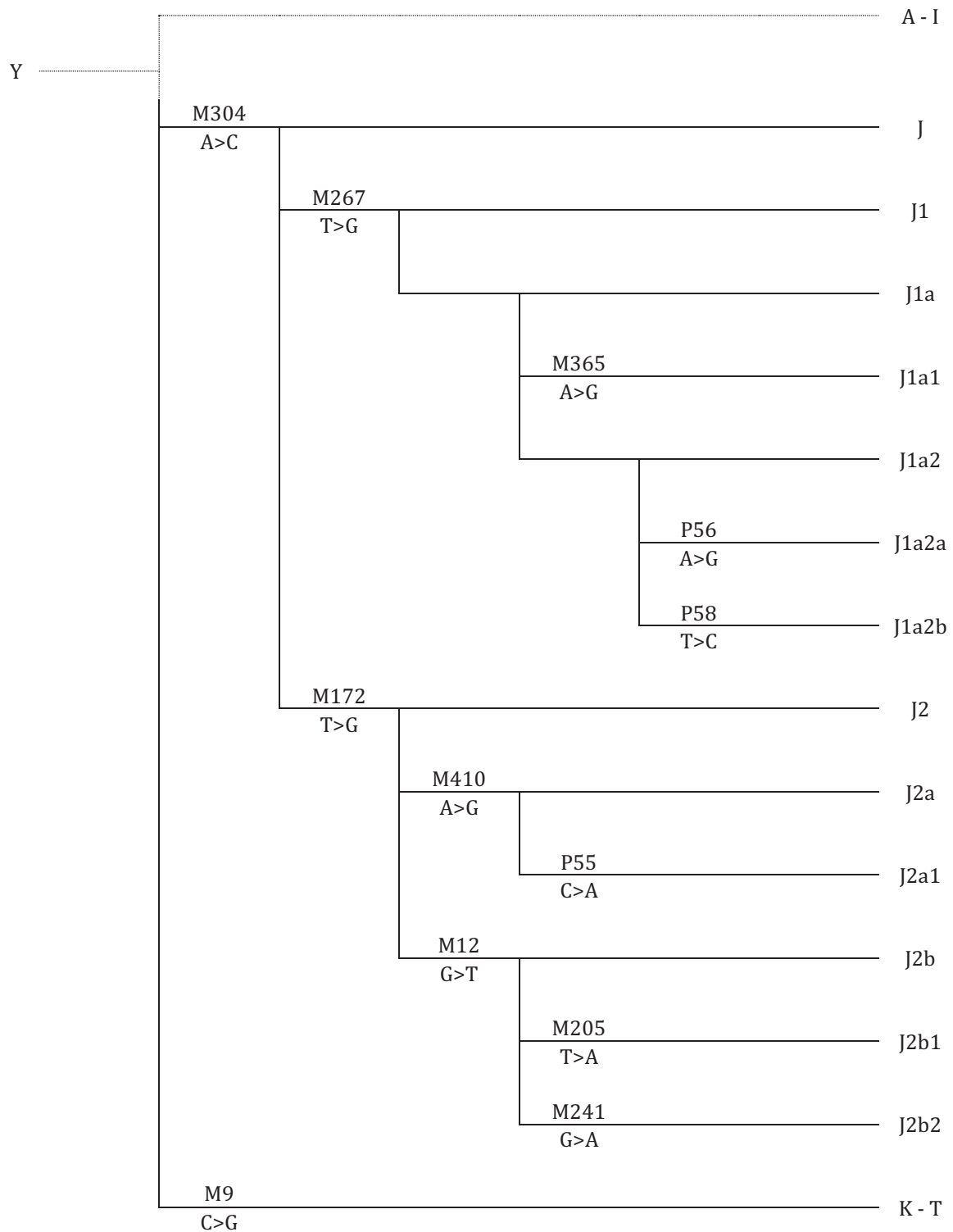


Figura 3: Árvore filogenética do cromossoma Y apresentando os marcadores bialélicos utilizados na identificação do haplogrupo J e seus subgrupos.

3.1. PCR – Polymerase Chain Reaction

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - em português “Reação em Cadeia da Polimerase” - é uma técnica de biologia molecular que permite amplificar o ADN. Esta técnica foi criada com base no processo natural de replicação do ADN e permite amplificar, em milhões de vezes, uma sequência de ADN delimitada por duas sequências de nucleótidos específicas e de interesse para o estudo, denominadas *primers*.

Para o processo é necessário proceder a uma mistura, já protocolada, apresentada na tabela 1. Após a mistura estar feita, coloca-se a amostra num termociclador que aplica variações de temperatura em ciclos repetidos entre 25 a 30 vezes. As variações de temperatura permitem 3 reações diferentes: desnaturação, *annealing* e extensão. A primeira etapa do ciclo ocorre a temperaturas superiores a 90°C (30 seg. a 1 min.) para que se dê a desnaturação, ou seja, a separação da dupla cadeia de ADN por quebra das pontes de hidrogénio. Na segunda etapa, a temperatura é reduzida entre os 50°C e os 65°C, dependendo da quantidade de citosina (C) e guanina (G) encontrada no *primer*, para que os *primers* se emparelhem (*annealing*) com o ADN molde, delimitando a região a amplificar. Na última etapa do ciclo a temperatura é elevada a 72°C para que a enzima *Taq polimerase* possa funcionar sintetizando a nova cadeia de ADN – extensão. De seguida um novo ciclo é iniciado. O processo de síntese é iniciado numa zona com cadeia dupla (onde estão ligados os *primers*), incorporando os nucleótidos complementares à sequência alvo e utilizando os dNTP's em solução.

Tabela 1 – Mistura da reação para amplificação por PCR das regiões do cromossoma Y.

H ₂ O	16,4 µl/amostra
Taq Buffer 10x	2,5 µl/amostra
MgCl ₂ 25mM	3,0 µl/amostra
dNTPs 10mM	0,5 µl/amostra
Primer D 100ng/µl	0,5 µl/amostra
Primer R 100ng/µl	0,5 µl/amostra
Taq ADN polimerase (Fermentas)	0,1 µl/amostra
ADN	1,5 µl/amostra
TOTAL	25 µl/amostra

No presente trabalho foram utilizados diferentes programas de amplificação tendo em consideração a temperatura que seria mais adequada para o *primer* em questão. Informações relativas à sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de *annealing* dos *primers* encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Dados relativos aos *primers* utilizados no estudo dos marcadores bialélicos, com indicação do tamanho dos fragmentos amplificados, temperatura de *annealing* e respetiva referência bibliográfica.

Marcador		Primer 5'>3'	Fragmento (pb)	T _{ann}	Referência
M9	D	GCAGCATATAAACTTTCAGG	340	52°C	Underhill <i>et al.</i> (1997)
	R	AAAACCTAACTTTGCTCAAGC			
M304	D	CTAGAGGGTATTGGGGTAGGC	310	58°C	Underhill <i>et al.</i> (1997)
	R	GGAAATACCTTCAAATAAATACC			
M267	D	TTATCTGAGCCGTTGTCCCTG	287	58°C	Underhill <i>et al.</i> (1997)
	R	TGTAGAGACACGGTTGTACCCT			
M365	D	CCTTCATTTAGGCTGTAGCTGC	274	56°C	Cinnioğlu <i>et al.</i> (2004)
	R	TGTATCTTTAGTTGAGATGG			
P56	D	ATGGATAATTGATAGATAAATAT	524	56°C	Hammer <i>et al.</i> (2003)
	R	CCTACCTATCATACTATTCTCAA			
P58	D	ACGTCACCCATCTCAAC	306	58°C	Hammer <i>et al.</i> (2003)
	R	AAAGAATGTCTCCCCATGAGG			
M172	D	TTGAAGTTACTTTTATAATCTAATGCTT	197	60°C	Underhill <i>et al.</i> (2000)
	R	ATAATTTATTACTTTACAGTCACAGTGG			
M410	D	CAATCATTGACCTTAAGTCTGAGTCCC	395	58°C	Underhill <i>et al.</i> (1997)
	R	ACTGGATACTTTCTAGGAAGAATTG			
P55	D	TCATACCTATTGGATTGTTC	367	58°C	Karafet <i>et al.</i> (2008)
	R	TGTCTCTGACAGGGTGG			
M12	D	ACTAAAACACCATTAGAAACAAAGG	403	60°C	Underhill <i>et al.</i> (1997)
	R	AAAAGAAGTTGAGGACTGGAGC			
M205	D	GTATAAATACTGTGGTTGGAAAGCA	541	58°C	Cinnioğlu <i>et al.</i> (2004)
	R	CCAAACTATGTGATAATAAATGGG			
M241	D	AACTCTTGATAAACCGTGCTG	366	58°C	Cinnioğlu <i>et al.</i> (2004)
	R	TCCAATCTCAATTCATGCCTC			

Após a reação estar concluída os produtos da amplificação foram visualizados à luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose 1,5%, com brometo de etídeo (concentração final 0,5 µg/mL), em tampão TBE 0,5x, permitindo confirmar o sucesso da amplificação.

3.2. RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

Após a amplificação estar confirmada, os produtos de PCR foram submetidos a uma digestão com enzimas de restrição para identificação dos haplogrupos. O protocolo-tipo para as várias digestões enzimáticas consistiu numa solução com 2,5 µl/amostra de H₂O, 0,5 µl/amostra de tampão da enzima, 0,5 µl/amostra de solução com a endonuclease e 1,5 µl do produto de PCR (volume final 5 µl), e colocado à temperatura adequada segundo recomendações do fabricante (tabela 3). A enzima corta o fragmento de ADN em zonas específicas e consoante o tamanho dos fragmentos obtidos identifica-se o alelo presente em cada amostra – alelo derivado ou ancestral. O alelo derivado define o haplogrupo em estudo. Os tamanhos dos fragmentos resultantes após tratamento enzimático, para os marcadores em estudo e cujo método de RFLP pôde ser aplicado, constam da tabela 3.

Tabela 3 – Marcadores bialélicos estudados por RFLP com as respetivas enzimas, temperatura de digestão, polimorfismos e tamanho (em pb) dos fragmentos obtidos após digestão.

Marcador	Enzima	Temperatura	Polimorfismo	Alelo Ancestral	Alelo Derivado
M9	Hinf I	37°C	C>G	C: 181; 91; 64	G: 245; 95
M304	Tsp 45I	65°C	A>C	A: 310	C: 216; 94
P58	Dde I	37°C	T>C	T: 158; 69; 49; 30	C: 207; 69; 30
M410	Hpy 188I	37°C	A>G	A: 191; 91; 51; 42; 20	G: 191; 133; 51; 20
M12	BCC I	37°C	G>T	G: 166; 123; 100; 14	T: 289; 100; 14

3.3. Electroforese em gel de poliacrilamida

Os fragmentos resultantes da digestão enzimática foram analisados por electroforese em gel de acrilamida horizontal com a presença de um marcador de peso molecular para servir como controlo.

O produto de digestão foi aplicado num gel de poliacrilamida a 10% ou a 8% (C=5%), consoante o mais adequado para o tamanho dos fragmentos e sua consequente migração, em tampão 0,351M Tris/HCl pH 8,8. Sobre esse gel foi aplicada uma diferença de potencial de 100V, durante 2 a 3 horas, numa placa de arrefecimento. Para

a electroforese foi utilizado um sistema de tampões que são colocados nas extremidades do gel em tiras de papel *Whatman* (10cm x 1,5cm) para permitir a migração dos fragmentos: 0,375 M Tris/Glicina e 0,125 M Tris HCl com pH 8,8. Após a electroforese, a coloração dos fragmentos de ADN foi feita através da técnica *Silver-Staining*, descrita no anexo 2.

3.4. Sequenciação

A identificação de haplogrupos foi também, nalguns casos, efetuada por sequenciação de ADN. Esta técnica tem por objetivo conhecer a sequência de nucleótidos de determinada amostra de ADN e, no caso do método utilizado - método de Sanger - utiliza a adição de nucleótidos modificados, designados ddNTPs (didesoxirribonucleotídeos trifosfatados). Estes ddNTPs marcados com fluorocromos permitem que, após separação por eletroforese capilar em sequenciadores automáticos, os fragmentos de ADN fiquem ordenados pelo tamanho e sejam visualizados de forma automática, de modo a obter a sequência original da cadeia de ADN em análise.

