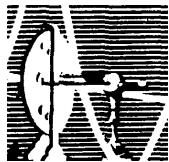


ABDULWAHAB ABDULATIF KHALIFA AL-DEIB

ESTUDO DE MARCADORES GENÉTICOS
MOLECULARES EM AMOSTRAS DA POPULAÇÃO
LÍBIA

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AL-DEIB, ABDULWAHAB ABDULATIF KHALIFA.

Estudo de Marcadores Genéticos Moleculares em Amostras da População Líbia

Abdulwahab Abdulatif Khalifa Al-Deib. Rio de Janeiro: UFRJ; Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

xix, 111 Folhas

Orientadores: Rosane Silva e Rodrigo Soares Moura-Neto

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-graduação em Biologia Molecular e Estrutural (Biofísica), 2009.

Referência bibliográfica: f.

1- Marcadores Genéticos Moleculares. 2- STRs. 3- População Líbia. 4-Árabes e Berberes.
5- Cromossomos autossômicos e Y 6- mtDNA 7- Haplogrupo e Haplótipo.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisa e Perícia em Genética Forense, PCERJ – RJ, e Genealógica Diagnósticos Moleculares - Rio de Janeiro – RJ, sob a orientação de Rosane Silva e Rodrigo Soares Moura-Neto. Apoio financeiro: FAPERJ, CNPq.

Abdulwahab Abdulatif Khalifa Al-Deib

Estudo de Marcadores Genéticos Moleculares
em Amostras da População da Líbia

Orientadora: Profa. Rosane Silva

Co-Orientador: Prof. Rodrigo Soares de Moura-Neto

Dissertação de Doutorado submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutorado em Ciências.

Aprovada por:

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Rio de Janeiro

Abril, 2009

*À minha mãe Fatma Saad Bin Hadia e minha avó Salema (in memoriam),
Ao meu Pai Abdulatif Al-Deib e às minhas Irmãs e Irmão
Aos pais da minha esposa Abduladem Masri e Fouzia Elgol
Aos meus filhos, Mohammed, Ranim, Rua e Taha Al-Deib.
E à minha esposa Raga*

AGRADECIMENTOS

A Deus

Aos meus Orientadores, Profa. Rosane Silva e Prof. Rodrigo Moura-Neto por, além de outras coisas, toda a dedicação, paciência e compreensão.

Aos Profs. Edson Rondinelli e Prof. Turán P. Urményi.

A todos os membros e ex-membros do LMMFTC. À Carol, Roberta, Luisa, Cíntia, Sylvia, Juliene e Fabiane, pela amizade, paciência e colaboração sempre que necessário. À Elielton, Deivid, Ernesto, Marcelo F., Jorge e César pela serenidade e paciência e por estarem sempre prontos a ajudar. Ao Claudio Nunes Pereira (Bill) pela dedicação com todo o laboratório.

Ao Leonardo e Fernando pela amizade e compreensão.

Aos meus amigos na Líbia; Abdulrhaman, Ayad, Mohammed, Muftah pela amizade.

Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos e Dra. Andrêa Kely Campos Ribeiro dos Santos, Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas

Ayad Issa Aboud, Al-Gala Hospital of Gynecology and Maternity, Tripoli – Libya

Aos peritos do Instituto de Pesquisa e Perícia em Genética Forense, PCERJ, RJ

A Elisabeth, Priscila, Eliane e Leopoldina da Genealógica Diagnósticos Moleculares, Rio de Janeiro, RJ.

ÍNDICE GERAL

Índice Geral	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Índice de Anexos	xiii
Lista de Abreviações	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xviii
1. Introdução	1
1.1 Situação geográfica da Líbia	2
1.2 História da Líbia	3
1.3 Composição étnica da população da Líbia	4
1.3.1 Árabes	5
1.3.2 Berberes	5
1.3.3 Tuaregues	6
1.3.4 Tebu e Negros Africanos	6
2. Histórico dos Polimorfismos de DNA	7
2.1 Classificação de Polimorfismos de DNA	7
2.1.1 Polimorfismo de sequência	8
2.1.2 Polimorfismo de tamanho de número de repetição	9
I Microssatélites	
II. Minissatélite	
2.2 Marcadores genéticos de Cromossomos autossômicos	10
2.3 Marcadores genéticos do Cromossomo Y	10
2.4 Marcadores genéticos de DNA mitocondrial (mtDNA)	12
2.4.1 Variação genética populacional do DNA mitocondrial	14
2.4.2 As linhagens mitocondriais da África	17
2.4.3 As linhagens mitocondriais da Europa	17
2.4.4 As linhagens mitocondriais da Ásia	17
2.4.5 As linhagens mitocondriais das Américas	18
2.5 Distância genética entre populações	18
2.6 Estudos Genéticos da População da África do Norte	19
3. Objetivo Geral	21
3.1 Objetivos Específicos	21

4. Material e Métodos	22
4.1 Lista de Tampões e Soluções.....	22
4.2 Coleta e procedência das amostras	23
4.3 Extração do DNA genômico.....	24
4.3.1 Extração não orgânica	24
4.3.2 Extração com solvente orgânico	25
4.3.3 Resina magnética e sistema automatizado -	26
4.4 Eletroforese em gel de agarose	26
4.5 Análise de produtos de amplificação por eletroforese em gel de policrilamida desnaturante	26
4.6 Revelação do DNA em gel poliacrilamida através de impregnação com prata	27
4.7 Análise de STR autossômicos	28
4.8 Análise de cromossomo Y	28
4.9 Eletroforese dos produtos de PCR em analisador genético capilar	31
4.10 Amplificação de mtDNA e sequenciamento.....	32
4.10.1 Reação de sequenciamento e análise de alinhamento... 33	
4.11 Análise Estatística	35
4.11.1 <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> v.14 (SPSS) 35	
4.11.2 <i>Genetic Data Analysis</i> (GDA)..... 35	
4.11.3 <i>Dispan (Genetic Distance and Phylogenetic Analysis)</i> ... 35	
4.11.4 Cálculo de Diversidade Haplotípica	36
4.11.5 <i>Arlequin</i> 3.11..... 36	
4.11.6 <i>Median Joining Network</i> 4.5.1.0..... 36	
5. Resultados	37
5.1 Marcadores de repetições em tandem (STR) em cromossomos autossômicos	37
5.2 Marcadores STR do Cromossomo Y	47
5.2.1 Diversidade de haplótipos do cromossomo Y	50
5.3 Análise do DNA mitocondrial	62
5.3.1 Haplótipos e Haplogrupos de DNA mitocondrial	62
5.3.2 Distribuição de haplogrupos entre os grupos étnicos Árabes e Berberes.....	73

5.3.3 Comparação dos Haplogrupos em populações geograficamente relacionadas	77
6. Discussão	80
7. Conclusões	90
8. Referências Bibliográficas	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa político atual do Norte da África e Europa Mediterrânea.....	02
Figura 2: Diagrama da linha do tempo representando a História da Líbia	03
Figura 3: Distribuição demográfica da população da Líbia e suas regiões; Tripolitânia, Cirenaica e Fezzan.	04
Figura 4: Mapa do genoma mitocondrial humano e diagrama expandido da região controle não-codificante.....	13
Figura 5: Haplogrupos de DNA mitocondrial (mtDNA):	16
Figura 6: Comparação das sequências obtidas nas duas fitas da mesma amostra com a Sequência Referência de Cambridge (rCRS) para identificação de mutações de mtDNA.....	34
Figura 7: Eletroferograma do perfil de STR autossômicos de uma amostra (A16) . . .	38
Figura 8A: Posicionamento da população da Líbia em relação a países da Europa e África do Norte.	45
Figura 8B Árvore filogenética das distâncias F_{ST} (marcadores autoss entre populações de países da Europa e África do Norte.	46
Figura 9: Eletroferograma do perfil STR do cromossomo Y de um indivíduo (amostra R59).....	48
Figura 10: Distribuição percentual em populações do mundo dos haplótipos (haplótipo mínimo – 10 marcadores) do cromossomo Y encontrados na população da Líbia	55
Figura 11: Árvore em rede dos haplótipos de STR de cromossomo Y em 10 marcadores (haplótipo mínimo – 10 marcadores)	57
Figura 12A: Posicionamento das populações dos Líbios Árabes e Líbios	

Berberes em relação a países da Europa, Ásia, África do Norte e África Sub-Saara.	60
Figura 12B: Árvore Filogenética das distâncias genéticas F_{ST} entre estas populações	61
Figura 13: Distribuição homogênea de haplótipos de DNA mitocondrial dos Líbios de origem berbere e árabe. Árvore em rede das sequências de DNA mitocondrial da região HVI.....	72
Figura 14: Posicionamento das populações dos Líbios Árabes e Líbios Berberes em relação às populações dos Berberes da África do Norte, Árabes da África do Norte e Árabes da Ásia.....	76
Figura 15A: Posicionamento das populações da Líbia em relação às populações da Europa, Ásia, África do Norte e África Sub-Saariana	78
Figura 15B: Posicionamento de populações da África do Norte, Ásia, Europa e África Sub-Saariana.	79
Figura 16: O mundo e as migrações históricas.	81
Figura 17: Mapa da África do Norte mostrando a invasão e o avanço dos Árabes na direção de Marrocos utilizando a força dos Berberes.....	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Amostras disponíveis para o estudo separadas por gênero e grupo étnico.....	24
Tabela 2: Marcadores STR autossômicos utilizados no estudo: local no cromossomo, tipo de repetição e respectivo fluoróforo	29
Tabela 3: Marcadores STR do cromossomo Y utilizados no estudo.....	30
Tabela 4: Genotipagem de 55 amostras da população da Líbia com marcadores autossômicos (STR)	40
Tabela 5: Frequência alélicas e parâmetros populacionais de 15 marcadores autossômicos (STR)	42
Tabela 6: Distância genética (F_{ST}) entre Líbia, Egito, Tunísia, Grécia e Itália com 8 marcadores autossômicos (D16S539, D18S51, D21S11, D3S1358, D8S1179, FGA, TH01 e vWA).....	44
Tabela 7: Haplogrupos de STR do Cromossomo Y entre os grupos étnicos majoritários da Líbia: Árabes e Berberes.....	51
Tabela 8: Distâncias genéticas, F_{st} , entre populações da África do Norte, Europa, Ásia e África Sub-Saariana, calculada a partir dos haplótipos de STR do cromossomo Y, usando o programa GDA	59
Tabela 9: Sítios de mutação observados nas sequências da região controle da mtDNA, com relação a rCRS.....	64
Tabela 10: Distâncias Genéticas, medida em F_{ST} , entre populações do Norte da África, Sub-Saara, Ásia e Europa a partir dos haplogrupos de DNA mitocondrial.....	75

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: Tabela de frequências alélicas dos STR autossômicos das populações do Líbia, Egito, Tunísia, Grécia e Itália não orgânica	100
ANEXO II: Tabela de genótipos de marcadores do cromossomo Y obtidos com o kit Y-Filer (<i>Applied Biosystems</i>) não orgânica	102
ANEXO III: Tabela de genótipos do cromossomo Y obtidos com o kit PowerPlex Y (Promega Corp.) não orgânica	104
ANEXO IV: Frequência dos Haplogrupos de DNA mitocondrial das populações e grupos étnicos (Árabes e Berberes) da África do Norte não orgânica.....	108
.....	10
Frequência dos Haplogrupos de DNA mitocondrial das populações da África, Sub-Saara, Ásia e Europa	10
9	
ANEXO V: Formulário de consentimento livre e esclarecido para coleta de material biológico	11
0	