Para este processo foi necessária uma primeira etapa de purificação do produto obtido por PCR com *ExoSap-IT* (USB, Cleveland, USA), a 37°C durante 15 minutos, seguida de paragem da reação a 80°C também durante 15 minutos. Posteriormente, fez-se uma solução para a reação de sequenciação que incluiu 6,5 µl H₂O/amostra, 1 µl/amostra da mistura BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, USA) (já contendo os ddNTPs marcados com fluorocromo) e 0,5 µl/amostra de um dos *primers* (direto ou reverso, 100 ng/µl). Esta solução foi adicionada ao produto de PCR já depois da ação da *ExoSap* - purificação. De seguida, a solução foi colocada no termociclador e sujeita à reação de sequenciação nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 5 min, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 20 segundos, e *annealing*/extensão a 60°C durante 2 minutos. Após a reação de sequenciação, as amostras foram purificadas em colunas com Sephadex G-75 (*GE Healthcare, Uppsala, Sweden*) e aplicaram-se no sequenciador ABI Prism 3130 (*Applied Biosystems*).

As leituras da sequência de ADN foram efetuadas através do programa CHROMAS LITE 2.1.1. A leitura da sequência permite verificar se está presente o alelo derivado que caracteriza o haplogrupo de interesse.

4. Análise STRs (*Short Tandem Repeats*) ou Marcadores Multialélicos

Polimorfismos STR (*short tandem repeat*), também designados por microssatélites ou marcadores multialélicos, são unidades de repetição de pares de bases do ADN (unidades repetitivas de 2-6 pares de bases). Estes polimorfismos de ADN são muito utilizados em genética populacional e estudos forenses, podendo ainda funcionar como marcadores genéticos, e apresentam taxas mais altas de mutação genética do que os SNPs referidos no ponto 3.

Os STRs analisados no presente trabalho foram: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, cujas características se apresentam na tabela 4.

Tabela 4 – Características dos Y-STRs estudados.

Locus	Repetições	Alelos	Referências
DYS19	[TAGA] ₃ tagg[TAGA] _N	10-19	Roewer <i>et al.</i> (1992)
DYS389I	[TCTG] _q [TCTA] _r	9-17	Roewer <i>et al.</i> (1996)
DYS389II	[TCTG] _n [TCTA] _p [TCTG] _q [TCTA] _r	24-34	Roewer <i>et al.</i> (1996)
DYS390	[TCTG] _n [TCTA] _m [TCTG] _p [TCTA] _q	17-28	Roewer <i>et al.</i> (1996)
DYS391	[TCTA] _n	6-24	Roewer <i>et al.</i> (1996)
DYS392	[TAT] _n	6-18	Roewer <i>et al.</i> (1996)
DYS393	[AGAT] _n	8-17	Roewer <i>et al.</i> (1996)

Os STRs foram amplificados por PCR em sistemas multiplex utilizando soluções do *Multiplex PCR kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) (Tabela 5). O Multiplex 1 (M1) inclui os STRs DYS390, DYS391 e DYS19 e o Multiplex 2 (M2) amplifica simultaneamente os marcadores DYS389I, DYS389II, DYS392 e DYS393.

As amostras J1-M267 foram também analisadas para o STR DYS388.

Tabela 5 – Protocolo QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen).

H ₂ O	2,0 µl/amostra
Solução Q	1,25 µl/amostra
Solução M	6,25 µl/amostra
Primers (15µM cada)	1,5 µl/amostra
ADN	2,5 µl/amostra
TOTAL	13,5 µl/amostra

A separação dos produtos amplificados foi realizada num sequenciador automático *ALF Express II* (Pharmacia-Amersham Biosciences), sendo o tamanho dos fragmentos determinado automaticamente com o programa *ALFwin™ Fragment Analyser 1.00* (Amersham Pharmacia Biotech). A definição dos alelos em cada STR foi feita por comparação com amostras previamente genotipadas.

5. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados utilizaram-se programas correntemente utilizados em genética populacional. As frequências de haplogrupos foram estimadas por contagem direta. Diferenças estatísticas entre grupos populacionais para haplogrupos individuais foram analisadas por tabelas de contingência 2x2 com o teste exato de Fischer em *SISA statistics* (<http://www.quantitativeskills.com/sisa>).

Os valores de diversidade haplotípica e de distância genética F_{ST} com base nos polimorfismos STR foram calculados com o programa Arlequin ver 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) (Excoffier e Schneider, 2005). Os mapas MDS (Multidimensional Scaling) relativos a diferentes populações foram obtidos base nos valores F_{ST} com o programa SPSS vs. 20.

As *networks* dos haplótipos definidos pelos STRs foram construídas usando o programa *NETWORK 4.0* (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) (Bandelt *et al.* 1999) com o algoritmo *median-joining*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Identificação de haplogrupos – Marcadores Bialélicos

Foram estudados 12 marcadores bialélicos de forma hierárquica que permitiram a identificação de 5 subtipos diferentes do haplogrupo J-M304 no total das amostras analisadas.

Após o processo de amplificação das amostras de ADN genómico submeteu-se o produto da amplificação a uma eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio; as bandas de ADN foram visualizadas à luz UV de modo a confirmar o sucesso da amplificação.

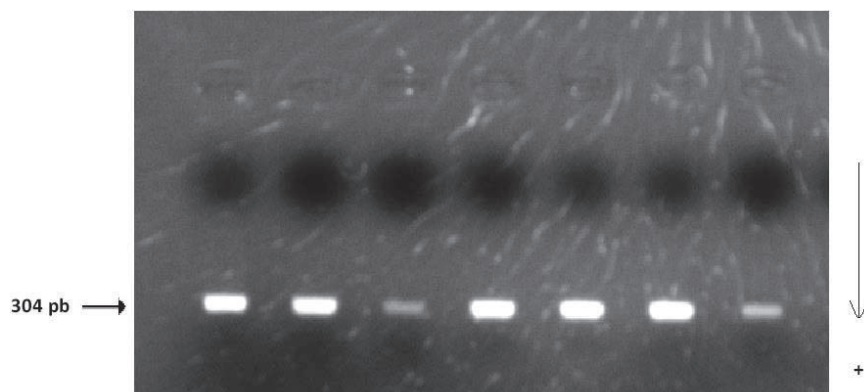


Figura 4 – Exemplo de um resultado obtido de PCR - Electroforese em gel de agarose de amostras amplificadas para o marcador M9 (a última amostra aparece sem banda, pois trata-se de uma amostra de controlo negativo, ou seja, sem ADN presente na reação). É apresentado o tamanho do ADN amplificado e o sentido da migração.

Após digestão com enzimas de restrição obtiveram-se padrões electroforéticos que permitiram identificar os alelos ancestrais e derivados e, conseqüentemente, classificar os haplogrupos aos quais os indivíduos pertencem. Foi utilizado um marcador de 100 pb, de modo a podermos confirmar o tamanho esperado para os fragmentos digeridos e assim conhecer o seu alelo.

A figura 5 apresenta o exemplo do padrão electroforético obtido para o marcador M9. O alelo ancestral M9-C apresenta três bandas (181 pb, 95 pb e 64 pb) e o derivado M9-G apresenta duas bandas (245 pb e 95 pb) definindo o nó K na árvore filogenética do cromossoma Y.

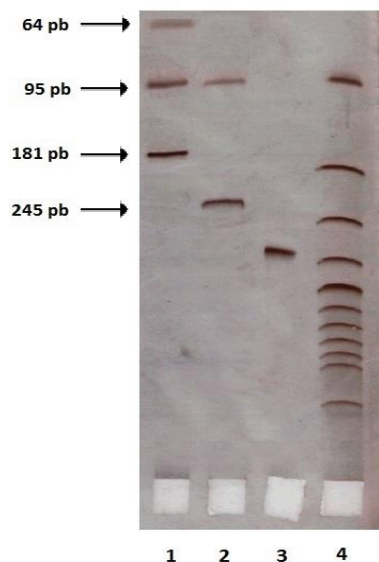


Figura 5 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição Hinf I para o marcador M9. 1 – Alelo ancestral-C; 2 – Alelo derivado-G; 3 – Produto de PCR não-digerido (banda de 340 pb); 4 – Marcador 100 pb.

A figura 6 mostra o padrão electroforético obtido para o marcador M304 que define o haplogrupo J. Neste caso, o alelo ancestral M304-A apresenta apenas uma banda de 310 pb (não digere) e o alelo derivado M304-G apresenta duas bandas (216 pb e 94 pb). De um total de 324 amostras estudadas, foi possível identificar 32 indivíduos pertencentes ao haplogrupo J-M304, o haplogrupo de interesse para o trabalho.

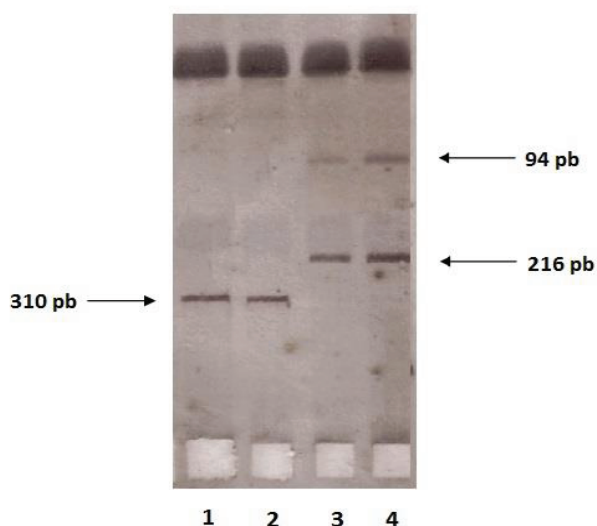


Figura 6 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição Tsp45I para o marcador M304 que define o haplogrupo J. 1,2 – Alelo ancestral -A; 3,4 – Alelo derivado-G.

As amostras pertencentes ao haplogrupo J-M304 foram analisadas por sequenciação para os marcadores M267 e M172 (que definem os sub-haplogrupos J1 e J2, respetivamente). Na figura 7 podem observar-se dois exemplos de sequenciações obtidas para o marcador M267, tendo sido identificados 6 indivíduos com o alelo derivado M267-G, ou seja, definidos como J1-M267. Nesta fase foram acrescentadas à amostra populacional em estudo amostras previamente genotipadas, 13 identificadas como J1-M267, e 11 como J2-M172.

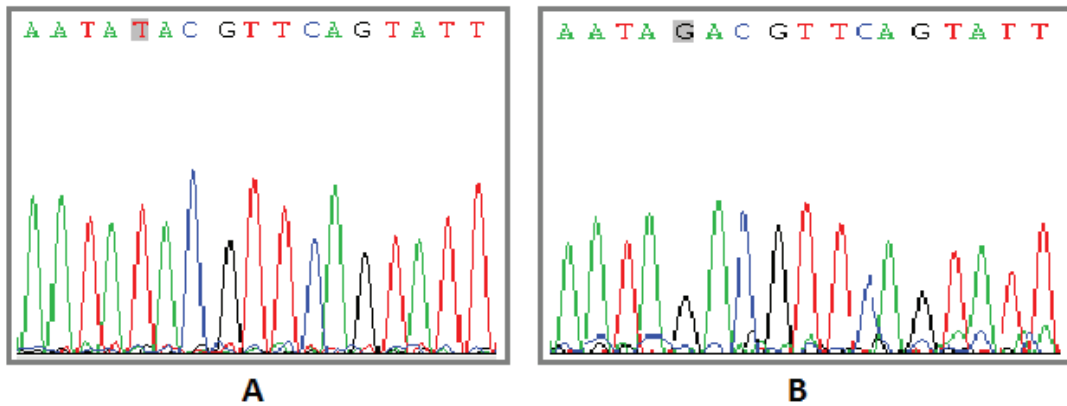


Figura 7 – Sequenciação do fragmento de estudo para o marcador M267 que define o haplogrupo J1. A - Zona da sequenciação de uma amostra com a presença do alelo ancestral M267-T (sublinhado a cinzento); B - Zona da sequenciação de uma amostra com a presença do alelo derivado M267-G (sublinhado a cinzento).

As seis amostras definidas como J1-M267 juntamente com as 13 previamente genotipadas, foram sequenciadas para os marcadores M365 e P56, e digeridas para o P58 permitindo a identificação de 1 indivíduo J1a1-M365 (Figura 8), de 14 indivíduos pertencentes ao subtipo J1a2b-P58 (Figura 9) e de 4 indivíduos identificados como J1(xJ1a1,J1a2a,J1a2b).

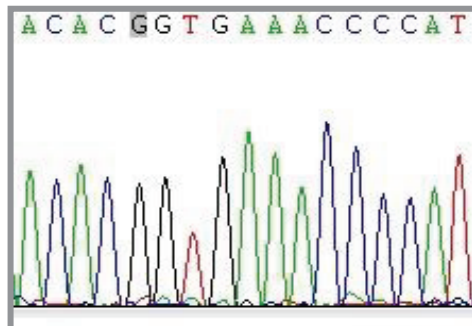


Figura 8 – Sequenciação do fragmento de estudo para o marcador M365 - zona da sequenciação da amostra identificada como J1a1-M365 com a presença do alelo derivado M365-G (sublinhado a cinzento).