LISTA DE ABREVIACOES

ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
ddNTP	<i>Dideoxynucleotide-tri-phosphate</i> (didesoxirribonucleotdeo trifosfato)
dNTP	<i>Deoxynucleotide-tri-phosphate</i> (desoxirribonucleotídeo trifosfatado)
Fita H	Fita <i>Heavy</i> (pesada)
Fita L	Fita <i>Light</i> (leve)
F_{ST}	Indici de Fixação ou Estatística - F
H_{esp}	Heterozigose Esperada
H_{obs}	Heterozigose Observada
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HV1	<i>Hypervariable Region 1</i> (Região hipervarivel 1) (HVI)
HV2	<i>Hypervariable Region 2</i> (Região hipervarivel 2) (HVII)
HV3	<i>Hypervariable Region 3</i> (Região hipervarivel 3) (HVIII)
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> (Equilíbrio de Hardy-Weinberg)
GDA	<i>Genetic Data Analysis</i>
Indel	inserção/deleção
MDS	<i>Multidimensional Scale</i> (Escala Multidimensional)
MEC	Chance de Excluso Significativa
mtDNA	Mitochondrial DNA (DNA mitocondrial)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reao em Cadeia da Polimerase)
RC	Região Controle
rCRS	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge revisada)
RFLPs	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Enzima de Restrição)
SINEs	<i>Short Interspersed Element</i> (Pequenos Elementos Dispersos)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismos de Nucleotídeo nico)

STR	<i>Short Tandem Repeats</i> (Repetições Curtas em Tandem)
UPGMA	<i>Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (Número Variável de Repetições em Tandem)
YHRD	<i>Y-STR haplotype reference database</i> – (banco de dados referência de STR de Y)

RESUMO

Estudos utilizando marcadores genéticos moleculares têm sido realizados com amostras das populações mundiais com o objetivo de aplicar o conhecimento de migrações humanas e além disso fornecer informações aplicadas à identificação humana. A Líbia é um país da África do Norte e tomou parte na história humana desde um passado muito remoto. A população da Líbia atual é composta de grupos étnicos distintos entre os quais os de origem Árabe e Berbere são os majoritários. Neste trabalho utilizamos marcadores genéticos de DNA STR de cromossomos autossômicos e do cromossomo Y, além das regiões HVI e HVII do DNA mitocondrial de uma amostra da população da Líbia com objetivo de obter parâmetros genéticos populacionais. Analisamos 55 indivíduos não relacionados, com 15 marcadores autossômicos, que não mostraram desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Com os dados de oito marcadores disponíveis para outras 4 populações, Egito, Tunísia, Grécia e Itália, calculamos as distâncias genéticas (F_{ST}) e observamos a separação entre países da Europa e África do Norte e também entre Grécia e Itália e entre Egito, Líbia e Tunísia. A análise do cromossomo Y com 10 marcadores para 130 indivíduos Líbios do sexo masculino mostrou 102 haplótipos entre Líbios Árabes ($n=85$) e Berberes ($n=45$), com diversidade haplotípica de 0,9827 e 0,9679, respectivamente. Destes haplótipos, 64% não foram descritos em outras populações mundiais. A partir da frequência de haplótipos com 7 marcadores, encontrados na literatura em 14 populações, calculamos F_{ST} entre as populações da África do Norte, Europa, Ásia e África Sub-Saariana. A maior distância genética foi entre Saharawi e Moçambicanos e a menor distância foi entre Argelianos e Líbios (Árabes e Berberes) e entre os Líbios Árabes e Líbios Berberes. Líbios Berberes e Líbios Árabes não são diferentes, sob a análise do cromossomo Y. Haplogrupos de DNA mitocondrial presentes em populações Europeias, Africanas e Asiáticas estão representados em ambas os grupos étnicos da Líbia: Árabe ($n=92$) e Berbere ($n=62$). A diversidade genética entre Líbios Árabes foi de 0,9145 e entre os Líbios Berberes, 0,9149. O cálculo de F_{ST} (0,002) entre as duas etnias sugere que não existe diferença entre elas. Com objetivo de compreender a expansão dos haplótipos de DNA mitocondrial no Norte da África, comparamos populações vizinhas e aquelas que tem participação na história da Líbia. As populações dos países da África do Norte foram agrupados e os

Berberes ficaram mais próximas da Europa enquanto que as populações Árabes voltadas para Egito, Iêmen e Arábia Saudita e o restante da África. Podemos sugerir que populações geograficamente próximas e com mesma linguagem (Norte da África) são geneticamente semelhantes, corroborando o fato de que estes marcadores podem ser utilizados na investigação da história recente de uma população.

ABSTRACT

Studies using molecular genetic markers have been carried out with samples of the worldwide populations with the objective to extend the knowledge of human migrations. Moreover, this knowledge supplies information that is applied into the human identification. Libya is one of the North Africa countries that took part in the human history since the dawn of modern man. The population of the current Libya is composed of distinct ethnic groups whose origins Arab and Berber are the majorities. In this work we have used DNA genetic markers such as STRs of autosomic chromosomes, Y chromosome and HVI and HVII regions of the mitochondrial DNA of a sample of Libyan population in order to get population genetic parameters. We have analyzed samples from 55 unrelated people, using 15 autosomic markers, which did not show significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium. We have generate the genetic distance (F_{ST}) based on data of eight markers available from four other populations, Egypt, Tunisia, Greece and Italy. We have observed the separation among countries of the Europe and North Africa and the separation between Greece and Italy; and among Egypt, Libya and Tunisia. We have also analyzed 10 STR markers of the Y chromosome, for 130 Libyan male individuals. We observed 102 different haplotypes being Libyan Arabs ($n=85$) and Berbers ($n=45$), with haplotypic diversity of 0.9827 and 0.9679, respectively. Sixty four percent of these haplotypes had not been described in other populations of the world. The frequency of haplotypes with seven markers, found in the literature for 14 populations from North Africa, Europe, Asia and Sub-Saharan – Africa were used to calculate F_{ST} . The largest genetic distance was found between Saharawi and Mozambicans. The shortest genetic distance was found between Algerian and Libyan Arabs and Libyan Berbers. These two ethnic samples (Arabs and Berbers) are not different, according to the analysis of the Y chromosome. Mitochondrial DNA haplogroups present in European populations, Africans and Asians are represented in the two ethnic groups of the Libyan population [Arab ($n=92$) and Berber ($n=62$)]. The genetic diversity of Libyans Arab was of 0.9145 and Libyans Berber, 0.9149. The calculation of F_{ST} (0.002) for the two ethnic groups suggests no difference between them. In order to understand the expansion of the haplotypes of mitochondrial DNA in North Africa, we compare neighbor populations and those that participated in the Libyan history. Countries of North Africa were

grouped and Berber populations were next to Europeans while populations of Arab content were similar to Egypt, Yemen and Saudi Arabia and the rest of Africa. We can suggest that the populations geographically related and those with the same language (North Africa) are genetically similar, corroborating the fact that these markers can be used in the inquiry of the recent history of a population.

1 Introdução

Uma das questões mais pertinentes do homem moderno é conhecer a história de sua dispersão pela Terra. Por tradição, este sempre foi assunto dos antropologistas. Atualmente, os geneticistas têm contribuído para o entendimento de nossa migração pelo mundo. No entanto, as evidências genéticas devem ser analisadas no contexto dos preceitos antropológicos, dos achados arqueológicos e condições do clima onde traços de civilização foram encontrados. Modelos de origem e dispersão do *Homo sapiens* têm sido propostos e combatidos. Um dos modelos de dispersão do Homem é chamado de multiregional (MR). Neste modelo o *Homo erectus* deixou a África se dispersando para regiões do Velho Mundo. Essas populações regionais então evoluíram lentamente até o homem moderno (GOLDSTEIN & CHIKHI, 2002).

No modelo mais atual, sugerido em 1980, os homens modernos surgiram na África entre 200 a 120 mil anos atrás e se espalharam ao redor do mundo, sem contudo ter adquirido muita contribuição genética das populações de homínídeos a quem se sobrepujaram. A este modelo foi dado o nome de “*Out of Africa*” ou “*Recent African Origin*” (RAO). Recentemente a diversidade genética observada nos cromossomos sexuais e autossômicos foi examinada fornecendo mais sustentação para validar o modelo de evolução demográfica humana (*Out of Africa*), previamente baseado em análises do DNA mitocondrial. A diversidade genética decresce progressivamente com a distância tendo como referência o leste da África, o que sugere que a diversidade foi perdida progressivamente em gargalos genéticos (*bottlenecks*), associados com a colonização de novos territórios por uma população fundadora de tamanho pequeno (CURRAT & EXCOFFIER, 2004). Trabalhos científicos utilizando marcadores de DNA

mitocondrial mostram que a população da África possui mais diversidade genética do que as populações não Africanas (CAVALLI-SFORZA et al., 1994; HARPENDING & ROGERS 2000; LIU et al., 2002). O modelo *Out of Africa* sugere que o homem moderno saiu da África pela Etiópia, passando pelo Mar Vermelho até o Iêmen. Outra possibilidade, sugerida por Forster e Matsumura, é de que o homem tenha seguido o caminho pelo Norte da África pelo Rio Nilo (FORSTER & MATSUMURA, 2005; PORTIN, 2007).

1.1 Situação geográfica da Líbia

A Líbia é um país localizado no Norte da África (Figura 1), possui uma área de 1.760.000 Km² e uma costa Mediterrânea de aproximadamente 1.800 Km. Situa-se em uma área com fácil acesso aos países da Europa e liga os países Árabes do Norte da África com o Oriente Médio. Além disso permite, atualmente, o trânsito comercial entre Europa e os países Africanos do Sub-Saara.



Figura 1: Mapa político atual do Norte da África e Europa Mediterrânea. Podemos observar os países de fronteira com a Líbia.

1.2 História da Líbia

Registros arqueológicos identificam a presença de atividade humana na Líbia desde o neolítico (HISCOCK, 1996). Os habitantes naturais da Líbia são membros das tribos nativas, chamadas de Berberes. Em torno de 1200 aC os Fenícios colonizaram a parte oeste da Líbia, chamada de Tripolitânia, e foi saqueada pela povo Cartagenês. Os Gregos colonizaram a parte leste, chamada de Cirenaica. A Líbia pertenceu ao Império Romano do século primeiro dC até seu declínio (146 aC a 436 dC) (METZ, 1987; VILLARD, 1956). Parte deste período a região foi saqueada por Vândalos. Em 642 dC a Líbia foi invadida por forças Árabes. No início do século XVI, as regiões designadas como Tripolitânia e Cirenaica tornaram-se parte do Império Otomano. Em 1911, a Itália invadiu e dominou oficialmente a Líbia até a Segunda Guerra Mundial, no entanto o contingente Italiano permaneceu no país até 1970. A Líbia alcançou a independência em 1952 com ajuda das Organização da Nações Unidas (ONU). Na Figura 2 vemos um diagrama desta história.

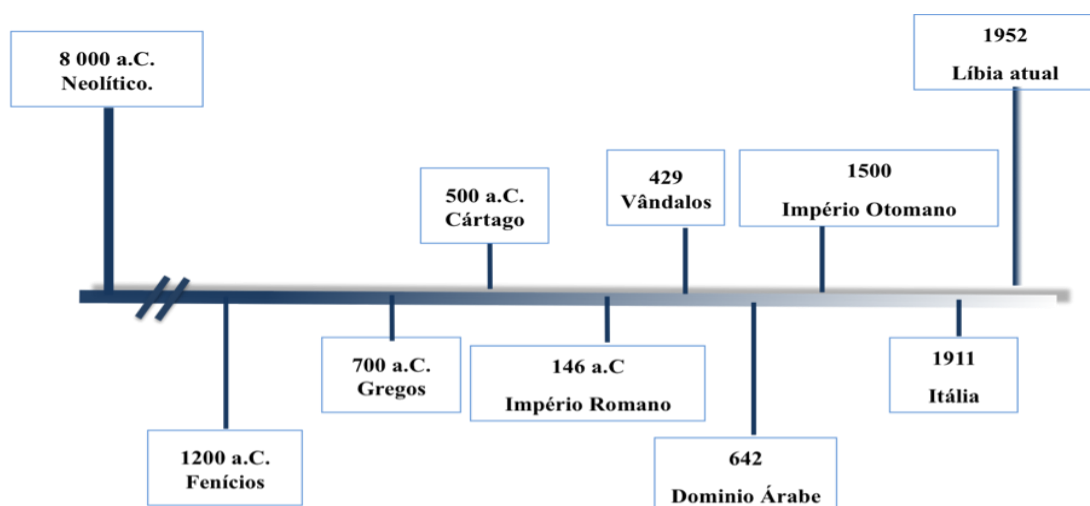


Figura 2. Diagrama da linha do tempo representando a história da Líbia. As indicações mostram os períodos de invasões e domínios de diferentes civilizações na região da Líbia.

1.3 Composição étnica da população da Líbia

A Líbia é um país de grande extensão no continente Norte Africano e no entanto é pouco povoado. O censo de 2006 mostrou uma população de 5.670.688 de habitantes, uma das menores do continente. A maioria dos habitantes (65 %) mora na região Tripolitânia onde fica a capital do país, Trípoli. Mais de 30 % dos habitantes moram na região Cirenaica. O restante dos habitantes (5 %) é distribuído em outras regiões da Líbia, principalmente na região do Fezzan. No mapa da Figura 3 são mostradas as três regiões da Líbia -Tripolitânia, Cirenaica e Fezzan- e as respectivas densidades populacionais.

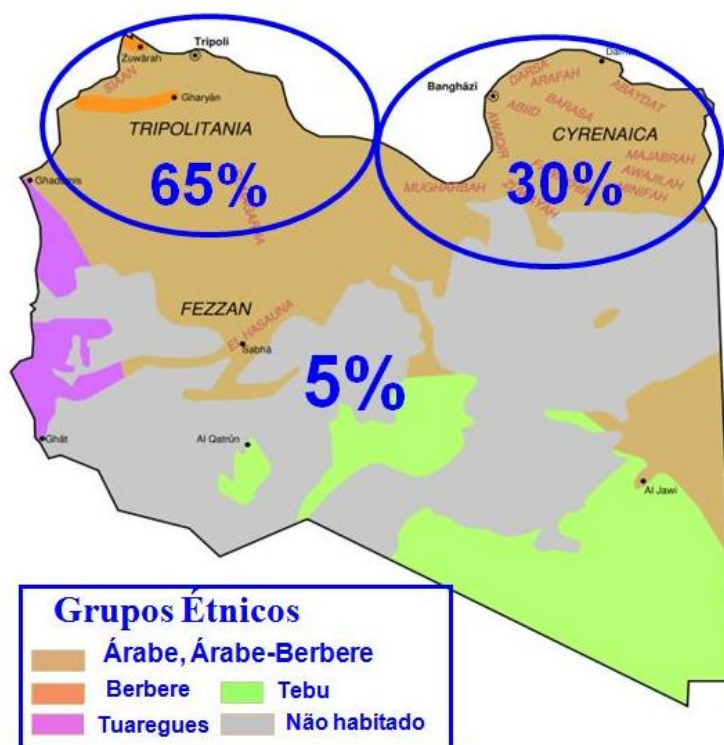


Figura 3. Distribuição Demográfica da População da Líbia e suas regiões; Tripolitânia, Cirenaica e Fezzan.

A identidade étnica e sua coesão são definidas pela linguagem e não pela organização social ou geografia. A população da Líbia atual é composta de vários grupos étnicos distintos. A identidade étnica e sua coesão são definidas pela linguagem e não pela organização social ou geografia. Os Árabes trouxeram sua língua e sua cultura para Líbia entre os séculos VII e XI, mas o casamento intercultural com os Berberes e outros povos locais, por séculos, produziu um povo miscigenado, de modo que poucos Líbios podem ser chamados de Árabes, ou predominantemente de ancestral Árabe (METZ, 1987; VILLARD, 1956).

1.3.1 Árabes

As sucessivas ondas de migração de Árabes que chegaram no início do século VII impuseram o Islamismo e o idioma Árabe junto com a dominação política. Mas na realidade, os Árabes misturaram-se com os Berberes pelo casamento na região de Tripolitânia. Os Árabes que não se misturaram permaneceram na região Cirenaica perto da fronteira com o Egito. A absorção genética e cultural dos Árabes pelos Berberes avançou mais na Líbia do que em outras regiões do Norte da África como em Marrocos e Argélia, possivelmente devido à posição geográfica da Líbia, onde permaneceram etnias minoritárias (METZ, 1987; VILLARD, 1956).

1.3.2 Berberes

Os Berberes, que chamam a si próprios *Imazighen*, ou seja, "homens livres", são um conjunto de povos do Norte de África que falam línguas Berberes, da família de línguas afro-asiáticas. Entre 750.000 e 1.000.000 indivíduos Berberes vivem na Líbia. Estima-se que existam entre 20 e 25 milhões de pessoas que falam estas

línguas, principalmente em Marrocos e Argélia (METZ, 1987; VILLARD, 1956). Atualmente existem mais de um milhão de Berberes em vários países Europeus.

1.3.3 Tuaregues

Os tuaregues são um grupo étnico da região do Saara que falam um dialeto da língua Berbere. Eles chamam a si próprios *Kel Tamasheq* ou *Kel Tamajaq* ("falantes de Tamasheq"), e também *Imuhagh*, ou *Imashaghen* ("os livres"). Estima-se que existam entre 0,1 a 3,5 milhões dos Tuaregues nos vários países que partilham o deserto de Saara e região Sub-Saara, e este grupo não ocupa uma país específica (METZ, 1987; VILLARD, 1956).

1.3.4 Tebu e Negros Africanos

A linguagem Tebu é um membro da família do Nilo-Saara. 2.500 indivíduos Tebus vivem no sul da Líbia, como parte de um grupo maior de 215.000 com distribuição no norte de Chade, Niger e Sudão. Outro grupo distinto menor de negros são os *harathin*, de origem obscura que aparentemente serviam a Tuaregues. Vivem há milênios no deserto do Saara (METZ, 1987; VILLARD, 1956).

2. Histórico dos Polimorfismos de DNA

As investigações do DNA presente em células humanas revelaram uma abundante quantidade de variações entre indivíduos normais, que são chamadas de polimorfismos. Existem diferentes tipos de polimorfismo de DNA, que podem ser classificados de acordo com a sua natureza molecular e sua localização no genoma. Quando uma variante é encontrada em mais de 1% dos cromossomos na população geral, seja o locus codificante ou não, constitui o que é conhecido como um polimorfismo genético (OTTO *et al.*, 1998; PENA & BORTOLINI, 2004).

O estudo da composição genética das diferentes populações humanas sempre ocupou uma posição de destaque na ciência. Nesse sentido foram, e ainda são utilizados, diversos tipos de marcadores genéticos polimórficos, como os grupos sanguíneos, como sistema ABO e Rh, imunoglobulinas, sistemas de histocompatibilidade (HLA- *Human leucocyte antigen*) e polimorfismos de DNA (VOGEL & MOTULSKY, 1997). As variações nos nucleotídeos do DNA devido à mutação, deleção, inserção e inversão, podem ser detectadas por diversas técnicas atuais de biologia molecular, tais como sequenciamento, reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), ou com a obtenção de fragmentos gerados por digestão com enzimas de restrição, polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (VOGEL & MOTULSKY, 1997).

2.1 Classificação de Polimorfismos de DNA

Podemos classificar os polimorfismos de DNA em dois grupos principais: os polimorfismos de sequência e os polimorfismos de tamanho de número de repetição.

2.1.1 Polimorfismo de sequência

Neste grupo se incluem o polimorfismo de nucleotídeo único - SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e as inserções e deleções de uma sequência – Indel (*insertion/deletion*). Estes, por apresentarem duas opções de alelos, são chamados de marcadores bialélicos.

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é uma substituição de base entre duas sequências homólogas de DNA. Os SNPs pressupõem a existência de dois alelos na população, sendo que podem ocorrer em pelo menos 1% da amostra. Os SNPs estão presentes em cromossomos autossômicos e não autossômicos, assim como no DNA mitocondrial. Estes polimorfismos podem estar em genes relacionados a doenças como câncer, hipertensão, transtorno bipolar, entre outras. A padronização de vários SNPs em uma cromátide é caracterizada como um haplótipo. A determinação de haplótipos em diferentes regiões do genoma humano pode trazer informação sobre sua origem, evolução e etnias (HURLES *et al.*, 2008).

Diversas inserções/deleções são descritas no genoma humano, sendo as mais conhecidas e abundantes as sequências de retroelementos pequenos dispersos os SINE (*Short Interspersed Nuclear Element*) ou polimorfismos de inserção de sequências Alu (23% do genoma). Esta fonte de variabilidade de inserções e deleções de pequenas sequências Alu (500-2000 pares de bases), são específicas de humanos (CARDOSO *et al.*, 2008). Essas sequências apresentam algumas características semelhantes aos SNPs, como baixa taxa de mutação. Algumas destes polimorfismos estão associados a doenças como, por exemplo, a hepatite C crônica causada pelo vírus da hepatite C (HCV).

2.1.2 Polimorfismo de tamanho de número de repetição

Estes polimorfismos são definidos por apresentarem padrões de sequências repetidas em tandem, e podem ser classificados, de acordo com a unidade de repetição, como microssatélites e minissatélite.

I. Microssatélites

Entre as diversas sequências repetidas em tandem presentes no genoma humano, algumas são do tipo simples, formadas por um ou poucos nucleotídeos. Tais repetições curtas em tandem, STR (*Short Tandem Repeat*), são denominadas de microssatélites. Os STRs são sequências repetidas de 1 a 8 nucleotídeos espalhadas pelo genoma de um indivíduo. Cada região genômica que contenha um determinado número de repetições de uma destas sequências constitui-se num locus genético, altamente variável entre indivíduos e multialélico, portanto altamente informativo (FOISSAC *et al.*, 2000).

II. Minissatélite

Os minissatélites ou locus de número variável de repetições em tandem (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) são regiões dispersas no genoma que contêm repetições de um núcleo comum de 8 a 15 pares de bases (JEFFREYS *et al.*, 1985). Podem ser analisados através de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLPs) ou por reação em cadeia da polimerase (PCR). Muitos dos minissatélites são altamente polimórficos, produzindo um grande número de fragmentos. Os minissatélites são marcadores genéticos que constituem impressões digitais de DNA, e conseqüentemente são específicos de um indivíduo (CAVALLI-SFORZA, 2003; CULLEN *et al.*, 2003; FOISSAC *et al.*, 1997).

2.2 Marcadores genéticos de cromossomos autossômicos

Polimorfismos mendelianos (autossômicos) no genoma humano são excelentes marcadores de indivíduos. Em organismos diplóides a ocorrência de recombinação embaralha os diferentes loci genéticos, juntamente com as mutações ocasionalmente adquiridas ao longo da evolução. A recombinação dos autossomos a cada geração é efêmera e impede que duas pessoas tenham o mesmo genoma. Portanto, cada um dos nossos cromossomos tem segmentos herdados de praticamente todos os nossos antepassados (KLINTSCHAR *et al.*, 1999). Se pudessemos sequenciar completamente o genoma de cada um de nós e se tivéssemos a capacidade de interpretar apropriadamente a informação, teríamos descortinado todos os nossos antepassados evolutivos. Na impossibilidade de fazer isto, fazemos uma amostragem de um grande número de regiões filogeograficamente relevantes do genoma para obter, pela comparação com bancos de dados e através de uma sofisticada análise estatística, uma estimativa da ancestralidade biogeográfica daquele genoma (SILVA & MOURA-NETO, 2004). Estas diferenças podem ser utilizadas para caracterização de populações e, de forma mais aplicada, em identificação humana e criminalística.

2.3 Marcadores genéticos do Cromossomo Y

O cromossomo Y tem um baixo número de genes. Os 57.772.954 Mpb do cromossomo Y codificam 89 genes de proteínas comparado com 868 genes nos 154.913.754 Mpb do cromossomo X (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). O cromossomo Y é enriquecido com muitos tipos diferentes de repetições, que incluem inserções do tipo SINE, retrovirais e duplicações segmentares. Altas taxas de mutação observadas no cromossomo Y resultam exclusivamente de sua passagem pela

meiose para geração de gametas. Portanto, este processo é mais mutagênico na linhagem paterna do que na linhagem germinal feminina. A análise de haplótipos de SNPs do cromossomo Y mostra correlação com o grupo étnico predominante e sub-estrutura da população (ZHIVOTOVSKY *et al.*, 2004). Assim um painel de SNPs de Y pode variar entre áreas geográficas.