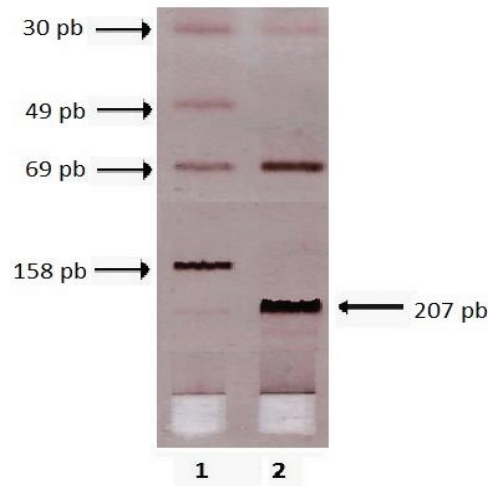


Figura 9 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição DdeI para o marcador P58 que define o subtipo J1a2b. 1 – Alelo ancestral -T; 2 – Alelo derivado-C.

O estudo do marcador M172 que define o sub-haplogrupo J2-M172 permitiu identificar 26 indivíduos com o alelo derivado M172-G. As amostras destes indivíduos juntamente com as 11 previamente genotipadas foram seguidamente estudadas para os marcadores M410 e M12, o que permitiu identificar 28 indivíduos J2a-M410 (Figura 10) e 9 indivíduos J2b-M12. O estudo do marcador M241 permitiu identificar os 9 indivíduos J2b-M12 como J2b2-M241 (Figura 11).

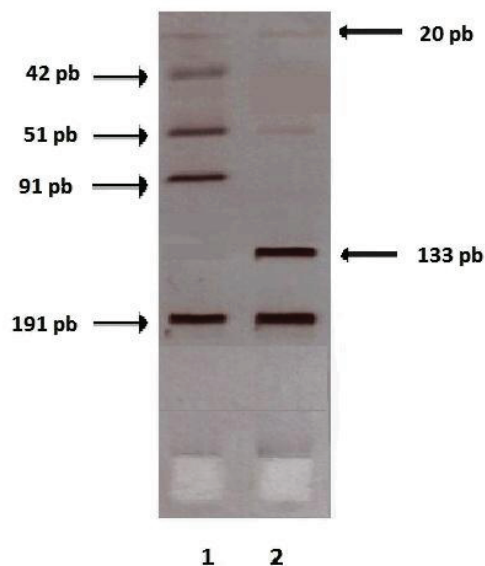


Figura 10 – Electroforese horizontal em gel de poliacrilamida das amostras digeridas com a enzima de restrição Hpy188I para o marcador M410 que define o haplogrupo J2a. 1 – Alelo ancestral -A; 2 – Alelo derivado-G.

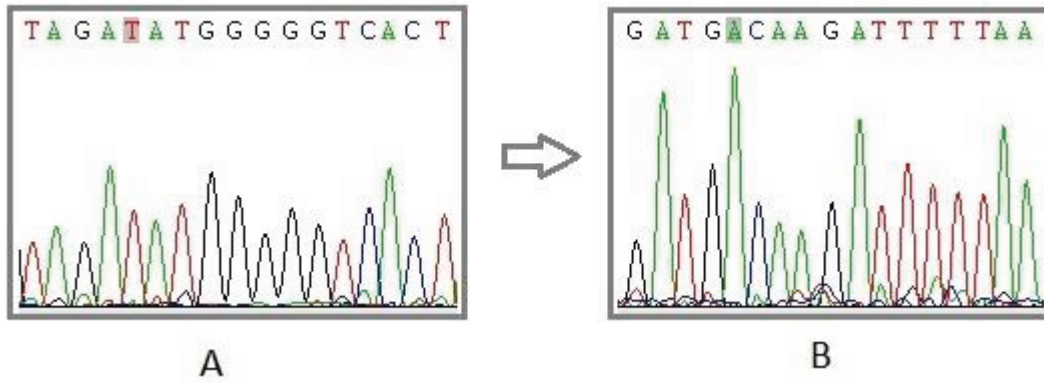


Figura 11 – Sequenciação do fragmento de estudo para os marcadores M12 (A) e M241 (B). A - Zona da sequenciação de uma amostra com a presença do alelo derivado M12-T (sublinhado a cinzento) que define o haplogrupo J2b; B - Zona da sequenciação de uma amostra com a presença do alelo derivado M241-A (sublinhado a cinzento) que define o subtipo J2b2.

2. Identificação de Short Tandem Repeats (STRs)

Foram analisados sete microssatélites, DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393 para os sub-haplogrupos J1-M267 e J2-M172 com vista à caracterização dos seus haplótipos.

A amplificação dos fragmentos em sistemas Multiplex permitiu a análise do número de repetições em vários *loci* em simultâneo (Figuras 12 e 13).

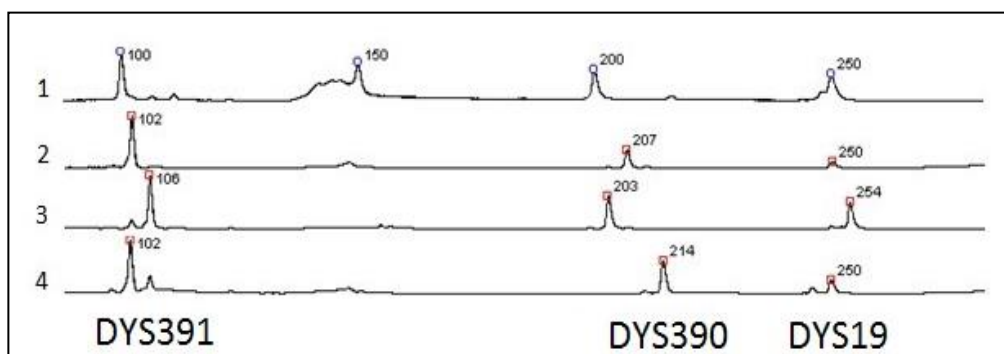


Figura 12 – Figura exemplificativa de Multiplex 1. 1 – marcador externo 50-500 pb (a azul); 2, 3 e 4 – alelos (a vermelho). 2: DYS391 – 10 repetições, DYS390 – 22 repetições, DYS19 – 15 repetições; 3: DYS391 – 11 repetições, DYS390 – 21 repetições, DYS19 – 16 repetições; 4: DYS391 – 10 repetições, DYS390 – 24 repetições, DYS19 – 15 repetições. A definição dos alelos para cada STR foi feita por comparação com amostras previamente genotipadas.

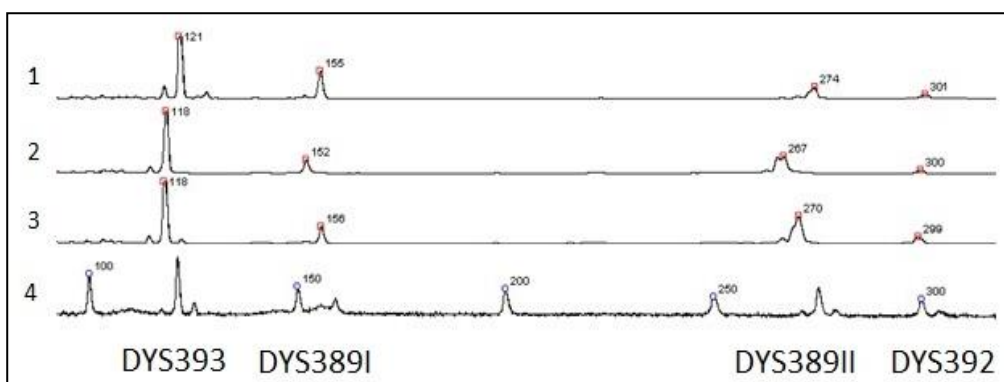


Figura 13 – Figura exemplificativa de Multiplex 2. 1, 2 e 3 – alelos (a vermelho). 1: DYS393 – 13 repetições, DYS389I – 13 repetições, DYS389II – 30 repetições, DYS392 – 11 repetições; 2: DYS393 – 12 repetições, DYS389I – 12 repetições, DYS389II – 28 repetições, DYS392 – 11 repetições; 3: DYS393 – 12 repetições, DYS389I – 13 repetições, DYS389II – 29 repetições, DYS392 – 11 repetições; 4: marcador externo 50-500 pb (a azul). A definição dos alelos em cada STR foi feita por comparação com amostras previamente genotipadas.

Foram identificados 11 haplótipos diferentes no sub-haplogrupo J1-M267 e 27 no sub-haplogrupo J2-M172, sendo 2 deles comuns aos dois grupos. A diversidade haplotípica estimada para o sub-haplogrupo J1-M267 foi de 0,31 e para o sub-haplogrupo J2-M172 foi de 0,44.

Os haplótipos obtidos são apresentados na Tabela 6 (Anexo 3).

3. Frequências obtidas das linhagens do haplogrupo J-M304 e comparação com outras populações

A figura 14 apresenta a árvore filogenética dos Y-SNPs analisados neste trabalho. Estando o objetivo do estudo focado no haplogrupo J-M304, apenas se define a árvore para esse haplogrupo. O alelo derivado (G) do marcador M9 define o nó K* da árvore filogenética ao qual pertencem os haplogrupos L, M, N, O, P, Q, R, S e T, e todas as amostras que foram identificadas com o alelo M9-G (n=200) foram colocadas nesse nó da árvore. As restantes amostras com o alelo ancestral M9-C foram analisadas para o marcador M304 e, ao revelarem o alelo derivado M304-C, foram identificadas como pertencentes ao haplogrupo J-M304 (n=32). As amostras com o alelo ancestral M304-A foram colocadas no nó sem identificação, pois encontrar-se-ão numa posição acima na árvore filogenética que deverá corresponder aos haplogrupos de A a I (n=92).

Na amostra total de 324 indivíduos analisados, a maioria da região centro de Portugal, foi possível identificar 32 indivíduos como pertencentes ao haplogrupo J-M304, atingindo uma frequência de 9,88% na amostra populacional. O sub-haplogrupo J1-M267 foi identificado em 6 indivíduos, registando uma frequência de 1,86%, e o sub-haplogrupo J2-M172 foi encontrado em 24 indivíduos, registando uma frequência de 8,02%, muito superior ao sub-haplogrupo J1-M267.

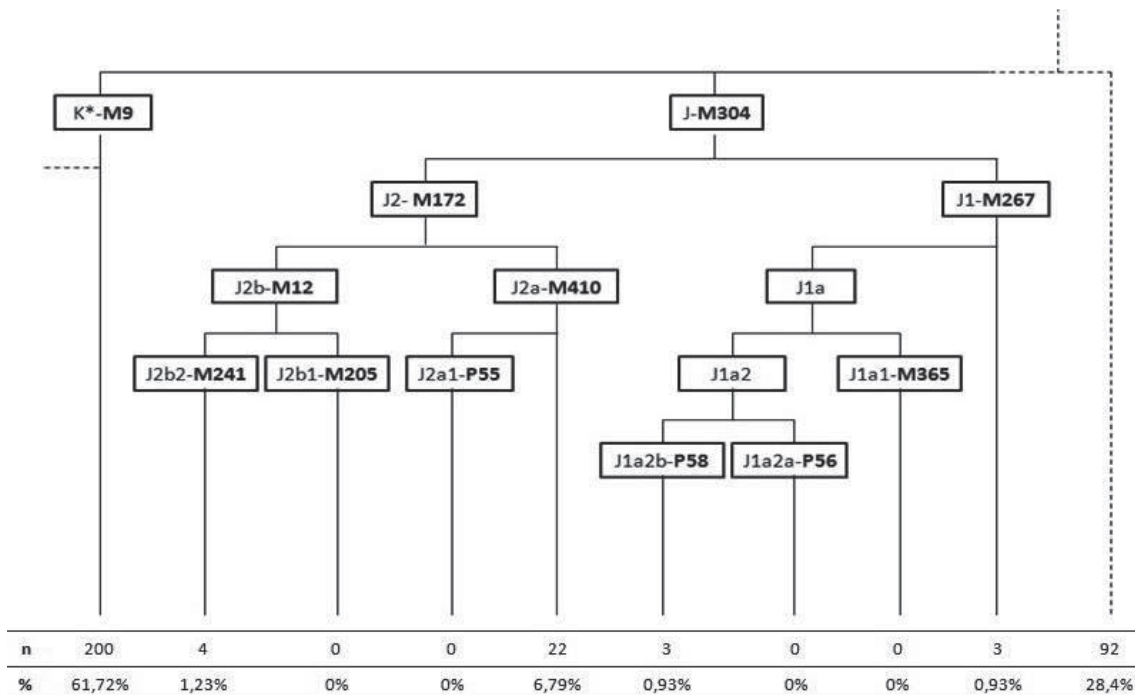


Figura 14 – Frequência do haplogrupo J e seus subtipos identificados na amostra populacional estudada (n=324) – são apenas apresentados os marcadores estudados.

Na tabela 7 são apresentadas as frequências obtidas para o haplogrupo J-M304 e seus subtipos para diferentes zonas em Portugal, com destaque para a zona centro. Na tabela é possível fazer a comparação com os resultados obtidos por Beleza *et al.* (2006) e por Martiniano *et al.* (2013). A tabela é acompanhada pela figura 15, de modo a visualizar a distribuição geográfica dos resultados para a zona centro.

Tabela 7 – Frequências obtidas (%) do haplogrupo J-M304 e seus subtipos por distritos de Portugal, apresentando também frequências obtidas por outros autores.

	Zona Centro					Portugal	CbrM	CbrB	Portugal B
	Cbr	Av	Grd	CB	Outras				
Nº Ind.	137	60	47	23	57	324	125	20	657
J	18 13.1%	4 6.7%	3 6.4%	2 8.7%	5 8.8%	32 9.9%	20 16.0%	5 25.0%	68 10.4%
J1	4 2.9%	2 3.3%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	6 1.9%	9 7.2%	3 15.0%	22 3.4%
J2	14 10.2%	2 3.3%	3 6.4%	2 8.7%	5 8.8%	26 8.0%	11 8.8%	2 10.0%	46 7.0%

Cbr – População do distrito de Coimbra, Av – População do distrito de Aveiro, Grd – População do distrito de Guarda, CB – População do distrito de Castelo Branco, Outras – Populações de outras regiões, Portugal – População portuguesa (inclui todos os Distritos); CbrM – População do distrito de Coimbra (Martiniano *et al.* 2013); CbrB – População do distrito de Coimbra (Beleza *et al.*, 2006), Portugal B – População portuguesa (Beleza *et al.*, 2006).

Figura 15 – Mapa da zona centro de Portugal com distribuição geográfica (por número de indivíduos) obtida para o haplogrupo J (J1-M267 e J2-M172).



São observáveis algumas diferenças nas percentagens obtidas entre a região litoral e a região interior. Assim, para o haplogrupo J, foi encontrada uma frequência de 11,2% na região litoral (distritos de Coimbra e Aveiro) *versus* 7,1% na região interior (distritos de Guarda e Castelo Branco), com uma diferença não estatisticamente significativa ($p=0,124$). A diferença mais notada, embora também não estatisticamente significativa ($p=0,158$), foi verificada para o sub-haplogrupo J1-M267, que foi encontrado apenas nos distritos da Beira Litoral (Coimbra e Aveiro) com uma frequência de 3,04%. Esta diferença entre as regiões litoral e interior para o haplogrupo J-M304, e em particular J1-M267, pode ser explicada pelo facto deste sub-haplogrupo se encontrar associado às expansões marítimas Mediterrânicas provenientes do Médio-Oriente na antiguidade (Capelli *et al.*, 2006), as quais também atingiram a costa ocidental Portuguesa.

Ao comparar os resultados obtidos com os de Martiniano *et al.* (2013) para o distrito de Coimbra (Tabela 7), observa-se uma diferença considerável no que concerne às frequências obtidas para o sub-haplogrupo J1-M267 (2,9% *versus* 7,2). No trabalho de Martiniano *et al.* (2013) a amostra incluía maioritariamente indivíduos da região litoral do distrito, o que pode ajudar a explicar esta diferença nas percentagens. Ao fazer também a comparação com o trabalho de Beleza *et al.* (2006), observamos, para os valores relativos ao distrito de Coimbra, diferenças consideráveis; no entanto, é de relevar que a amostra de Beleza *et al.* (2006) é muito mais reduzida, o que pode sobrevalorizar os resultados - um só indivíduo corresponde a 5% da amostra. Quanto menor for a amostra, maior é a possibilidade dos resultados não serem tão representativos da população. Se considerarmos a sua amostra total para Portugal (n=657), neste caso, os valores obtidos estão em concordância (Tabela 7).

Na caracterização dos subtipos dos sub-haplogrupos J1-M267 e J2-M172 foram também incluídas amostras previamente genotipadas, de modo a alargar e a tornar mais fidedigno a caracterização do haplogrupo J para Portugal (Figuras 16 e 17). No total, foram analisadas para os respetivos subtipos 19 amostras classificadas como J1-M267 e 37 amostras classificadas como J2-M172.

Para o sub-haplogrupo J1-M267 (Figura 16) foram identificados 2 subtipos diferentes, J1a1-M365 (1 amostra; 5,3%) e J1a2b-P58 (14 amostras; 73,6%), e 4 amostras foram classificadas como J1*-M267 (x J1a1, J1a2a, J1a2b).

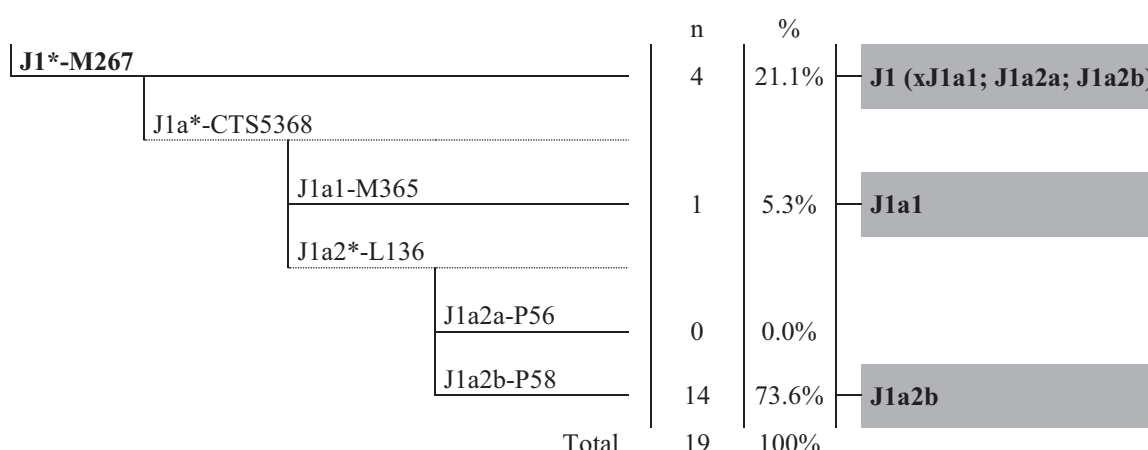


Figura 16 – Frequência dos subtipos do sub-haplogrupo J1-M267, (inclui amostras previamente genotipadas); n – número de indivíduos, % - percentagem relativa ao número total de indivíduos J1-M267.

É de salientar a maior percentagem de J1 pertencente ao subtipo J1a2b-P58 (73,8%). Este subtipo referente ao marcador P58 é considerado o mais comum para o sub-haplogrupo J1, apresentando frequências elevadas em várias populações onde o subgrupo J1-M267 é comum: em Chiaroni *et al.* (2010) são apresentadas prevalências de 67,7% na população do Yemen, 56,9% no Qatar, ambos da Península Arábica, 58,8% na Síria (Ismaili Damascus) e 25% no Iraque; em Repping *et al.* (2006) é apresentada uma prevalência de 70% para a população Amhara na Etiópia.

Quanto ao sub-haplogrupo J2-M172, a figura 17 permite assumir o subtipo J2a-M410 como o mais comum, correspondendo a 75,7% das 37 amostras identificadas como J2-M172. Este resultado é concordante com alguns autores, tais como Sengupta *et al.* (2006) que estimaram uma prevalência de 16,6% deste subtipo no Paquistão na amostra populacional total.

	n	%	
J2*-M172	0	0.0%	
J2a*-M410	28	75.7%	J2a (xJ2a1)
J2a1-P55	0	0.0%	
J2a2-L581			
J2b*-M12	0	0.0%	
J2b1-M205	0	0.0%	
J2b2-M241	9	24.3%	J2b2
Total	37	100%	

Figura 17 – Frequência dos subtipos do sub-haplogrupo J2-M172, (inclui amostras previamente genotipadas); n – número de indivíduos, % - percentagem relativa ao numero total de indivíduos J2.

Do total de 37 amostras de origem portuguesa, 9 (24,3%) foram identificadas como J2b-M12, e caracterizadas na totalidade como J2b2-M241. O caso de J2b2-M241 é muitas vezes considerado o mais comum dentro do subtipo J2b-M12. Em Sengupta *et al.* (2006) é apresentada uma percentagem de 5,22% da amostra total da população indiana (n=728), sendo o subtipo mais comum dentro do haplogrupo J para esta população.

4. Análise de Marcadores Multialélicos – STRs

Os STRs obtidos numa primeira fase, foram aplicados na avaliação dos valores de distância genética, de modo a se construir um modelo de distâncias euclidiano através do SPSS (Figuras 18, 19 e 20). Este modelo permite, através dos haplótipos obtidos, comparar os resultados na amostra populacional com outras populações de interesse, com o objetivo de analisar a distância genética entre estas populações. As populações foram escolhidas considerando a sua possível proximidade e influência na população em estudo. Nesta análise foram incluídos dados de estudos populacionais em amostras gerais de populações da Portugal, Espanha e de países do Médio Oriente e do Norte de África. Foram ainda incluídos resultados provenientes de estudos em populações de origem judaica de Portugal e Espanha (conhecidos como Judeus sefarditas).

Primeiramente, compararam-se os valores de distância genética para o haplogrupo J-M304 (Figura 18).

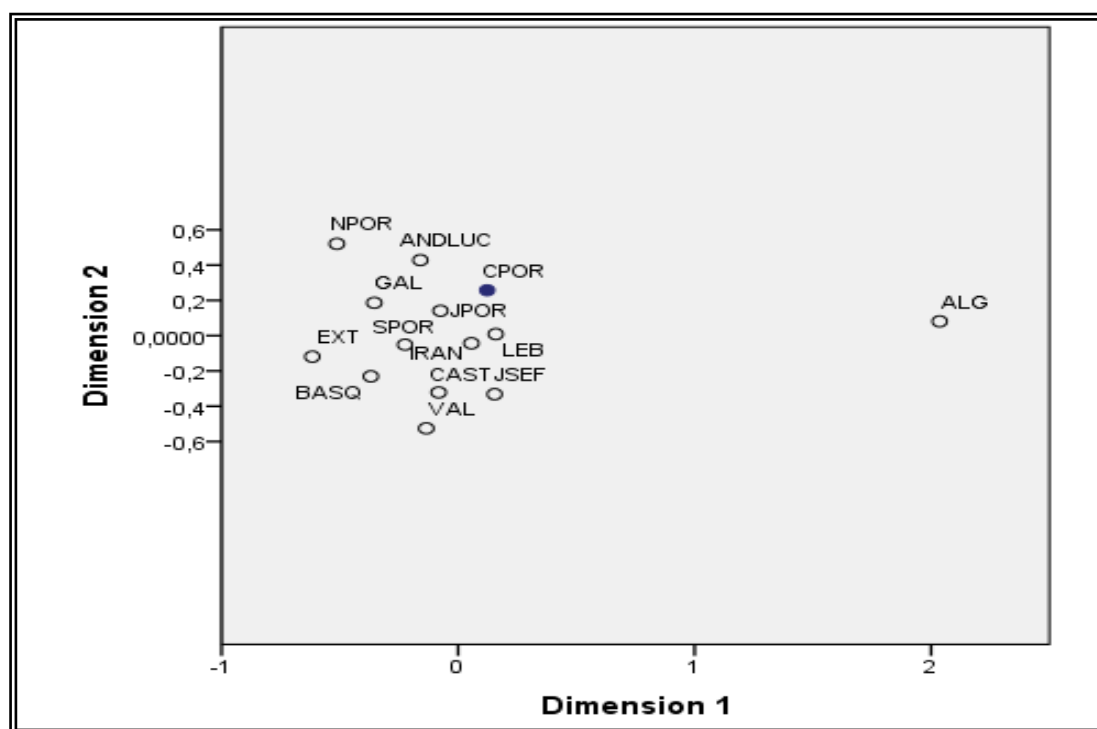


Figura 18 – Multidimensional scaling (MDS) baseado nos valores de F_{ST} de distância genética entre populações com base nos dados dos STRs estudados em amostras do haplogrupo J-M304 (marcador M304), obtidas na zona centro de Portugal (CPOR (representado a cor azul)), relativamente às de várias populações: JSEF – Judeus sefarditas, CAST – Castilla y León, EXT – Extremadura Espanhola, GAL – Galicia, VAL – Valencia, ANDLUC – Andalucia, BASQ – País Basco, NPOR – Norte Portugal, SPOR – Sul Portugal (Adams *et al.*, 2008); JPOR – Judeus Portugal (Nogueiro *et al.*, 2010); LEB – Líbano, IRAN – Irão (Haber *et al.*, 2011); ALG – Algéria (Robino *et al.*, 2008).