Os marcadores de cromossomo Y podem ser aplicados a estudos das linhagens paternas. O cromossomo Y é transmitido de geração a geração, através da linhagem paterna sem alterações, a não ser pela ocorrência de novas mutações. Conseqüentemente, os marcadores do Y são marcadores de linhagem e não de indivíduos, o que permite sua utilização em estudos evolutivos para inferir a história das linhagens presentes atualmente entre os humanos (SANTOS *et al.*, 1999). A utilização de marcadores bialélicos de cromossomo Y tem auxiliado na investigação de linhagens em populações humanas. A variação de haplogrupos do cromossoma Y permite o estudo e análise de fluxo populacional associados a fatores culturais e geográficos (JOBILING & TYLER-SMITH, 2003; SCHAFFNER, 2004).

Os marcadores polimórficos de repetição, tais como STR, também são encontrados no cromossomo Y. O Banco de Dados *Y-STR Haplotype Reference Database* (www.yhrd.org) organizados por Pascali e colaboradores (1999) estabeleceu a utilização de um haplótipo mínimo para determinação da frequência de microssatélites do cromossomo Y (PASCALI *et al.*, 1999). Estes marcadores compreendem um conjunto de pelo menos 9 marcadores STRs de cromossomo Y.

2.4 Marcadores genéticos de DNA mitocondrial (mtDNA)

Comparado com a tipagem do DNA nuclear, o mtDNA apresenta vantagens como marcador. O mtDNA é transmitido exclusivamente por linhagem materna, para os filhos, sem recombinação (HUTCHISON *et al.*, 1974). Assim, a probabilidade de um parentesco materno pode ser calculada por comparação direta das sequências de DNA, o que permite portanto traçar linhagens maternas ancestrais. O mtDNA está presente em um alto número de cópias e pode ser útil em particular na investigação forense, quando o material biológico contiver pouco ou nenhum DNA nuclear (WILSON *et al.*, 1995). Isso permite, por exemplo, a análise de fios de cabelo, dentes, ossos antigos, tecidos putrefatos, entre outros.

O mtDNA humano, esquematizado na Figura 4, possui 16.569 pares de bases e contém 37 genes, dos quais 22 codificam RNAs transportadores, dois codificam RNAs ribossomais e 13 codificam proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons da fosforização oxidativa e produção de ATP (WALLACE, 1992).

O mtDNA possui ainda a região não-codificante ou região controle que é responsável pela regulação da replicação e transcrição de genes da molécula de DNA mitocondrial, também conhecida como alça-D (*D-loop*), devido a estruturas visíveis pelo microscópio eletrônico que são formadas durante a replicação (UPHOLT & DAWID, 1977). Regiões delimitadas na região controle são altamente polimórficas na população humana e são conhecidas como regiões hipervariáveis I, II e III (HVI, HVII e HVIII) (ISENBERG & MOORE, 1999).

A primeira sequência de nucleotídeos obtida do genoma mitocondrial foi determinada em 1981 (ANDERSON *et al.*, 1981). Posteriormente esta sequência foi revisada e atualmente é utilizada como referência para a designação de polimorfismos- sequência referência de Cambridge - rCRS (ANDREWS *et al.*, 1999). As duas fitas do mtDNA têm diferenças significativas em relação às suas composições: a fita ou cadeia pesada H (*Heavy*) é rica em guaninas e a cadeia leve L (*Light*) é rica em citosinas.

O DNA mitocondrial evolui cerca de cinco vezes mais rápido que o DNA nuclear (CANN & WILSON, 1983; GREENBERG *et al.*, 1983). Essa variação se deve, em primeiro lugar, ao fato da mitocôndria ser uma grande geradora de radicais livres, proporcionando um ambiente favorável a mutações no DNA. Outra causa seria a ausência de histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear (YAKES & VAN HOUTEN, 1997). Além disso, a enzima DNA polimerase mitocondrial possui baixa atividade corretora quando comparada à DNA polimerase nuclear (KUNKEL & LOEB, 1981) e a reparação do DNA dependente de excisão de nucleotídeos não está presente em mitocôndrias (CROTEAU *et al.*, 1999).

Também deve-se considerar a estrutura típica *D-loop*, onde há a formação momentânea de fita-simples, que pode influenciar o padrão de mutação pontual, já que a taxa de depurinação de DNA fita-simples é quatro vezes maior que do DNA fita-dupla (LINDAHL & NYBERG, 1972; REYES *et al.*, 1998).

2.4.1 Variação genética populacional do DNA mitocondrial

No estudo do mtDNA de amostras provenientes de várias populações, têm sido observado que os indivíduos geralmente se encaixam em haplogrupos, que podem ser

definidos como sequências de nucleotídeos específicas de cada região geográfica (RUIZ-PESINI *et al.*, 2004). Esses haplogrupos foram originalmente definidos no final das décadas de 80 e 90. Padrões iguais ou similares de amostras foram submetidas a uma série de digestões com enzimas de restrição, para agrupar as populações do mundo em tipos de mtDNA. Os haplogrupos têm sido correlacionados com polimorfismos de HVI/HVII, bem como variações no genoma mitocondrial inteiro. O genoma mitocondrial tem servido não só para esclarecer a origem de nossa espécie (CANN *et al.*, 1987), como também, em conjunto com outros marcadores genéticos, para seguir o rastro das migrações de populações humanas (CAVALLI-SFORZA, 2007).

Os grupos de humanos que originalmente saíram da África para ocupar outras regiões geográficas tiveram que se adaptar à mudança na disponibilidade calórica (alimentar) das novas regiões e a condições climáticas diferentes, acumulando mutações de uma maneira seqüencial nas linhagens de mtDNA (WALLACE, 2005; CAMPBELL & TISHKOF, 2008). Assim, as linhagens do mtDNA têm uma distribuição geográfica que corresponde a das populações humanas. Como mostrado na Figura 5A, a distribuição geográfica dos haplogrupos A, B, C, D, E, F, G, M e N estão tipicamente associados com Asiáticos enquanto a maioria dos nativos americanos é representada dentro dos haplogrupos A, B, C, D e X. Haplogrupos L0, L1, L2 e L3 são africanos e os haplogrupos H, I, J, K, T, U, V, W e X estão tipicamente associados com populações européias. Os haplogrupos L4, L5, L6 e L7 não estão representados no mapa. Na Figura 5B mostra a relação evolutiva dos haplogrupos de mtDNA.

A caracterização das linhagens mitocondriais permite entender a variação genética entre populações e a diversidade genética dentro das populações.

2.4.2 As linhagens mitocondriais da África

Cerca de 76% de todos os mtDNAs africanos da região Sub-Saariana caem dentro dos haplogrupos L0, L1 e L2 do macro-haplogrupo L. O haplogrupo L0 é considerado a linhagem mais antiga de mtDNA, existindo há no mínimo 150.000 anos. O haplogrupo L3 representa só uma pequena porcentagem dos mtDNAs africanos, mas parece ser o progenitor dos haplogrupos M e N, que apareceram no norte da África e expandiram-se pela Europa e Ásia quando os indivíduos portadores desses haplogrupos saíram da África para colonizar outros continentes. Sendo assim, o haplogrupo L3 é considerado a linhagem ancestral de metade de todos os mtDNAs europeus, Asiáticos e de nativo-americanos. No geral, os mtDNAs africanos apresentam uma grande heterogeneidade; sendo os mais antigos e com maior diversidade genética comparado com outros continentes (WALLACE *et al.*, 1999; INGMAN *et al.*, 2000). Os haplogrupos L4, L5 e L6 foram recentemente encontrados na Etiópia e/ou Iêmen (ABU-AMERO *et al.*, 2007; KNIGHT *et al.*, 2003).

2.4.3 As linhagens mitocondriais da Europa

A Europa se caracteriza por uma grande homogeneidade genética, já que cerca de 99% dos mtDNAs europeus podem ser encaixados dentro de nove haplogrupos (Figura 5), designados como H, I, J, K, T, U, V, W e X (TORRONI *et al.*, 1996) e são todos derivados do macro-haplogrupo N (MISHMAR *et al.*, 2003).

2.4.4 As linhagens mitocondriais da Ásia

Na Ásia, 77% de todos os mtDNAs derivam do macro-haplogrupo M. As linhagens mitocondriais asiáticas derivadas do macro-haplogrupo M são os

haplogrupos C, D, G e Z; e o restante dos mtDNAs derivam do macrohaplogrupo N, pertencendo aos haplogrupos A, B, F, Y (Figura 5B). Devido à grandeza do seu território e a complexidade de sua população, a Ásia apresenta grande diversidade de frequências haplogrupos (WALLACE *et al.*, 1999).

2.4.5 As linhagens mitocondriais das Américas

Nas populações de nativo-americanos, os cinco haplogrupos A, B, C, D e X englobam 100% da variação genética do mtDNA. Os haplogrupos A, C, D representam 58% das linhagens do norte da Sibéria e sua presença nas Américas seria consequência da travessia pelo estreito de Bering dos indivíduos portadores desses haplogrupos. O haplogrupo B está presente em toda a costa asiática do pacífico, mas praticamente ausente na Sibéria e pouco freqüente na América do Norte. O haplogrupo X está presente principalmente na América do Norte, contudo sua distribuição ainda não está bem estabelecida (FAGUNDES *et al.*, 2008; KEYEUX *et al.*, 2002).

2.5 Distância genética entre populações

Na comparação entre populações utilizando marcadores genéticos, são utilizados tratamentos estatísticos que devem resumir a quantidade de variação observada em determinados números. A diversidade genética humana atual contém informações sobre parâmetros populacionais do passado e de sua história de adaptação às constantes variações do ambiente. Algumas análises da variação genética contemporânea têm sido realizadas para traçar aspectos do passado dos seres humanos. Combinações de padrões moleculares devem ser utilizados para

validação das afirmações indicadas pelos resultados. Deste modo, podemos descrever a distribuição da diversidade genética atual entre as populações humanas ou ainda fazer inferências sobre como a diversidade moderna evoluiu. A maioria das populações humanas se reproduz de modo não randômico, portanto não é homogênea. Para cálculos de distribuição espacial da subpopulação são necessários valores que agreguem estimativas do número, tamanho, fluxo gênico e migração (NEI, 1972; CHAKRABORTY & RAO, 1991).

2.6 Estudos Genéticos da População da África do Norte

Com o interesse de mapear as distribuições e miscigenações da população do Norte da África, alguns estudos foram realizados e as origens das populações foram determinadas. Uma intensa pesquisa bibliográfica dos dados disponíveis de frequências alélicas de marcadores genéticos clássicos foi realizada em populações do Norte da África (BOSCH *et al.*, 1997). Os dados foram utilizados com o objetivo de reconstruir a história demográfica usando dois métodos complementares: análise do componente principal e distância filogenética. Em ambas análises a principal característica do perfil genético do Norte da África é da variação do padrão leste-oeste, indicando a diferenciação entre os grupos de população Berberes e Árabes do nordeste, e das populações da Líbia e Egito. Estas populações apresentam uma menor distância genética com as populações europeias, incluindo a Península Ibérica (BOSCH *et al.*, 1997).

Um estudo de análise da região HVI do mtDNA com Tunísios Berberes (FADHLAOUI-ZID *et al.*, 2004), mostrou que o haplogrupo U6 é comum no Norte da África, e quando comparado com outros haplogrupos da região sugere que a

expansão deste grupo de linhagem aconteceu em torno de 10.500 anos atrás, se expandindo a populações vizinhas. Os grupos mais isolados, Mauritâneos, Tuaregues e Berberes do sul da Argélia, foram os mais diferenciados, embora sem estrutura claramente definida entre os indivíduos de língua Árabe e Berbere. Os Árabes estariam mais próximos dos Egípcios e Líbios. Em contraste, a contribuição genética da população do sub-Saara parece ser pequena. Estudos de polimorfismos genéticos clássicos posicionam Egito e Líbia relacionados com os Europeus, enquanto que outros estudos com marcadores de STR autossômicos sugerem diferenças genéticas entre populações Européias e Egípcias (KLINTSCHAR *et al.*, 1999; RANDO *et al.*, 1998). Estudos com marcadores genéticos de DNA na população da Líbia são escassos e os resultados obtidos foram muito pouco discutidos (IMMEL *et al.*, 2006).