É imediatamente visível um aglomerado de populações do qual se destaca a população da Argélia, encontrando-se isolada. Isto permite aferir que amostras J-M304 da Península Ibérica (indivíduos de naturalidade portuguesa assim como espanhola) revelam maior proximidade com as populações do Médio Oriente do que com o Norte de África. A reforçar esta ideia, é notável a proximidade entre a população portuguesa em estudo e a população de Judeus portugueses que, por sua vez, pouco se distanciam do Líbano e do Irão.

Quanto às distâncias genéticas obtidas para J1-M267 (Figura 19), observa-se novamente o isolamento da população da Argélia. Neste gráfico é visível um certo distanciamento para a população em estudo relativamente ao pequeno aglomerado que inclui as amostras portuguesas e espanholas, as amostras de Judeus Portugueses e as amostras do Irão e do Líbano. Denota-se, de igual forma, algum distanciamento das amostras de Judeus sefarditas.

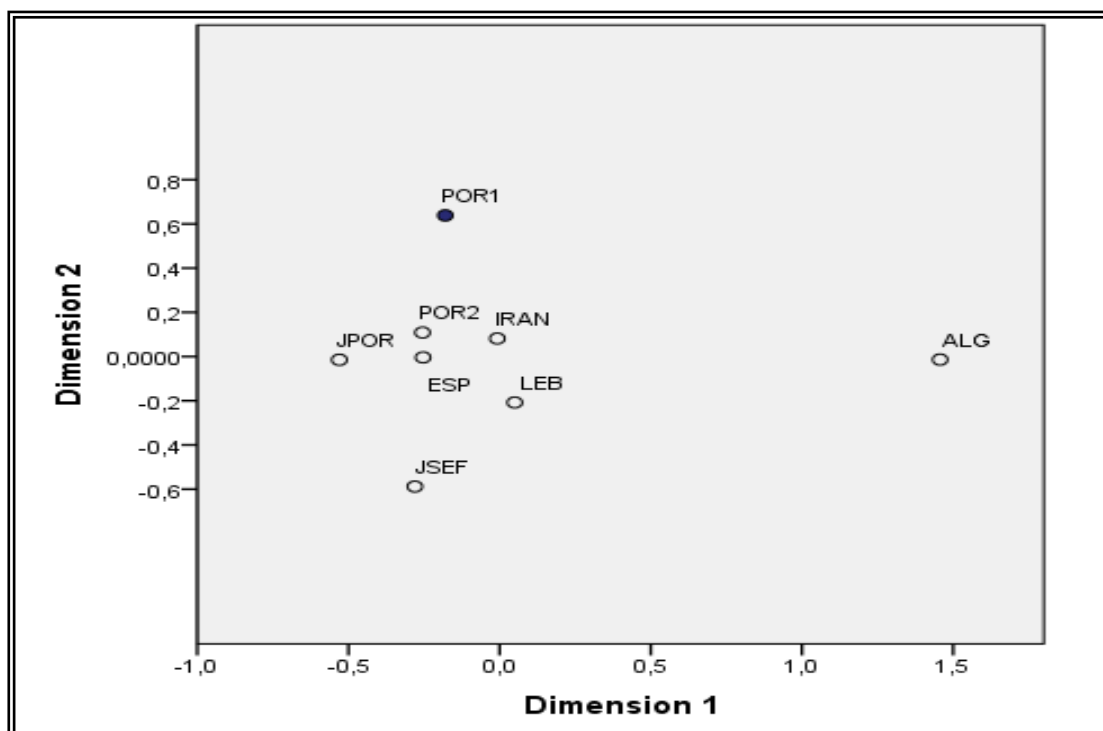


Figura 19 – Multidimensional scaling (MDS) baseado nos valores de F_{ST} de distância genética entre populações com base nos dados dos STRs estudados em amostras do sub-haplogrupo J1-M267 (marcador M267), obtidas em Portugal (POR1), relativamente às de várias populações: JSEF – Judeus sefarditas, ESP – Espanha, POR2 – Portugal (Adams *et al.*, 2008); JPOR – Judeus Portugal (Nogueiro *et al.*, 2010); LEB – Líbano, IRAN – Irão (Haber *et al.*, 2011); ALG – Argélia (Robino *et al.*, 2008).

No caso de J2-M172 apresentado na figura 20, mantém-se o isolamento da população da Argélia. Neste caso, é possível associar um certo centrismo à amostra populacional em estudo; no entanto, as amostras mais próximas desta são as de Judeus sefarditas (ao contrário do obtido para J1-M267), as do Sul de Portugal e as do Irão e Líbano.

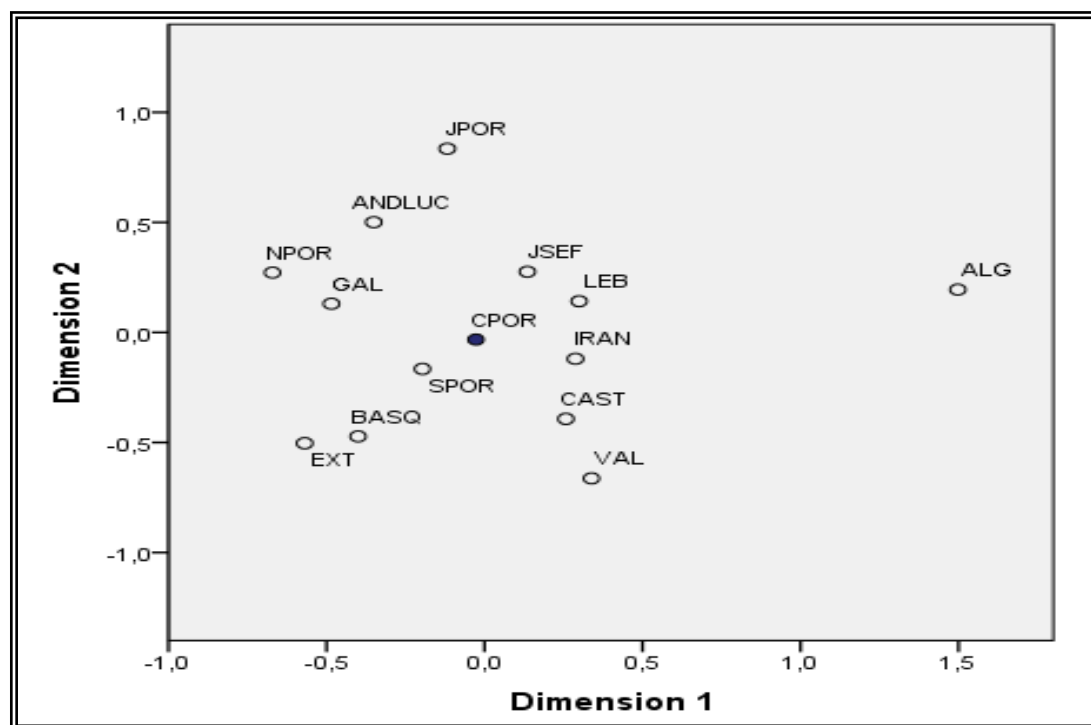


Figura 20 – Multidimensional scaling (MDS) baseado nos valores de F_{ST} de distância genética entre populações com base nos dados dos STRs estudados em amostras do sub-haplogrupo J2-M172 (marcador M172), obtidas na zona centro de Portugal (CPOR), relativamente às de várias populações: JSEF – Judeus sefarditas, CAST – Castilla y León, EXT – Extremadura Espanhola, GAL – Galicia, VAL – Valencia, ANDLUC – Andalucia, BASQ – País Basco, NPOR – Norte Portugal, SPOR – Sul Portugal (Adams *et al.*, 2008); JPOR – Judeus Portugal (Nogueiro *et al.*, 2010); LEB – Líbano, IRAN – Irão (Haber *et al.*, 2011); ALG – Argélia (Robino *et al.*, 2008).

Posteriormente, os STRs foram aplicados na análise de afinidades haplotípicas, através da construção de *networks*, considerando os dados obtidos com os mesmos STRs noutros estudos populacionais, quer na população portuguesa, quer em populações do Norte de África e do Médio Oriente.

Procedeu-se ainda à comparação destes haplótipos com os haplótipos propostos por Zalloua *et al.* (2008) como indicadores de marcas de colonização fenícia e grega, tendo sido encontrados no nosso estudo 3 sinais de colonização fenícia: 2 em amostras J1-M267 (PCS1+ e PCS2+) e 1 em amostras J2-M172 (PCS1+). Os sinais encontrados foram designados por Zalloua *et al.* (2008) como PCS1+ para a distribuição alélica

14,13,16,24,10,11,12, e PCS2+ para a distribuição alélica 14,14,17,23,10,11,12 considerando os marcadores DYS19, DYS389I, DYS389b (= DYS389I – DYS389II), DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393, respetivamente).

Foram construídas *networks* para os haplótipos do sub-haplogrupo J1-M267 (Figuras 21 e 22) e do sub-haplogrupo J2-M172 (Figuras 23 e 24) utilizando os dados obtidos neste trabalho, assim como dados obtidos noutros estudos, de modo a analisar as possíveis afinidades e a conseqüente história das populações. Para cada um dos sub-haplogrupos foram construídas 2 figuras: uma comparando com várias amostras populacionais portuguesas com populações estrangeiras consideradas pertinentes, e outra comparando apenas regiões de Portugal.

Na *network* obtida para as amostras classificadas no sub-haplogrupo J1-M267 (Figura 21) onde se compara a amostra populacional analisada neste trabalho com outras amostras da população geral portuguesa (Adams *et al.*, 2010), amostras de origem judaica da Península Ibérica (Nogueiro *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2010) e amostras de populações do Médio Oriente (Irão e Líbano) (Haber *et al.*, 2011) e Norte de África (Algéria) (Robino *et al.*, 2008), obteve-se uma rede complexa com diversos haplótipos.

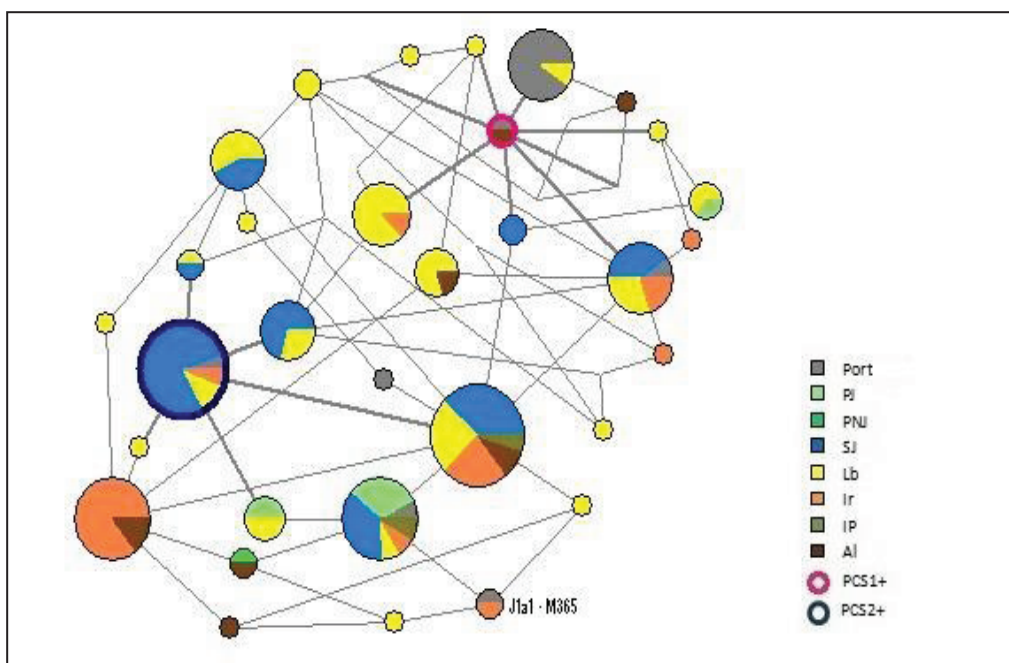


Figura 21 – Median-joining network para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J1-M267. Port – Portugal; PJ – Judeus Portugueses, PNJ – Portugueses Não-Judeus (Nogueiro *et al.*, 2010); SJ – Judeus Searditas, IP – Portugal (Adams *et al.*, 2008); Lb – Líbano, Ir – Irão (Haber *et al.*, 2011); Al – Algéria (Robino *et al.*, 2008); PCS1+ e PCS2+ - Sinais de colonização fenícios. STRs incluídos – DYS19, DYS389I, DYS389Ib, DYS390, DYS392, DYS393 (tamanho dos círculos proporcional à frequência do haplótipo; apresenta apenas o tronco principal da *network*; evidencia presença da amostra J1a1-M365).

O sinal fenício PCS1+ encontrado na população portuguesa num indivíduo natural do distrito de Coimbra é partilhado apenas com um haplótipo na Algéria. Este haplótipo PCS1+ encontra-se relacionado com o haplótipo mais comum encontrado nas amostras portuguesas em estudo, diferindo deste apenas num passo mutacional, e também com amostras, maioritariamente, de origem libanesa. O sinal PCS2+ também encontrado num indivíduo proveniente do distrito de Coimbra regista uma forte prevalência, sendo partilhado maioritariamente com Judeus sefarditas, mas também com amostras do Líbano e do Irão.

O único haplótipo da Algéria comum com a amostra populacional portuguesa em estudo é o que apresenta o sinal PCS1+. Quanto às restantes populações, todas elas apresentam haplótipos comuns com amostras portuguesas.

É possível também verificar a partilha do haplótipo correspondente à amostra J1a1-M365 com uma amostra do Irão.

A figura 22 apresenta a *network* para J1-M267 que compara as diferentes regiões para amostras portuguesas. Esta figura evidencia os dois sinais fenícios, PCS1+ e PCS2+, apresentados anteriormente na figura 21, e mostra que ambos pertencem à região da Beira Litoral (inclui distritos de Aveiro e Coimbra).

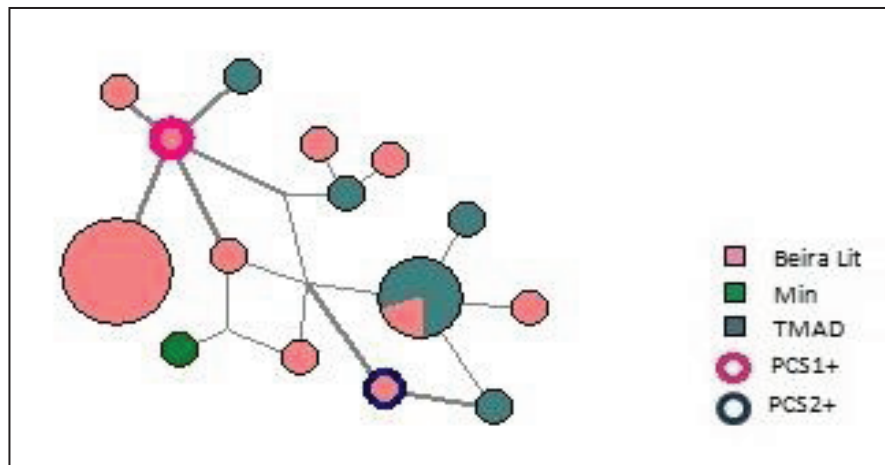


Figura 22 – Median-joining network para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J1-M267, apenas para as regiões de Portugal: Beira Lit – Beira Litoral, Min – Minho, TMAD – Trás-os-Montes e Alto Douro, PCS1+ e PCS2+ - Sinais de colonização fenícios. STRs incluídos – DYS19, DYS389I, DYS389IIb, DYS390, DYS392, DYS393 (tamanho dos círculos proporcional à frequência do haplótipo; apresenta apenas o tronco principal da *network*) (inclui amostras da população em estudo e de Nogueiro *et al.* (2010) de TMAD que inclui as amostras da população Judaica).

Nesta figura é de notar um único haplótipo pertencente à região do Minho isolado dos restantes, o qual corresponde à amostra identificada anteriormente como J1a1-M365. Esta *network* apresenta-se como mais linear e, ainda que não detetável nenhum haplótipo presente com efeito fundador, todos os haplótipos J1-M267 parecem divergir de um mesmo ponto central.

A figura 23 refere-se à *network* de J2-M172 que inclui amostras portuguesas do nosso estudo, amostras do estudo de Adams *et al.* (2008), amostras de origem judaica da Península Ibérica (Adams *et al.* 2008; Nogueiro *et al.* 2010) e, ainda, amostras de populações do Médio Oriente (Irão e Líbano) e Norte de África (Algéria). A *network* de haplótipos revela-se uma rede mais complexa do que a obtida para J1 da figura 21, e muito mais densa.

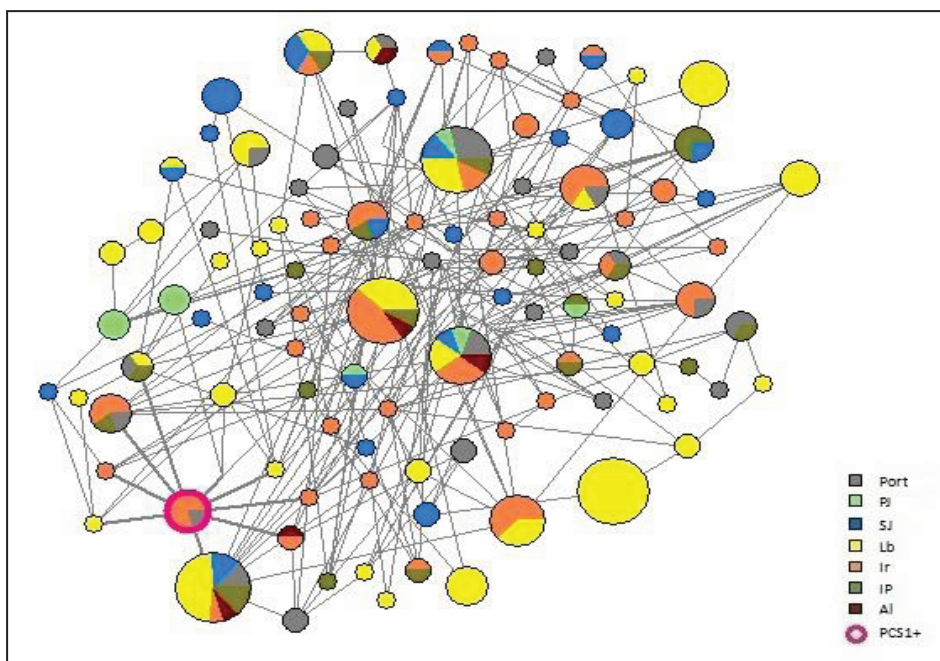


Figura 23 – Median-joining network para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J2-M172. Port – Portugal; PJ – Judeus Portugueses (Nogueiro *et al.*,2010); SJ – Judeus Searditas, IP – Portugal (Adams *et al.*, 2008); Lb – Líbano, Ir – Irão (Haber *et al.*, 2011); Al – Algéria (Robino *et al.*, 2008); PCS1+ - Sinal de colonização fenício. STRs incluídos – DYS19, DYS389I, DYS389Ib, DYS390, DYS392, DYS393 (tamanho dos círculos proporcional à frequência do haplótipo; apresenta apenas o tronco principal da *network*).

Para este conjunto de STRs foi encontrado apenas um sinal fenício PCS1+, o qual é partilhado com amostras do Irão. No geral, confirma-se a afinidade/compatibilidade de haplótipos verificada em J1-M267, mas, neste caso, é evidente uma maior diversidade haplotípica para este sub-haplogrupo.

A *network* da figura 24 mostra a distribuição de haplótipos apenas no âmbito das regiões portuguesas e verifica-se, novamente, a presença do sinal fenício PCS1+ (o mesmo apresentado na figura 23 para J2-M172) para a região da Beira Litoral.

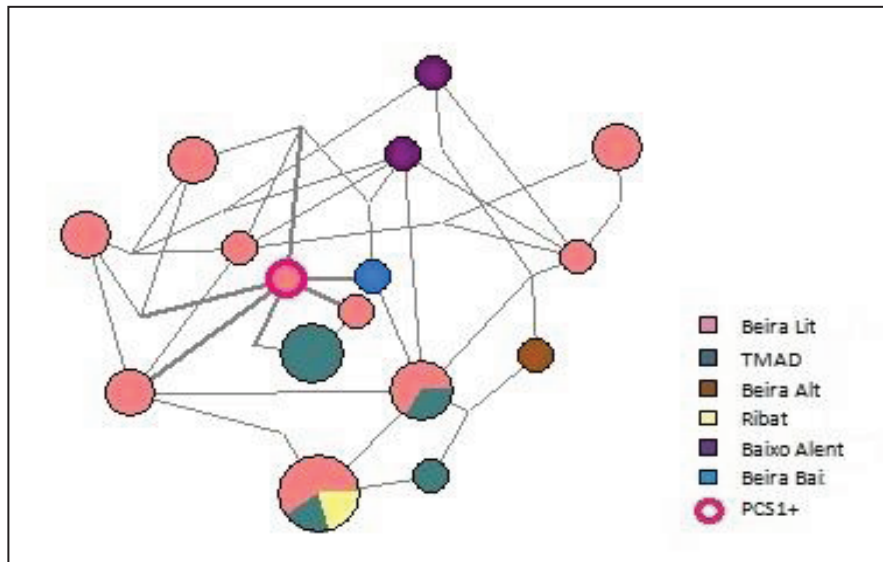


Figura 24 – Median-joining network para os haplótipos pertencentes ao sub-haplogrupo J2-M172, apenas para as regiões de Portugal: Beira Lit – Beira Litoral, TMAD – Trás-os-Montes e Alto Douro, Beira Alt – Beira Alta, Ribat – Ribatejo, Baixo Alent – Baixo Alentejo, Beira Bai – Beira Baixa, PCS1+ - Sinal de colonização fenício. STRs incluídos – DYS19, DYS389I, DYS389IIb, DYS390, DYS392, DYS393 (tamanho dos círculos proporcional à frequência do haplótipo; apresenta apenas o tronco principal da *network*) (inclui amostras da população em estudo e de Nogueiro *et al.* (2010) de TMAD).

5. Análise filogeográfica

A análise filogeográfica pretende relacionar a distribuição de haplogrupos e haplótipos com a história das populações humanas. A análise dos polimorfismos do cromossoma Y demonstra, precisamente, esta correlação e permite tirar conclusões sobre a provável origem e/ou eventos demográficos que possibilitaram a presença dos haplogrupos e haplótipos nas populações atuais (Semino *et al.*, 2002).

5.1. Haplogrupo J-M304

O haplogrupo J-M304 pensa-se ter tido origem no Médio Oriente e é caracterizado por um gradiente decrescente de frequência a partir desta região até à Europa Ocidental (motivo que suporta a ideia da sua origem) (Semino *et al.*, 2004).

A grande explicação para a chegada e dispersão deste haplogrupo na Europa são as grandes expansões a que foi sujeito, nomeadamente a expansão da agricultura a partir do Médio Oriente no Neolítico, com início há cerca de 10.000 a.C. (Semino *et al.*, 2004; Di Giacomo *et al.*, 2004), e as expansões marítimas fenícias e gregas mais recentes, segundo Capelli *et al.* (2006) e Zalloua *et al.* (2008) – o primeiro associa-as a J1-M267 e o segundo a J2-M172, respetivamente.

No entanto, há que relevar a importância do contributo dos Judeus para a presença deste haplogrupo em Portugal (Nebel *et al.*, 2002). Os Judeus de origem Portuguesa e Espanhola, conhecidos como Judeus sefarditas, têm uma presença na Península Ibérica que remonta, pelo menos, ao Império Romano com origem em tribos israelitas do Médio Oriente após a segunda diáspora judaica no ano 70 d.C. (Nogueiro *et al.* 2010).

A amostra populacional analisada neste trabalho apresenta para o haplogrupo J-M304, uma frequência de cerca de 10%, à semelhança das estimadas por Beleza *et al.* (2006) e Adams *et al.* (2008) para Portugal.

5.2. Sub-haplogrupo J1-M267

O sub-haplogrupo J1-M267 mostra frequências mais elevadas na península Arábica, Norte de África e Etiópia (Semino *et al.*, 2004). A sua presença na Europa e Este de África é explicada essencialmente pelos eventos migratórios a partir do Médio Oriente durante o Neolítico, e para o Norte de África por migrações mais recentes durante as invasões Árabes do séc. VII. A sua presença nas regiões litorais da Europa tem vindo a ser associada também às migrações marítimas dos fenícios durante o 1º milénio a.C. (Capelli *et al.*, 2006). A sua prevalência na Europa é relativamente baixa, tendo sido descrita em Portugal com uma frequência na população geral de 3,4% (Beleza *et al.*, 2006).

No nosso estudo, o sub-haplogrupo J1-M267 apresenta uma frequência de 1,9% e a sua presença foi exclusivamente detetada em regiões da Beira Litoral (Coimbra - 2,9%; Aveiro - 3,3%) (Tabela 7). Esta evidência permite associar a sua presença nestas regiões às expansões marítimas realizadas na antiguidade a partir do Médio Oriente, mais do que a qualquer outro evento.