Este trabalho pretende, portanto, analisar a composição genética da população da Líbia usando marcadores moleculares e discutir possíveis diferenças entre seus grupos étnicos, assim como a relação entre a população da Líbia e as populações que tiveram papel na história da Líbia.

Com o objetivo de entender a composição da população Líbia através de marcadores genéticos e produzir parâmetros populacionais para emprego em banco de dados, coletamos material biológico de amostras desta região divididas em origem étnica Árabe e Berbere.

3. Objetivo Geral

No contexto da dispersão da população no Norte da África, temos como objetivo geral a análise de estrutura e organização genética da população da Líbia, através do estudo de marcadores moleculares autossômicos e de linhagens materna e paterna.

3.1 Objetivos Específicos:

- 1-** Em amostras de DNA coletadas da população Líbia de dois grupos de origem étnica, Árabe e Berbere, determinar:
 - Genótipos e distribuição de frequência alélica de marcadores autossômicos.
 - Genótipos e distribuição de haplótipos de loci de microssatélites no cromossomo Y.
 - Haplótipos e haplogrupos do DNA mitocondrial das regiões HVI e HVII.

- 2-** Análise de parâmetros genéticos e estatísticos dos marcadores genéticos da população Líbia de origem Árabe e Berbere.

- 3-** Comparação dos grupos étnicos da Líbia de origem Árabe e Berbere com outros grupos populacionais associados geograficamente ou culturalmente.

4. Material e Métodos

4.1 Lista de Tampões e Soluções

Tampão de lise de membrana (hemácias)	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 1mM EDTA pH 7.4
Tampão de lise de núcleo	10 mM Tris-HCl 400 mM NaCl 2,0mM EDTA pH 8,2
T.E.	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
T.B.E	89 mM Tris-borato 2 mM EDTA pH 8,0
Tampão de amostra (<i>loading buffer</i>)	Azul de bromofenol 0,025 % Xileno-cianol 0,025 % Glicerol 30 %
Tampão de amostra (<i>loading buffer</i>) desnaturante	Azul de bromofenol 0,025 % Xileno-cianol 0,025 % Formamida deionizada 98 % 10 mM EDTA pH8,0
Solução de revelação da Prata	Carbonato de Sódio 30 % Formaldeído 0,05 % Tiosulfato de Sódio 0,002 %
Solução de fixação e parada	Ácido acético 15 %
Solução de impregnação com Prata	Nitrato de prata 0,1 % Formaldeído 0,05 %

4.2 Coleta e procedência das amostras

As amostras de sangue foram coletadas nas cidades de Trípoli e Yfrin (vizinha a Trípoli ~100 Km) por 4 coletores independentes, totalizando 457 amostras de sangue de homens e mulheres. As pessoas foram identificadas através de um questionário e informadas a respeito dos objetivos deste estudo e dos procedimentos que seriam realizados. Assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido concordando assim em participar desta pesquisa (ANEXO V). Neste questionário constava a cidade natal e a de origem dos pais. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de vidro (Vacutainer[®]) com EDTA. Após a coleta, o material foi prontamente enviado ao Brasil ou mantido a - 20° C para posterior envio ao laboratório. O transporte foi realizado em duas remessas a temperatura ambiente. Em uma delas o material ficou mais de um mês no porto de Miami devido a um furacão (2005). Após a liberação pela ANVISA, o material foi encaminhado para o laboratório e prosseguimos com as etapas de extração do DNA, que por este motivo foram utilizadas diferentes técnicas.

Desta forma as amostras de sangue de pessoas não relacionadas foram selecionadas e agrupadas de acordo com a origem étnica: Árabe ou Berbere. Foram removidas desta seleção aquelas que não representavam grupos étnicos da Líbia ou estavam degradadas restando então 419 amostras. Na Tabela 1 estão indicadas as amostras disponíveis para o estudo.

Tabela 1. Amostras disponíveis para o estudo separadas por gênero e grupo étnico.

Coletores	Grupo étnico				
	Árabe		Berbere		Total
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	
A	16	35	7	11	69
R	32	59	4	11	106
L	71	70	25	28	194
LB	3	0	35	12	50
Sub-total	122	164	71	62	
Total	286		133		419

4.3 Extração do DNA genômico

O sangue foi processado para extração de DNA por três protocolos diferentes: extração não orgânica, extração orgânica e resina magnética, dependendo da condição da amostra.

4.3.1 Extração não orgânica

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos do sangue total (MILLER *et al.*, 1988). Brevemente, foram adicionados 10 mL de tampão de lise de hemácias a 5 mL de sangue, mantidos por 30 minutos sob agitação orbital constante. Concluído este tempo, o material foi submetido à centrifugação por 4 minutos a 1000 rpm em centrífuga clínica. O precipitado resultante foi lavado duas vezes com 5 mL do mesmo tampão de lise de hemácias para remoção dos debris celulares.

O precipitado celular foi ressuspensão em 1 mL de tampão de lise de núcleo, ao qual foram adicionados 100 μ L de SDS 10 % e 7,5 μ L de proteinase K 20 mg/mL com incubação a 37° C, por 16 horas, ou a 55° C, por 2 horas. As proteínas foram removidas com adição de 1 mL de solução de 6 M NaCl em agitação contínua por 30 segundos. Posteriormente a solução foi centrifugada durante 10 minutos, a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA precipitado adicionando-se dois volumes de etanol absoluto. O DNA foi colhido centrifugando-se o material por 5 minutos 3000 rpm, posteriormente ressuspensão em T.E. e incubado a 65° C, por 30 minutos, e mantido a 4° C.

A quantificação do DNA foi feita através de espectrofotometria (260 nm) e parte do estoque foi diluído a 50 ng/ μ L em água milli Q e mantido à -20° C.

4.3.2 Extração com solvente orgânico

A extração foi feita como descrito por Sambrook e colaboradores (SAMBROOK, *et al.*, 1989). Brevemente, foram adicionados 700 μ L sangue e 700 μ L de fenol clorofórmio (saturado em 0,1M Tris-HCl pH 8.0). O material foi agitado vigorosamente por um minuto e centrifugado por cinco minutos a 12.000 rpm à temperatura ambiente. A fase aquosa foi retirada e cuidadosamente transferida para outro microtubo (\pm 400 μ L). Foram adicionados 5 μ L de glicogênio (10 mg/mL) e a mistura agitada por um minuto. Igual volume de clorofórmio foi adicionado e a mistura foi agitada vigorosamente durante um minuto. A mistura foi centrifugada durante cinco minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa foi retirada para novo tubo e adicionada 50 μ L de NaCl 0,4M. Dois volumes de etanol foram adicionados e o tubo mantido à -20° C por no mínimo por 30 minutos. O material foi centrifugado por 10 minutos, a 12.000 rpm. O

sobrenadante foi removido por pipetagem ou por inversão do tubo, com cuidado para não perder o sedimento. O precipitado foi mantido a 37° C por 10 minutos. O DNA foi ressuspensão em 60 µL de água mili Q, incubado à 37° C, por 30 minutos, e guardado à -20° C.

4.3.3 Resina magnética e sistema automatizado

Isolamos DNA de 200 amostras de sangue por este sistema, que consiste em um instrumento pré-programado e cartuchos já preenchidos com os reagentes, processando até 16 amostras em cerca de trinta minutos, automaticamente em Robô Promega Maxwell™ 16 (Promega). As amostras (200 µL/sangue) foram adicionadas diretamente aos cartuchos e preparadas de acordo com indicações do fabricante.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Avaliação do DNA genômico e produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % ou 1,5 % em tampão TBE 1x (SAMBROOK, *et al.*, 1989). O gel foi submetido a uma corrente de 70-90V. O material contido no gel foi corado com brometo de etídeo (5 µg/µL) e fotografado sobre transiluminador de UV.

4.5 Análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de poli(acrilamida) desnaturante

Os diferentes alelos, obtidos pela amplificação das amostras de DNA, foram analisados através de eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) 6 % por 55 minutos e visualizados por impregnação com prata. O gel (7,5 mM de uréia, 5,7 % de acrilamida, 0,3% de bisacrilamida (38:2), tampão TBE 1x, 0,09 % de TEMED®

(N,N,N',N'tetrametiletenomediamino) e 1 % de persulfato de amônio foi preparado num volume final de 30 mL suficiente para o preenchimento de uma placa de 19,5 cm x 36 cm e 0,4 mm de espessura (SAMBROOK, *et al.*, 1989).

Os produtos de PCR foram desnaturados a uma temperatura de 90° C por 5 minutos em "*loading buffer*" e imediatamente transferidos para o gelo. A corrida eletroforética foi realizada a potência constante de 40W, voltagem de 1540V e amperagem de 35mA, o gel permanecia à temperatura de 50° C.

4.6 Revelação do DNA em gel de poliacrilamida através de impregnação com prata

Após a corrida de eletroforese, as placas foram separadas e o gel, devidamente aderido à placa de vidro, foi mergulhado numa solução de ácido acético 15% para fixação das amostras, numa bandeja sob agitação por 20 minutos no mínimo (ou até durante a noite) num agitador orbital de mesa.

O gel em seguida foi mergulhado em água destilada e mantido sob agitação por 2 minutos por 3 vezes, para retirar-se o ácido acético. A impregnação pela prata dava mergulhando a placa com o gel em 500 mL de uma solução 0,1 % de nitrato de prata e formaldeído 0,05 % e mantendo-se sob agitação por 20 minutos (SAMBROOK, *et al.*, 1989).

Antes da etapa de revelação, o excesso de prata foi retirado, lavando-se rapidamente a placa com água destilada (10 segundos). A revelação ocorreu com 250 mL de uma solução de revelação da prata. A visualização dos fragmentos foi possível entre 3 e 6 minutos. Os géis foram fixados com ácido acético 15 % por 10 minutos e fotografados.

4.7 Análise do STR autossômicos

O Kit *PowerPlex®16 System (Promega)* foi utilizado para realização de PCR. Este kit permite a amplificação de 16 STRs (Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 e vWA) e da amelogenina (Tabela 2), sendo essas regiões do DNA comumente utilizadas para identificação humana.

A reação de amplificação seguiu o protocolo do fabricante, bem como os ciclos de amplificação no termociclador AB9600 (*Applied Biosystems*).

4.8 Análise do Cromossomo Y

Os Kits *AmpFISTR® Y Filer™ (Applied Biosystems)* e *PowerPlex® Y (Promega)* foram utilizados para a tipagem das amostras. O kit da *Applied Biosystems* permite a amplificação de 16 STRs de Y (DYS19, DYS3898I, DYS3898II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a/b, DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, YGATA H4 e DYS635). O kit da Promega apresenta 11 marcadores (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385 a/b, DYS438, DYS439, DYS437) (Tabela 3).

A reação de amplificação seguiu o protocolo dos fabricantes, bem como os ciclos de amplificação no termociclador AB9600 (*Applied Biosystems*).

Tabela 2. Marcadores STR autossômicos utilizados no estudo: local no cromossomo, tipo de repetição e respectivo fluoróforo.