O nosso estudo revelou dois haplótipos em amostras J1a2b-P58 considerados por Zalloua *et al.* (2008) como sinais genéticos fenícios, PCS1+ e PCS2+. As *networks* resultantes da análise de STRs (Figura 21) mostram que os dois sinais encontrados na população Portuguesa analisada são partilhados com outras populações. O sinal fenício PCS1+, embora partilhado com a Argélia, está próximo de outros haplótipos de origem Libanesa. Estes dados são compatíveis com uma influência por parte dos povos fenícios que se expandiram passando pelo Norte de África e chegaram também à costa Atlântica Portuguesa, nomeadamente a esta região litoral conforme atestam as ruínas localizadas no concelho da Figueira da Foz (ruínas de Santa Olaia). No mesmo sentido aponta o haplótipo mais comum encontrado nas amostras portuguesas, que difere do sinal PCS1+ apenas num passo mutacional e é partilhado com amostras de origem libanesa.

O sinal PCS2+ ao ser partilhado com amostras do Líbano e Irão também é compatível com esta hipótese de chegada a esta região litoral através das migrações marítimas provenientes do Médio Oriente.

No entanto, relativamente a esta amostra com sinal PCS2+, por ser partilhado com amostras de Judeus Sefarditas (Adams *et al.*, 2010), aponta também para a possibilidade de uma origem associada à presença Judaica no país. Neste sentido, o facto de esta amostra e de duas outras amostras J1a2b-P58, apresentarem o haplótipo

ancestral J1, descrito em Di Giacomo *et al.* (2004) como DYS19-14, DYS388-16, DYS390-23, DYS392-11, DYS393-12, o qual é compatível com o Haplótipo Modal Cohen associado aos Judeus (Thomas *et al.*, 1998), aponta para esta possibilidade de uma influência Judaica associada à presença das amostras com este modal na região.

Estes dados mostram que, relativamente às amostras identificadas com o sub-haplogrupo J1-M267, embora fosse de esperar uma ligação mais forte da população portuguesa com o Norte de África devido à presença muçulmana no país após 711 d.C., tal não é verificado ou, pelo menos, o Médio Oriente sobrepõe-se. A *network* de haplótipos da figura 21 revela apenas a amostra proveniente da Algéria a partilhar o haplótipo PCS1+ com a amostra populacional portuguesa analisada. Por outro lado, apenas 2 haplótipos da Algéria são partilhados com amostras portuguesas analisadas noutros estudos, nomeadamente com uma amostra de origem não-judaica de Nogueiro *et al.* (2010) e outra descrita por Adams *et al.* (2008).

Ao analisar a *network* apenas com as regiões de Portugal (Figura 22) observamos que ambos os sinais fenícios obtidos foram encontrados em amostras da Beira Litoral, o que sugere uma presença associada às migrações marítimas provenientes do Médio Oriente que atingiram a Costa Atlântica portuguesa na antiguidade.

Por outro lado, a *network* de haplótipos na figura 22 mostra que a maioria dos indivíduos da Beira Litoral não partilha os mesmos haplótipos com as amostras J1 de origem judaica de Trás-os-Montes, o que sugere origens diferentes para os dois conjuntos de amostras J1-M267.

A todos estes eventos demográficos que podem explicar a presença das amostras J1-M267 na região litoral centro do país, há ainda que considerar um outro, não menos importante, associado à presença de uma única amostra com o subtipo J1a1-M365 no Minho litoral (concelho de Viana do Castelo), e que se torna alvo de atenção pela sua exclusividade e, também, pelo haplótipo modal raro que apresenta. Numa pesquisa associada a bases de dados como SMGF (Sorenson Molecular Genealogy Foundation) e Y-HRD (Y – Chromosome Haplotype Reference Database), este haplótipo de J1a1-M365 revela uma presença considerável na Europa Central (Figura 25) e muito reduzida na zona do Médio Oriente. Estes dados levam a crer numa explicação justificativa da sua presença em Portugal diferente da atrás referida para as amostras J1-M267 encontradas na região centro.



Figura 25 – Mapa de projeção da presença do haplótipo J1a1-M365 (DYS19 - 15, DYS389I – 13, DYS389II - 29, DYS390 - 22, DYS391 - 10, DYS392 – 11, DYS393 – 13) no Mundo, obtido na base de dados Y-HRD (<http://www.yhrd.org/>).

A zona em que este haplótipo foi encontrado (Europa Central) sugere a possibilidade da sua proveniência estar associada às invasões bárbaras pelos povos germânicos. Na altura da invasão dos povos bárbaros (séc. V) – queda do Império Romano – na, hoje designada, Península Ibérica, foram fundados vários reinos pelos diferentes povos que contribuíram para estas invasões.



Figura 26 – Mapa Península Ibérica no séc. V ocupada pelos povos germânicos pós-invasões bárbaras. Em destaque – Reino Suevo (designado *Galécia*) no correspondente à zona Norte de Portugal e Galiza e Reino Alano.

A zona correspondente ao Minho, foi na altura ocupada pelos Suevos (Figura 26). A estadia destes povos terá durado mais de 150 anos o que sugere que a presença deste subtipo J1a1 possa estar associada à presença destes povos de origem germânica.

No entanto, o facto de este haplótipo ser também partilhado por uma amostra J1-M267 do Irão (Figura 21) coloca a possibilidade de a presença deste subtipo no Minho poder estar associada às invasões dos povos Alanos de língua iraniana que chegaram à península após a queda do império Romano e cuja proveniência está precisamente associada à zona do Irão.

5.3. Sub-haplogrupo J2-M172

O sub-haplogrupo J2-M172, o mais frequente do haplogrupo J-M304, foi encontrado no nosso estudo com uma frequência de 8%. O seu mapa de distribuição é bastante amplo e demonstra uma grande diversidade haplotípica. A nível de frequências, os resultados obtidos permitem assumir o subtipo J2a-M410 como o mais comum (cerca de 75% do total de J2-M172), tendo sido obtido cerca de 25% para o subtipo J2b2-M12.

Acredita-se que este sub-haplogrupo tem uma origem mais confinada à região da Ásia Menor (Semino *et al.*, 2004; Di Giacomo *et al.*, 2004), no entanto a sua dispersão para a Europa dever-se-á essencialmente à difusão démica da agricultura no Neolítico (Underhill *et al.*, 2001, Di Giacomo *et al.*, 2004), mas também às expansões marítimas pelos povos do Médio Oriente (Capelli *et al.*, 2006). Di Giacomo *et al.* (2004) defendem que o sub-haplogrupo J2-M172 se dispersou pelo Sul da Europa desde o Levante ou Anatólia paralelamente à expansão da agricultura no Neolítico (10.000 a.C. a 3.000 a.C.). O mesmo é defendido em Underhill *et al.* (2001) onde se assume esta difusão démica dos agricultores do Neolítico como grande motivadora da dispersão do haplogrupo J pela Europa. Zalloua e Wells (2004) afirmam que o sub-haplogrupo J2-M172 existe, pelo menos, desde a fundação de Jericho (acerca de 10.500 anos – 8.500 a.C.). E, ainda, quanto ao tempo de propagação pela Europa, Di Giacomo *et al.* (2004) apontam para eventos que pós-datam o Neolítico, tais como a ascensão do mundo Grego antigo (1.000 a.C.). De referir, também, o contributo dos Judeus para tais percentagens nas populações Europeias; por exemplo em Portugal amostras J2-M172 apresentam frequências mais elevadas em populações de origem Judaica (Nogueiro *et al.* 2010).

Todos estes fatores juntos apontam, para além da confirmação da sua maior dispersão, para um longo período dessa mesma dispersão, o que torna o sub-haplogrupo J2-M172 alvo de grande parte das expansões e migrações da pré-história e história portuguesas. Isto parece estar em concordância com a centralidade da população portuguesa observada na figura MDS para J2-M172 (Figura 20). Portugal figurou como uma área de fácil acesso quer para as expansões marítimas na antiguidade provenientes do Mediterrâneo, quer para a difusão démica da agricultura a partir do Médio Oriente (Pereira e Ribeiro, 2009). Esta figura MDS mostra também a proximidade com os Judeus sefarditas, o que corrobora a ideia da influência destes no legado genético português.

Nas *networks* obtidas para J2-M172 é clara a diversidade haplotípica deste sub-haplogrupo e observa-se também nas figuras 23 e 24 um sinal fenício PCS1+ encontrado numa amostra proveniente da Beira Litoral. O sinal é partilhado com amostras do Irão, e sugere uma vez mais uma influência fenícia no legado genético português, em particular nesta região litoral do centro do país onde a presença fenícia é historicamente conhecida.

CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo principal a caracterização do haplogrupo J numa amostra populacional Portuguesa. O foco do trabalho é a zona centro, no entanto a possibilidade de termos acesso a uma amostra mais alargada da população levou a conclusões mais abrangentes quanto à presença do haplogrupo J-M304 e seus subtipos em Portugal.

Os estudos desenvolvidos defendem que a origem do haplogrupo J se deu no Médio Oriente, e que a sua chegada a Portugal se deveu a diversas expansões, sendo elas a expansão da agricultura a partir do Médio Oriente no Neolítico e as expansões marítimas por parte de Fenícios e Gregos, também a partir do Médio Oriente, no 1º milénio a.C., não descurando ainda a diáspora Judaica no território nos últimos dois milénios.

No decorrer deste estudo uma das evidências obtidas foi a proximidade clara entre as amostras pertencentes ao haplogrupo J-M304 de origem portuguesa e as amostras de populações do Médio Oriente, o que não se verifica, pelo menos na mesma escala, com as amostras do Norte de África (Algéria). As diversas influências a que Portugal esteve sujeito no decorrer da pré-história e história, nomeadamente as expansões marítimas provenientes do Médio Oriente no primeiro milénio a.C., podem explicar a presença de algumas linhagens do cromossoma Y, principalmente nas regiões litorais Centro e Sul do país onde se registaram contactos com estas civilizações. Em concordância, a análise haplotípica permitiu encontrar na amostra populacional Portuguesa em estudo dois sinais de colonização fenícia descritos em Zalloua *et al.* (2008), em três amostras da Beira Litoral.

Na caracterização do haplogrupo J-M304 identificou-se as suas sub-linhagens J1-M267 e J2-M172 na amostra populacional estudada com frequências de 1,9% e 8,0%, respetivamente.

No sub-haplogrupo J1-M267, o subtipo J1a2b-P58 revelou maior percentagem (73,6%) e uma única amostra foi identificada como J1a1-M365 (5,3%). O subtipo J1a2b, anteriormente designado J1c3, é considerado como o mais comum para o sub-haplogrupo J1-M267. Neste subtipo foram encontrados na população em estudo dois sinais de colonização fenícia, PCS1+ e PCS2+, o que aponta para uma possível influência fenícia na região litoral através das expansões marítimas. Também o haplótipo ancestral J1, compatível com o Haplótipo Modal Cohen associado aos Judeus, foi identificado em três amostras P58 não colocando de parte a possibilidade de

uma origem nas amostras com este modal associada à presença judaica no país. A análise haplotípica de uma amostra J1a1-M365 identificada na região litoral do Minho revelou um haplótipo raro e cuja chegada poderá estar associada às invasões bárbaras após a queda do Império Romano, neste caso com foco nos Suevos que ocuparam a zona Norte de Portugal, ou nos Alanos de língua iraniana.

Para o sub-haplogrupo J2-M172, o subtipo J2a-M410 mostrou ser o mais comum (75,7%), e o J2b2-M241 apresentou uma percentagem de 24,3%. A análise de STRs permitiu verificar para este sub-haplogrupo uma diversidade haplotípica elevada, que poderá ser explicada quer pela sua maior antiguidade relativamente ao sub-haplogrupo J1-M267, quer pela sua chegada ao território a partir de vários locais por meio de diferentes eventos migratórios. Também o haplogrupo J2-M172 revelou a presença de um sinal fenício PCS1+ numa amostra da Beira litoral, partilhado com amostras do Irão, o que uma vez mais sugere a influência das expansões marítimas provenientes do Médio Oriente.

Em conclusão, o estudo dos subtipos do haplogrupo J-M304 - pela primeira vez realizada com amostras de naturalidade portuguesa - permitiu-nos identificar dois subtipos J1-M267, nomeadamente J1a2b-P58 e J1a1-M365, tendo sido possível associar a sua presença no território a eventos demográficos e históricos distintos. Relativamente ao sub-haplogrupo J2-M172 foram também identificados dois subtipos, J2a-M410 e J2b2-M241, não tendo sido possível, no entanto, relacionar cada um dos subgrupos a eventos demográficos específicos.

BIBLIOGRAFIA

Adams S.M., Bosch E., Balaesque P.L. *et al.* (2008). The genetic legacy of religious diversity and intolerance: paternal lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet*; **83**(6):725-36.

Beleza S., Gusmão L., Lopes A. *et al.* (2006). Micro-phylogeographic and demographic history of Portuguese male lineages. *Ann Hum Genet*; **70**:181-94.