Comossomo	Marcador/lócus	Localização no cromossomo ^a	Número de repetições (alelos conhecidos) ^b	Repetição 5-3	Fluorocromos ^d
2	TPOX HUMTPOX, Human thyroid peroxidase gene	2 p23-2per	6-a 13	AATG	TMR
3	D3S1358	3p	12 a 19	TCTA	FL
4	FGA HUMFIBRA, Human fibrinogen alpha chain	4 q28	17 a 26, 26.2, 27-30, 30.2, 31.2, 32.2,33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2,48.2, 50.2, 51.2	TTTC	TMR
5	D5S818	5 q21-31	7 a 16	AGAT	JOE
5	CSF1P0 Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene	5 q33.3-34	6 a 15	AGAT	JOE
7	D7S820	7 q11.21-22	6 a 15	GATA	JOE
8	D8S1179	8q24.13	8 a 19	TCTA	TMR
11	TH01 Human tyrosine hydroxylase gene	11p15-5	4 a 9, 9.3, 10, 11, 13.3	AATG	FL
12	vWA Human von Willebrand factor gene Complex	12 p12-pter	11 a 24	TCTA	TMR
13	D13S317	13 q22-31	8 a 15	TATC	JOE
15	Penta E	15q26.2	5 a 24	AAAGA	FL
16	D16S539	16 q24-qter	5.8 a 15	GATA	JOE
18	D18S51	18 q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11-13, 13.2, 14, 14.2, 15-27	AGAA	FL
21	Penta D	21 q	2.2 a 17	AAAGA	JOE
21	D21S11	21 q11.2-q21	24, 24.2, 25-28, 28.2, 29, 29.2, 30,30.2,31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34,34.2, 35, 35.2, 36-38	TCTA	FL
X, Y	Amelogenina ^c HUMAMEL	X p22.1-22.3 X, Y	Não se aplica	-	TMR

^a Locais cromossomais dos marcadores presentes no kit Power Plex16, Promega. ^b Número de repetição (escada alélica) indica o tamanho em pares de bases dos produtos de PCR que são observados para os diferentes marcadores de STR de cromossomos autossomos. ^c O gene Amelogenina codifica uma proteína de baixo peso molecular encontrado no desenvolvimento do esmalte do dente e está presente em ambos os cromossomo X e Y é utilizado para a identificação de Gênero. Tem como alvo uma sequência que no cromossomo X possui uma deleção de 6 pares de bases no intron 1 comparado com o local no Y. ^d JOE 6- carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, FL, fluoresceína; TMR carboxi-tetrametil-rodamina.

Tabela 3. Marcadores de STR do cromossomo Y utilizados no estudo

Marcadores	Localização física a partir do telomero	Número de repetição	Repetição	GenBank	Fluorocromos ^a	
					Y-filer(1)	PPY(2)
YS19	10,12	10-19	[TAGA] ₃ tagg[TAGA] _n	AC017019	VIC [®]	JOE
DYS385a/b	19,19/19,23	7-28	GAAA	AC022486	VIC [®]	TMR
DYS389I	13,05	9-17	(TCTG) (TCTA)	AC004617	6-FAM [™]	FL
DYS389II	13,05	24-34	(TCTG) (TCTA)	AC004617	6-FAM [™]	FL
DYS390	15,71	17-28	(TCTA) (TCTG)	AC011289	6-FAM [™]	TMR
DYS391	12,54	6-14	TCTA	AC011302	NED [™]	FL
DYS392	20,97	6-17	TAT	AC011745	NED [™]	JOE
DYS393	3,7	9-17	AGAT	AC006152	NED [™]	TMR
DYS437		13-17	TCTA	AC002992	PET [®]	TMR
DYS438	13,38	6-14	TTTTTC	AC002531	PET [®]	TMR
DYS439	12,95	9-14	AGAT	AC002992	NED [™]	FL
GATA H4	-	8—13	[TAGA] _n N ₁₂ [GATC] ₂ aa [TAGA] ₄	AC011751	PET [®]	-
DYS456	-	13-18	AGAT	AC010106	6-FAM [™]	-
DYS458	-	13-20	GAAA	AC010902	VIC [®]	-
DYS448		20-26	AGAGAT	AC025227	PET [®]	-
DYS635		17-27	[TCTA] ₄ (TGTA) ₂ [TCTA] ₂ (TGTA) ₂ [TCTA] ₂ (TGTA) ₂ [TCTA] _n	AC004772	NED [™]	-

(1). *AmpFISTR[®] Yfiler[™]*, (2). *PowerPlex[®]Y*. Número de repetição (escada alelica) indica o tamanho em pares de bases dos produtos de PCR que são observados para os diferentes marcadores de STR do cromossomo Y.

^a TMR = Carboxi-tetrametil-rodamina, FL = Fluoresceína, JOE = 6-carboxi-4',5' - dicoloro-2',7' -dimetoxifluoresceína; NED[™]; 6-FAM[™](6-Carboxifluoresceína); PET[™];VIC[®]

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese capilar em analisador genético como descrito abaixo. O kit *PowerPlex Y* requer aparelho que faça a leitura de 4 fluorocromos e o *AmpFISTR® Yfiler™* requer aparelho que possa analisar 5 fluorocromos. Alternativamente, dois loci que falharam na amplificação com os kits foram analisados por amplificação específica utilizando oligonucleotídeos em reação monoplex, cujo produto foi visualizado em gel de acrilaminada corado com prata. Estes produtos de amplificação foram posteriormente sequenciados, para confirmação do número de repetições. Para este fim, foram utilizados os seguintes pares de iniciadores:

DYS19:

5'-CTACTGAGTTTCTGTTATAGT-3'; 5'-ATGGCCATGTAGTGAGGACA-3' e

DYS392:

5'-AAAAGCCAAGAAGGAAAACAAA-3'; 5'-AAACCTACCAATCCCATTTCCTT-3'.

4.9 Eletroforese dos produtos de PCR em analisador genético capilar

Os produtos de PCR obtidos (1 µL) foram adicionados a 9 µL da mistura de formamida (9 µL) e padrão de peso molecular fluorescente (1 µL) [LIZ500 (*Applied Biosystems*) ou ILS600 (*Promega*)] em placa de 96 poços, aquecidos a 95 °C por 3 minutos, resfriados em banho de gelo e carregados em aparelho analisador genético capilar, 3100 Avant ou 3130 XL (*Applied Biosystems*). As condições de eletroforese foram as recomendadas pelo fabricante. A eletroforese e a coleta de dados referente às amostras foram realizadas pelo programa *Data Collection* (*Applied Biosystems*). Os arquivos *.fsa (* = nome da amostra) gerados para cada amostra foram analisados no programa *Gene Mapper v3.2* (*Applied Biosystems*). A discriminação e nomeação dos

alelos foram feitas pela comparação das distâncias percorridas, medida pelo padrão de peso molecular interno em cada amostra, comparando-os com um padrão de alelos conhecidos (escada alélica).

4.10 Amplificação de mtDNA e sequenciamento

A amplificação de ambas as regiões hipervariáveis (HVI e HVII) foi executada de acordo com o protocolo descrito por BUDOWLE *et al.* (2003) com os seguintes pares de primers:

HVI:

A1 (L15997):- (5'- CAC CAT TAG CAC CCA AAG CTA AGA- 3') e

B1 (H16391):- (5'- GAG GAT GGT GGT CAA GGG ACC CCT- 3').

Que amplificam a região entre os nucleotídeos 16024 e 16365.

HVII:

C1 (L048):- (5'- CTC ACG GGA GCT CTC CAT GC- 3') e

D1 (H408):- (5'- CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A- 3').

Que amplificam a região entre os nucleotídeos 73 e 340.

A reação de PCR continha: tampão de PCR (1X); MgCl₂ (1,2 mM); dNTP (0,25 mM); BSA (0,16 µg); iniciadores (0,6 mM); *Taq* DNA polimerase (0,04 U) em um volume total de 25 µL. O programa de PCR era: 95° C por 1 minuto; 30 ciclos (95° C por 10 segundos; 60° C por 30 segundos; 72° C por 30 segundos); 15° C por 10 minutos. As reações de PCR foram feitas nos termocicladores *MJ Research PTC200* (*MJ Research*) e *Eppendorff Master Cycler Gradient* (*Eppendorff*). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose corados com brometo de etídio e preparados para a reação de sequenciamento, como descrito a seguir.

4.10.1 Reação de sequenciamento e análise de alinhamento

Os produtos de PCR das regiões HVI e HVII foram analisados em gel de agarose como descrito no item 4.4. De acordo com a intensidade do produto amplificado, 1 μ L de uma diluição 1:5 em água foi utilizado para a reação de sequenciamento de ambas as fitas da molécula de cada fragmento, usando os mesmos iniciadores (2 μ M final) da reação de PCR original e 4 μ l da mistura de sequenciamento do kit *Dye terminator* da GE (*Healthcare*).

Após a reação de PCR no termociclador *Eppendorf Master Cycler Gradient* (*Eppendorf*) em placa de 96 poços, o material foi precipitado com 3,25 M de acetato de amônia e 2,5 volumes de etanol absoluto. Então, o material foi centrifugado a 3.000-3.100 g, por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então descartado e ao precipitado foram adicionados 100 μ L de etanol 70%. O material neste momento foi então centrifugado a 3.000-3.100 g por 15 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O material foi ressuspenso em 10 μ l de tampão de corrida do kit *Dye terminator* da GE (*Healthcare*).

As condições de corrida foram aquelas descritas no protocolo do fabricante. Após a corrida eletroforética capilar no sequenciador *MEGABACE* (GE) os arquivos *.rsd (*nome da amostra) foram gerados pelo software *Sequence Analyser* (GE[®]), responsável pela produção do eletroferograma representativo da sequência de bases detectadas nas amostras. O eletroferograma foi visualizado pelo programa *Chromas Lite 2.0*, que também pode traduzir o eletroferograma em um arquivo *.txt (*nome da amostra) em formato FASTA (www.technelysium.com.au). O formato fasta é um formato de texto padrão utilizado para submissão de sequência a diversos programas

de bioinformática, como por exemplo, o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

O sequenciamento foi realizado nas duas fitas do DNA nos fragmentos dos produtos amplificados de cada região. As sequências obtidas de cada produto foram comparadas entre si e eventualmente foram corrigidos artefatos de sequenciamento. Após a obtenção das sequências das regiões HVI e HVII de cada indivíduo, estas foram comparadas com a sequência referência de Cambridge (rCRS) através de alinhamento no Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Figura 6). As diferenças tais como transição, transversão, inserção e deleção nas posições dos nucleotídeos foram anotadas gerando os haplótipos de DNA mitocondrial para cada indivíduo. Os haplótipos foram designados em haplogrupos de acordo com nomenclatura estabelecida (ALLARD *et al.* 2002; 2004; 2005).

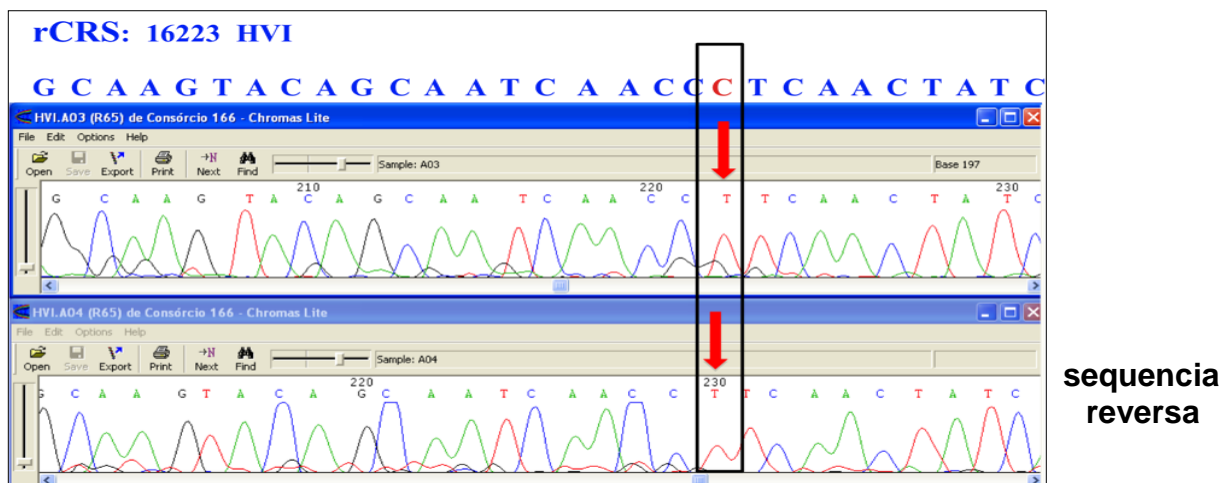


Figura 6. Comparação das sequências obtidas nas duas fitas de mesma amostra com a sequência referência de Cambridge (rCRS) para identificação de mutações de mtDNA. Eletroferograma de sequência de uma amostra para região *HVI* alinhada usando *Chromas Lite 2.0*. O eletroferograma superior mostra sequência obtida com o *primer forward* (A1) e o eletroferograma inferior, com *primer reverse* (B1).

4.11 Análise Estatística

Os dados obtidos foram processados por diversos pacotes estatísticos, descritos abaixo.

4.11.1 *Statistical Package for the Social Sciences v.14 (SPSS)*

O programa SPSS (SPSS Inc. 2005) foi usado para gerar o gráfico de escala multidimensional (MDS), a partir dos programas GDA, Dispan e Arlequin.

4.11.2 *Genetic Data Analysis (GDA)*

Em relação aos loci genéticos nos cromossomos autossômicos, o programa GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001) foi usado para calcular a frequência alélica, a heterozigosidade esperada (H_{esp}), observada (H_{obs}), o valor de p correspondente ao desvio de Hardy-Weinberg (STARK, 2005), para cada marcador. Em relação aos locais genéticos no cromossomo Y, o programa foi usado para calcular o valor de F_{ST} entre as populações estudadas. A partir da matriz de F_{ST} , o programa GDA gerou uma árvore filogenética, apresentada através do programa *TreeView* (www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html).

4.11.3 *Dispan (Genetic Distance and Phylogenetic Analysis)*

O programa Dispan (www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/Programs.html) foi usado para calcular as distâncias genéticas (F_{ST}), par-a-par, entre as populações estudadas. A matriz obtida foi usada para gerar uma árvore filogenética através o programa GDA. Esta mesma matriz foi usada para gerar um gráfico de escala multidimensional (MDS) com o programa SPSS.

4.11.4 Cálculo de diversidade haplotípica

A diversidade haplotípica (h) foi calculada pela seguinte equação:

$$h=1-\sum_i x_i^2$$

onde X_i é a frequência relativa dos i -ésimos haplótipos na amostra. (TORRONI *et al.*, 2001), ou de acordo com Nei e Tajima no pacote *Arlequin v 3.11* (NEI & TAJIMA, 1981).

4.11.5 *Arlequin 3.11*

O programa *Arlequin* (EXCOFFIER *et al.*, 2005) foi usado para calcular as distâncias genéticas (F_{ST}), usando as frequências dos haplogrupos, entre as populações estudadas. A matriz obtida foi usada para gerar uma árvore filogenética através do programa GDA.

4.11.6 *Median Joining Network* 4.5.1.0

O programa *Median Joining Network* (www.fluxus-engineering.com) foi usado para gerar um árvore em rede, usando as sequências do DNA mitocondrial, região HVI, das amostras da Líbia. O programa foi usado, também, com os haplótipos de STR do cromossomo Y.

5. Resultados

5.1 Marcadores de repetições em tandem (STR) em cromossomos autossômicos

Analisamos 55 amostras, de indivíduos não relacionados selecionados ao acaso, entre homens (31) e mulheres (24) nos loci D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, FGA, em reações de PCR multiplex conforme descrito em material e métodos (item 4.7). Todas as amostras foram concomitantemente tipadas com o gene da amelogenina situado no cromossomo X e Y. Deste modo foi confirmado o gênero dos indivíduos, como mostrado no eletroferograma (Figura 7) do produto de PCR com a amostra A16. Na Tabela 4 observamos os dados de genotipagem obtidos para os alelos nesta amostra da população da Líbia. Para estabelecer índices para cálculos populacionais desta amostra, utilizamos o programa DISPAN, (*Genetic Distance and Phylogenetic Analysis*), que computa os dados de frequência gênica, heterozigose e teste estatístico para desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Nesta tabela pode ser vistas as frequências alélicas dos 15 marcadores autossômicos, a heterozigose esperada e observada que revelam que estes marcadores são informativos para utilização forense e estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (STARK, 2005) para sua utilização em Bancos de Dados.

Esta análise inicial de 55 indivíduos em nosso trabalho sugere que as amostras foram selecionadas ao acaso não mostrando p ($p < 0,05$) significativo para desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg -HWE (0,0727; 0,2527; 0,2028; 0,0489; 0,0763; 0,0749; 0,7473; 0,8534; 0,0478; 0,0115; 0,6089; 0,3555; 0,1362; 0,5684; 0,0483), respectivamente com D3S1358; TH01; D21S11; D18S51; Penta E; D5S818; D13S317; D13S317; D7S820; D16S539; Penta D; vWA; D8S1179; TPOX; FGA, com exceção do

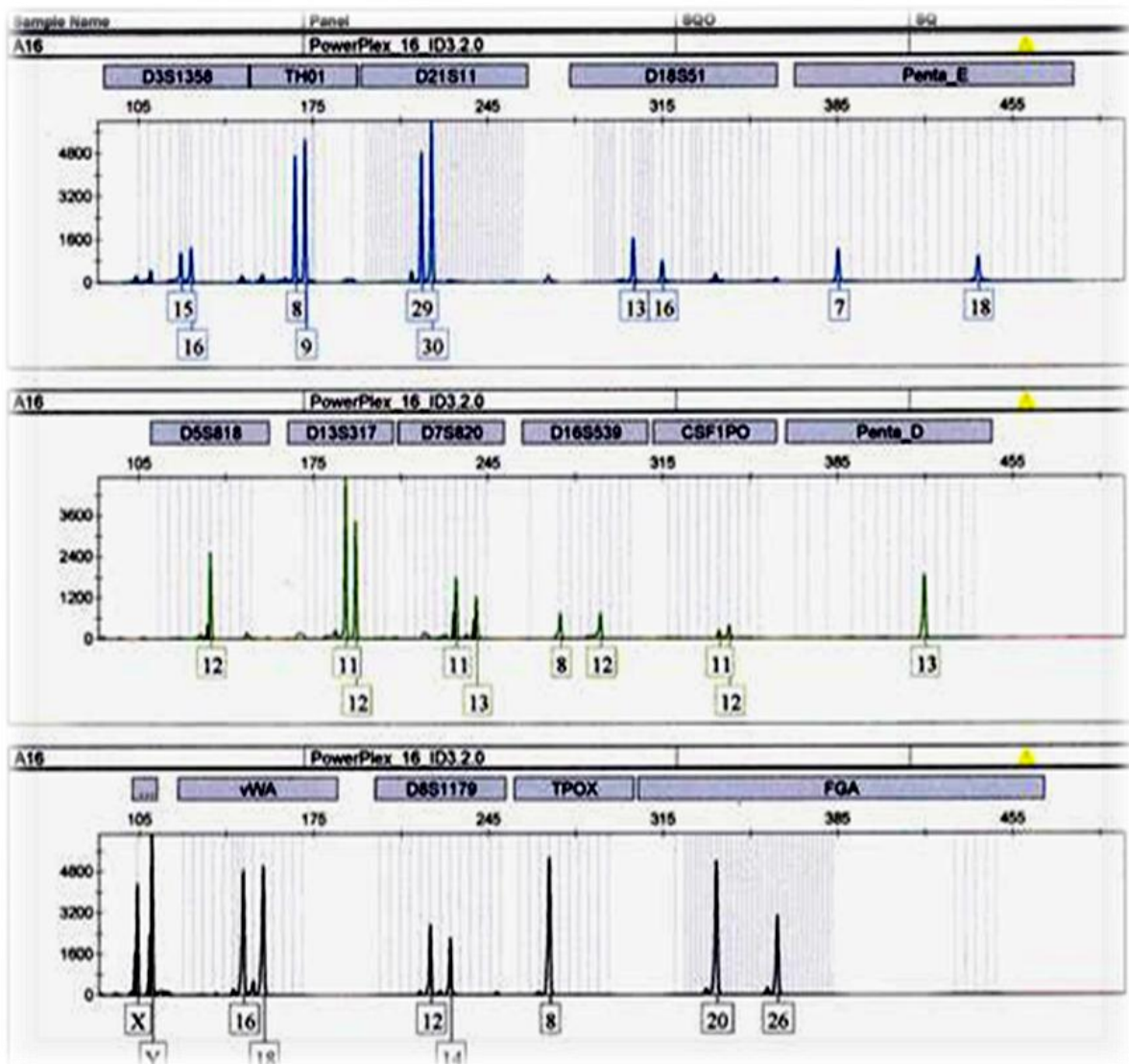


Figura 7. Eletroferograma do perfil de STR autossômicos de uma amostra (A16). Os produtos de PCR da reação multiplex com 15 marcadores mais amelogenina foram separados por eletroforese capilar em analisador genético AB3130. Os dados foram gerados pelo programa GeneMapper v3.2. Os picos de diferentes fluorocromos (Tabela 2 em materiais e métodos) indicam o tamanho do alelo em pares de bases (linha superior do eletroferograma) com o correspondente número de repetições designando o alelo (caixas com número). No último retângulo está indicada a determinação do gênero masculino da amostra (X,Y).

locus CSF1PO. Este locus apresentou um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,0115$) com a detecção de 18 homozigotos em 47 amostras (38,3%). Este fenômeno é conhecido como Efeito Wahlund (HARTL & CLARK, 1997), em que observamos um aumento desproporcional de homozigotos devido a (1) amostragem insuficiente, ou (2) sub-estruturação desta população. Como somente neste locus foi observado este efeito, acreditamos que ele possa ser atribuído a uma questão de amostragem. O fato de que alguns loci não foram amplificados em algumas amostras indica que existe polimorfismo nos sítios de ligação dos iniciadores presentes neste kit (BUTLER *et al.*, 2003).

Com o objetivo de observar se estes marcadores podem discriminar a relação entre as populações que fazem parte da história da colonização e dominação na Líbia (Itália e Grécia) e de povos vizinhos (Egito e Tunísia) comparamos dados disponíveis na literatura científica (CIUNA *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-DIZ *et al.*, 2008; OMRAN *et al.*, 2009; MAHFOUDH-LAHIANI *et al.*, 2006). No anexo I mostramos as frequências alélicas de oito marcadores nestas populações (D16S539, D18S51, D21S11, D3S1358, D8S1179, FGA, TH01 e vWA) cujos dados foram utilizados, no programa Dispan, para gerar a distância genética (F_{ST}) mostrada na Tabela 6. A partir destes dados e com o objetivo de avaliar a relação entre distância genética e regiões geográficas, construímos um gráfico de escala multidimensional-MDS (Figura 8A) e uma árvore filogenética (Figura 8B). Na Figura 8A visualizamos o gráfico MDS obtido pelo programa SPSS v14. Para gerar a árvore utilizamos o programa GDA (*Genetic Data Analysis*) com o algoritmo UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic mean*) seguido do programa *TreeView*. Observamos a separação entre países da Europa e África do Norte e também a separação entre Grécia e Itália; separação entre Egito e Líbia/Tunísia.