Bowler P.J. *Evolution: The History of an Idea*. 3rd edition ed. [S.l.]: University of California Press, 2003.

Capelli C., Brisighelli F., Scarnicci F., Arredi B., Caglia' A., Vetrugno G., Tofanelli S., Capelli C., Redhead N., Romano V. *et al.* (2006). Population structure in the Mediterranean basin: a Y chromosome perspective. *Am Hum Genet*; **70**:207-25.

Chiaroni J., King R.J., Myres N.M., Henn B.M., Ducourneau A., Mitchell M.J., Boetsch G., Sheikha I., Lin A.A., Nik-Ahd M., Ahmad J., Lattanzi F., Herrera R.J., Ibrahim M. E., Brody A., Semino O., Kivisild T., and Underhill P.A. (2010). The emergence of Y-chromosome haplogroup J1e among Arabic-speaking populations. *European Journal of Human Genetic*; **18**, 348–353.

Cinnioglu C., King R., Kivisild T., Kalfoglu E., Atasoy S., Cavalleri L., Lillie S., Roseman C. *et al.* (2004). Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Human Genetics* **114** (2): 127–48.

Di Giacomo F., Luca F., Anagnou N., Ciavarella G., Corbo R. M., Cresta M., Cucci F., Di Stasi L., Agostiano V., Giparaki M., Loutradis A., Mammi C., Michalodimitrakis E. N., Papola F., Pedicini G., Plata E., Terrenato L., Tofanelli S., Malaspina P. & Novelletto A. (2003). Clinal patterns of human Y chromosomal diversity in continental Italy and Greece are dominated by drift and founder effects. *Mol Phylogenet Evol* **28**, 387–95.

Di Giacomo F., Luca F., Popa L. O., Akar N., Anagnou N., Banyko J., Brdicka R., Barbujani G. *et al.* (2004). Y chromosomal haplogroup J as a signature of the post-neolithic colonization of Europe. *Human Genetics* **115** (5): 357–71.

Francalacci P., Sanna D. (2008). History and geography of human Y-chromosome in Europe: a SNP perspective. *J Anthropol Sci*; **86**:59-89.

Gillespie, John H. *Population Genetics: A Concise Guide*. Baltimore/London: The John Hopkins University Press, 1998. 169 p. p. 19-48.

- Goncalves R., Freitas A., Branco M., Rosa A., Fernandes A. T., Zhivotovsky L. A., Underhill P. A., Kivisild T. *et al.* (2005). Y-chromosome Lineages from Portugal, Madeira and Acores Record Elements of Sephardim and Berber Ancestry. *Annals of Human Genetics*; **69** (4): 443–54.
- Haber M., Platt D., Badro D., Xue Y., El-Sibai M. *et al.* (2011). Influences of history, geography, and religion on genetic structure: the Maronites in Lebanon. *European Journal of Human Genetics*; **19**:334–340.
- Hammer MF, Blackmer F, Garrigan D, Nachman MW, Wilder JA. (2003). Human population structure and its effects on sampling Y chromosome sequence variation. *Genetics*. **164**:1495–1509.
- Hammer M.F., Zegura S.L. (1996). The role of the Y chromosome in human evolutionary studies. *Evol Anthropol*; **5**:116-134.
- Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B., Underhill P.A., Zegura S.L. and Hammer M.F. (2008). New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.*; **18**: 830-838.
- King, R.J.; Özcan, S.S.; Carter, T.; Kalfoglou, E.; Atasoy, S.; Triantaphyllidis, C.; Kouvatzi, A.; Lin, A.A. *et al.* (2008). Differential Y-chromosome Anatolian Influences on the Greek and Cretan Neolithic. *Annals of Human Genetics*; **72** (2): 205–14.
- Lahn T., Pearsn N., Jegalian K. (2001). The human Y chromosome in the light of evolution. *Nature Reviews*; **2**:207-216.
- Larson E.J. *Evolution: The Remarkable History of a Scientific Theory*. [S.l.]: Modern Library, 2004.
- Martiniano R., Feitosa Y., Abade A., Manco L. (2013). Y-chromosome diversity in central Portugal reveals signatures of ancient maritime expansions. *J. Biol. Clin. Anthropol. - Anthropol. Anz.* 70/4, pp. 355–367.
- Nebel A., Landau-Tasserion E., Filon D., Oppenheim A., Faerman M. (2002). Genetic Evidence for the Expansion of Arabian Tribes into the Southern Levant and North Africa. *The American Journal of Human Genetics* **70** (6): 1594–6.
- Nogueiro I., Manco L., Gomes V., Amorim A., Gusmão L. (2010). Phylogeographic Analysis of Paternal Lineages in NE Portuguese Jewish Communities. *American Journal of Physical Anthropology*; **141**:373–381.

Pereira L., Ribeiro F. (2009) *O Património Genético Português*. Gradiva Publicações, 202 pp.

Regueiro M., Cadenas A.M., Gayden T., Underhill P.A., Herrera R.J. (2006). Iran: Tricontinental Nexus for Y-Chromosome Driven Migration. *Human Hered.* **61**:132-143.

Repping S., Van Daalen S.K., Brown L.G., Korver Cindy M., Lange J., Marszalek D., Pyntikova T., Van Der Veen F. *et al.* (2006). High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat Genet* **38** (4): 463–467.

Richards M., Côrte-Real H., Forster P., Macaulay V., Wilkinson-Herbots H., Demaine A., Papiha S., Hedges R., Bandelt H.-J., Sykes B. (1996). Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.*; **59**, 185–203.

Robino C., Crobu F., Di Gaetano C., Bekada A. *et al.* (2008). Analysis of Y chromosomal SNP haplogroups and STR haplotypes in an Algerian population sample. *Int J Legal Med.*; **122**:251–255.

Roewer L., Croucher P.J., Willuweit S., Lu T.T., Kayser M., Lessig R., de Knijff P., Jobling M.A., Tyler-Smith C., and Krawczak M. (2005). Signature of recent historical events in the European Y-chromosomal STR haplotype distribution. *Hum. Genet.*; **116**, 279–291.

Semino O., Magri C., Benuzzi G., Lin A.A., Al-Zahery N., Battaglia V., MacCioni L., Triantaphyllidis C. *et al.* (2004). Origin, Diffusion, and Differentiation of Y-Chromosome Haplogroups E and J: Inferences on the Neolithization of Europe and Later Migratory Events in the Mediterranean Area. *The American Journal of Human Genetics*; **74**(5): 1023–34.

Semino O., Santachiara-Benerecetti A.S., Falashi F. *et al.* (2002). Ethiopians and Khoisan share the deepest clades of human Y-chromosome phylogeny. *Am J Hum Genet*; **70**:265-268.

Sengupta S., Zhivotovsky L.A., King R., Mehdi S.Q., Edmonds C.A., Chow T., Lin A.A., Mitra M. *et al.* (2006). Polarity and Temporality of High-Resolution Y-Chromosome Distributions in India Identify Both Indigenous and Exogenous Expansions and Reveal Minor Genetic Influence of Central Asian Pastoralists. *The American Journal of Human Genetics* **78** (2): 202–221.

Thomas M.G., Skorecki K., Ben-Ami H., Parfitt T., Bradman N., Goldstein D.B. (1998). Origins of old testament priests. *Nature* **394**:138–140.

Tofanelli S., Ferri G., Bulayeva K., Caciagli L., Onofri V., Taglioli L., Bulayev O., Boschi I. *et al.* (2009). J1-M267 Y lineage marks climate-driven pre-historical human displacements. *European Journal of Human Genetics*; **17** (11): 1520–4.

Underhill P.A., Jin L., Lin A.A., Mehdi S.Q., Jenkins T., Vollrath D., Davis R.W., Cavalli-Sforza L.L. and Oefner P.J. (1997). Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* **7**: 996–1005.

Underhill P.A., Passarino G., Lin A.A., *et al.* (2001). The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann Hum Genet*; **65**:43-62.

Underhill P.A., Shen P., Lin A.A. *et al.* (2000). Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat Genet*; **26**(3):358-61.

Zalloua P., Platt D., El Sibai M., Khalife J., Makhoul N., Haber M., Xue Y., Izaabel H. *et al.* (2008). Identifying Genetic Traces of Historical Expansions: Phoenician Footprints in the Mediterranean. *The American Journal of Human Genetics* **83** (5): 633–42.

Zalloua, P., Wells, S. (2004). Who Were the Phoenicians? *National Geographic Magazine*, October 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 – Protocolo Extração de ADN por *FavorPrep Genomic DNA Mini Kit*

PASSO 1: LISE

1. Colher células da mucosa bucal com zaragatoa/escova
2. Suspender em 1 ml de H₂O num tubo de 1,5 ml
3. Centrifugar a 10.000 rpm (3 min.)
4. Eliminar sobrenadante
5. Adicionar 150 µl de FATG Buffer
6. Adicionar 20 µl de Proteinase K (56°C, 1 h.)
7. Adicionar 200µl de FABG Buffer - *Vortex* (5 a 10 seg.)
(Pré-aquecer Elution Buffer a 70°C – para utilizar no passo 4)

PASSO 2: *BINDING*

8. Adicionar 200µl de Etanol (96-100%) - *Vortex* (10 seg.)
9. Colocar coluna FABG em tubo de 2 ml - Transferir a mistura para a coluna -
Centrifugar 5 min. a 12.000 rpm. - Esvaziar tubo e recolocar coluna

PASSO 3: LAVAGEM

10. Adicionar à coluna 400 µl de W1 Buffer - Centrifugar 1 min. a 12.000 rpm. -
Esvaziar tubo e recolocar coluna
11. Adicionar à coluna 600 µl de Wash Buffer - Centrifugar 1 min. a 12.000 rpm. -
Esvaziar tubo e recolocar coluna
12. Centrifugar a 12.000 rpm (3 min.)

PASSO 4: ELUIÇÃO

13. Transferir coluna FABG para tubo colector de 1,5 ml.
14. Adicionar 50 µl de *Elution Buffer* (a 70°C) à coluna para recolha do ADN
15. Centrifugar a 12.000 rpm (1 min.)
16. Guardar ADN a 4°C ou -10°C

ANEXO 2 – Protocolo de coloração *Silver-Staining*

1. Etanol (10%) (10 min.)
2. Ácido nítrico (5 min.)
3. Lavagem com água destilada (2 vezes)
4. Nitrato de prata (AgNO_3) (20 min.)
5. Lavagem com água destilada (2 vezes)
6. Solução de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) (0,28M) (3%)
Adiciona-se Formaldeído (0,02%) – 20 μl / 100 ml de solução Na_2CO_3
7. Ácido acético (10%)
8. Água destilada

ANEXO 3

Tabela 6 – Haplótipos obtidos pela análise dos Y-STRs: DYS19, DYS389I, DYS389IIb, DYS390, DYS392, DYS393 com apresentação do respetivo haplogrupo e indicando a presença dos sinais fenícios definidos por Zalloua *et al.* (2008). O haplótipo ancestral J1 (Di Giacomo *et al.*, 2004) encontra-se sublinhado.

DYS19	DYS389I	DYS389II	DYS389IIb	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	DYS388	Id Haplogrupo	Haplótipo Ancestral Di Giacomo <i>et al.</i> (2004)	Sinal fenício Zalloua <i>et al.</i> (2008)
14	13	30	17	23	10	11	13	16	J1(xJ1a1;J1a2a;J1a2b)		
15	12	29	17	24	10	11	12	15	J1(xJ1a1;J1a2a;J1a2b)		
16	13	29	16	24	9	11	12	15	J1(xJ1a1;J1a2a;J1a2b)		
13	12	29	17	24	10	11	12	15	J1(xJ1a1;J1a2a;J1a2b)		
15	13	29	16	22	10	11	13	16	J1a1		
14	14	31	17	23	10	11	12	16	J1a2b	Haplótipo ancestral J1	PCS+2
14	13	29	16	23	10	11	12	16	J1a2b	Haplótipo ancestral J1	
14	13	31	18	22	10	11	12	15	J1a2b		
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	24	10	11	12	16	J1a2b		PCS+1
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	31	18	23	10	11	12	16	J1a2b	Haplótipo ancestral J1	
14	13	29	16	25	10	11	12	16	J1a2b		
14	13	29	16	23	11	11	12	12	J2a		
15	13	29	16	23	9	11	12	12	J2a		
14	12	28	16	23	10	11	12	12	J2a		
15	13	29	16	23	10	11	12	12	J2a		
14	13	29	16	26	10	11	12	12	J2a		
15	13	29	16	23	10	11	12	12	J2a		
13	14	30	16	24	11	11	12	12	J2a		
14	13	29	16	24	10	11	12	12	J2a		
14	13	29	16	23	10	11	12	12	J2a		PCS+1
14	14	31	17	23	10	11	13	13	J2a		