Tabela 4: Genotipagem de 55 amostras da população da Líbia com marcadores autossômicos (STR)

No.	Amostra	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
1-	A02-F	15/16	7/9	29/30	12/15	13/18	11/14	8/12	10/11	8/11	10/12	10/12	16/17	11/12	10/11	21/25
2-	A03-F	16/16	7/7	31/32.2	15/15	7/12	12/12	-	10/10	10/10	10/10	9/13	17/17	12/13	-	-
3-	A10-M	12/16	7/7	31/31.2	13/18	12/12	11/12	11/12	10/12	10/11	10/12	8/14	17/18	11/14	8/8	22/23
4-	A12-M	16/17	9/9.3	30/31	15/15	10/15	11/13	8/11	10/11	9/9	9/12	9/11	15/15	13/14	8/8	19/22
5-	A15-M	16/17	7/9	28/30	12/18	8/12	12/13	12/14	10/11	12/13	10/12	10/16	16/17	11/12	8/11	23/24
6-	A16-M	15/16	8/9	29/30	13/16	7/18	12/12	11/12	11/13	8/12	11/12	13/13	16/18	12/14	8/8	20/26
7-	A19-M	16/18	6/8	29/30	14/17	5/13	12/13	8/11	8/8	11/11	11/12	10/10	13/18	11/15	8/9	20/20
8-	A21-M	15/17	6/9	29/33.2	12/18	7/11	8/12	8/11	8/12	10/13	10/10	9/10	-	13/14	8/8	-
9-	A24-M	14/18	7/9	30/32.2	11 /12	17/19	12/12	10/12	9 /11	12/12	11/12	10/13	16/18	13/14	11/11	23/23
10-	A26-M	14/17	7/9	29/31.2	13/19	17/17	11/ 13	11/11	9/11	12/13	11/12	10/12	14/18	10/15	8 /9	23/24
11-	A27-M	15/19	7/9	29/32.2	14/15	11/12	12/12	8/11	10/11	11/13	10/11	9/13	15/16	10/15	8/8	21/21
12-	A29-F	15/16	6/9	28/31.2	13/13.2	11/14	10/11	8/ 9	10/11	11/12	11/12	9/9	15/16	14/14	8/11	22/22
13-	A30-M	16/17	6/7	33.2/36	17/18	5/9	11/12	12/12	11/11	11/12	11/11	12/12	16/18	13/14	8/8	20/22
14-	A32-F	16/17	7/8	30/31.2	12 / 13	18/19	8/13	10/13	10/10	11/13	11/13	14/14	14/16	11/15	-	-
15-	A33-M	16/17	7/7	29/32.2	17/17	12/12	12/12	10/12	10/11	9/10	12/13	9/14	17/18	13/14	8/12	21/21
16-	A34-F	15/16	6/9.3	30/31	11/15	11/15	11/13	11/14	10/13	11/12	11/12	11/12	15/18	14/16	9/11	23/23
17-	A35-F	16/17	8/9	30/31.2	16/16	12/13	11/12	11/12	10/10	9/11	11/11	12/15	17/19	14/15	8/11	23/24
18-	A39-M	15/17	8/9	31.2/35	15/16	13/18	11/12	7/11	11/11	12/15	11/11	9/10	16/17	14/14	8/11	20/21
19-	A41-M	16/17	7/9	28/30	16/19	13/17	12/13	10/11	9/11	12/13	10/10	10/13	15/16	-	8/8	23/23
20-	A42-M	15/15	8/8	28/34.2	15/17	5/11	12/12	11/12	9/9	11/12	8/8	12/13	16/16	12/15	8/8	22/26
21-	A45-M	15/17	6/9	30/32.2	16/17	10/12	9/12	8/12	8/10	11/14	11/11	11/13	14/15	15/15	8/8	21/24
22-	A47-F	16/18	7/8	30/32.2	13/15	7/18	10/11	11/14	8/9	11/11	11/12	9/11	16/18	11/14	10/11	22/24
23-	A48-F	15/16	7/9.3	30/31.2	12/15	10/11	11/12	12/12	8/12	10/12	11/12	9/11	16/18	13/13	8/9	22/23
24-	A49-F	16/17	6/9	30/31.2	9/13	11/12	10/13	8/11	9/11	11/11	10/11	10/14	15/18	11/11	8/11	23/24
25-	A50-M	15/16	6/7	27/28	14/14	-	10/10	-	12/12	-	12/12	-	16/16	-	8/11	21/22
26-	A51-F	15/18	7/9	28/28	12/15	10/12	12/12	11/13	7/10	9/12	11/11	10/10	14/15	11/15	11/11	19/23
27-	A52-M	15/18	8/9	28/30	15/16	12/13	12/12	12/13	8/10	9/9	10/10	13/13	15/15	13/15	8/9	20/23
28-	A53-F	15/17	6/9.3	30/32	13/17	5/12	13/13	8/13	9/10	10/12	11/12	10/11	15/18	13/15	8/10	21/25
29-	A54-F	16/17	6/7	29/29	16/16	11/14	11/12	9/12	9/10	12/13	11/12	9/10	16/17	14/15	8/11	21/23
30-	A55-F	16/16	8/9	30/33.2	15/17	7/12	9/12	7/12	-	9/11	10/12	10/12	15/17	-	8/11	19/21
31-	A58-F	17/17	6/6	29/32.2	14/17	12/17	12/13	11/12	8/14	12/12	10/12	9/15	17/18	13/14	8/8	23/23
32-	A66-F	15/18	9.3/9.3	31.2/31.2	12/14	7/10	11/12	12/13	11/11	11/12	10/11	9/14	16/16	13/15	9/11	20/30
33-	A71-F	15/19	9/9	29/30	16/16	7/12	11/13	11/12	9/10	9/11	11/12	9/11	17/19	13/15	8/11	21/22
34-	A73-F	17/18	6/9	30/32.2	15/16	13/16	10/13	8/11	9/11	11/11	11/11	13/13	17/19	13/14	9/11	21/24.2

No.	Amostra	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
35-	A76-F	15/16	6/6	29/31.2	12/18	12/12	8/11	8/12	8/11	11/11	11/11	12/14	14/15	12/12	8/9	22/22
36-	A79-F	15/16	9/10	31.2/32.2	12/14	11/13	12/13	13/14	10/10	11/13	11/11	10/13	17/20	14/14	9/10	23/23
37-	A80-F	16/16	8/9	31/31.2	12/14	7/7	11/12	8/8	8/9	10/10	-	10/12	18/18	14/16	8/11	21/25
38-	A82-F	16/17	8/10	29/32.2	15/15	11/13	12/12	11/11	11/11	11/11	11/11	10/11	17/18	13/13	8/8	22/23
39-	A200-F	16/16	7/9	30/31.2	13/13	8/12	11/12	11/11	10/12	9/9	-	11/13	16/16	12/14	8/8	20/24
40-	R01-M	16/16	9/9	29/31.2	16/16	11/11	12/12	11/12	11/12	-	-	13/14	16/19	11/15	-	19.2/20
41-	R06-M	16/16	7/9	32.2/32.2	15/22	17/17	11/13	12/12	10/10	11/13	10/11	12/13	17/18	13/15	9/11	21/21
42-	R13-M	16/17	8/9	29/32.2	12/15	11/13	10/11	11/12	10/11	11/12	11/12	9/10	14/16	11/11	9/11	22/23
43-	R18-M	15/17	6/9	29/33.2	13/13	5/15	11/12	12/12	10/10	13/13	10/10	14/17	-	-	-	21/25
44-	R67-M	14/14	6/6	29/29	14/14	13/13	11/11	12/13	-	-	-	-	15/17	13/14	8/8	22/23
45-	R70-M	15/16	6/9.3	32/32.2	12/17	17/17	11/11	11/11	10/11	11/11	-	12/13	15/16	13/15	8/11	22/22
46-	R81-M	14/17	7/8	28/28	14/18	5/5	12/13	11/11	10/12	-	-	2.2/12	16/18	12/14	8/9	19/24
47-	R92-M	15/17	6/9	29/33.2	12/17	7/11	8/11	12/12	11/12	11/12	12/13	11/13	14/16	14/15	8/8	21/25
48-	R99-M	16/19	6/7	27/33.2	19/19	7/7	12/12	11/12	8/10	9/9	11/12	2.2/8	17/18	15/15	8/8	22/23
49-	R106-M	15/17	8/9	29/33.2	-	-	12/13	7/12	9/10	-	-	-	15/16	14/14	10/11	20/20
50-	R107-M	16/16	-	28/31	18/19	12/13	12/12	8/11	10/12	12/12	10/11	11/13	-	12/12	8/8	22/24
51-	R117-M	16/17	6/7	29/30	14/14	13/15	12/12	11/12	9/12	11/12	11/12	11/17	14/15	14/15	8/11	20/24
52-	R118-M	16/17	7/9	28/30	12/12	-	-	8/11	8/8	-	-	9/9	17/19	12/14	8/9	20/24
53-	R119-F	16/17	7/10	28/30	13/18	5/12	8/11	11/12	10/12	11/12	10/11	11/11	16/17	13/14	8/9	22/24
54-	R120-M	14/18	6/6	29/29	14/15	13/13	11/11	12/13	12/12	-	11/11	9/9	15/17	13/14	8/8	22/23
55-	R121-F	15/17	6/7	31.2/32.2	13/17	8/17	10/10	11/12	9/10	12/12	11/11	9/14	14/14	11/14	8/10	22/23

Todas as amostras foram tipadas para o gene amelogenina situado nos cromossomos X e Y, de modo que foram conferidos os gêneros das amostras. Cada amostra foi identificada como F (gênero feminino) e M (gênero masculino). O símbolo (-) indica que não houve amplificação para o locus genético.

Tabela 5: Frequência alélica e parâmetros populacionais de 15 marcadores autossômicos (STR).

Alelo	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
2.2											0,0192				
5					0,0769										
6		0,2315													
7		0,2500			0,1154		0,0283	0,0094							
8		0,1389			0,0288	0,0463	0,1415	0,1226	0,0208	0,0213	0,0192			0,5588	
9		0,2870		0,0093	0,0096	0,0185	0,0189	0,1415	0,1354	0,0106	0,1923			0,1373	
9.3		0,0648													
10		0,0278			0,0481	0,0833	0,0377	0,3302	0,0938	0,2234	0,1827		0,0196	0,0588	
11				0,0185	0,1346	0,2593	0,3302	0,2358	0,3438	0,4574	0,1346		0,1275	0,2353	
12	0,0091			0,1481	0,2019	0,4259	0,3302	0,1321	0,2708	0,2553	0,1250		0,1176	0,0098	
13				0,1296	0,1538	0,1574	0,0755	0,0189	0,1146	0,0319	0,1827	0,0096	0,2059		
13.2				0,0093											
14	0,0545			0,1296	0,0192	0,0093	0,0377	0,0094	0,0104		0,0962	0,0962	0,3039		
15	0,2182			0,1852	0,0385				0,0104		0,0192	0,1827	0,2059		
16	0,3727			0,1296	0,0096						0,0096	0,2788	0,0196		
17	0,2455			0,1111	0,0962						0,0192	0,2019			
18	0,0727			0,0741	0,0481							0,1827			
19	0,0273			0,0463	0,0192							0,0481			0,0385
19.2															0,0096
20												0,0096			0,1250
21															0,1731
22				0,0093											0,2115
23															0,2404
24															0,1154
24.2															0,0096
25															0,0481
26															0,0192
27			0,0185												
28			0,1111												
29			0,2130												
30			0,2037												0,0096
31			0,0556												

Alelo	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	Penta E	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	CSF1PO	Penta D	vWA	D8S1179	TPOX	FGA
31.2			0,1481												
32			0,0185												
32.2			0,1389												
33.2			0,0648												
34.2			0,0093												
35			0,0093												
36			0,0093												
n	110	108	110	108	104	108	106	106	96	94	104	104	102	102	104
H _{esp}	0,7510	0,7845	0,8593	0,8809	0,8897	0,7238	0,7594	0,7898	0,7757	0,6813	0,8600	0,8108	0,7998	0,6160	0,8422
H _{obs}	0,8182	0,7963	0,8704	0,7222	0,7692	0,6481	0,7925	0,7170	0,6250	0,6170	0,7885	0,8269	0,7647	0,6275	0,7500
HWE	0,0727	0,2527	0,2028	0,0489	0,0763	0,0749	0,7473	0,8534	0,0478	0,0115	0,6089	0,3555	0,1362	0,5684	0,0483

n, número de cromossomos; H_{esp} heterozigose esperada; H_{obs}, heterozigose observada; HWE, valor de p para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 6. Distância genética (F_{ST}) entre Líbia, Egito, Tunísia, Grécia e Itália com 8 marcadores autossômicos (D16S539, D18S51, D21S11, D3S1358, D8S1179, FGA, TH01 e vWA).

	Líbia	Egito	Tunísia	Grécia	Itália
Líbia	0				
Egito ¹	0,0079	0			
Tunísia ²	0,0045	0,0142	0		
Grécia ³	0,0323	0,0338	0,0287	0	
Itália ⁴	0,0251	0,0225	0,0250	0,0071	0

As distâncias genéticas foram geradas a partir dos dados apresentados no ANEXO I utilizando o programa Dispan.

¹OMRAN *et al.*, 2009

²MAHFOUDH-LAHIANI, *et al.*, 2006

³SÁNCHEZ-DIZ *et al.*, 2008

⁴CIUNA *et al.*, 2006

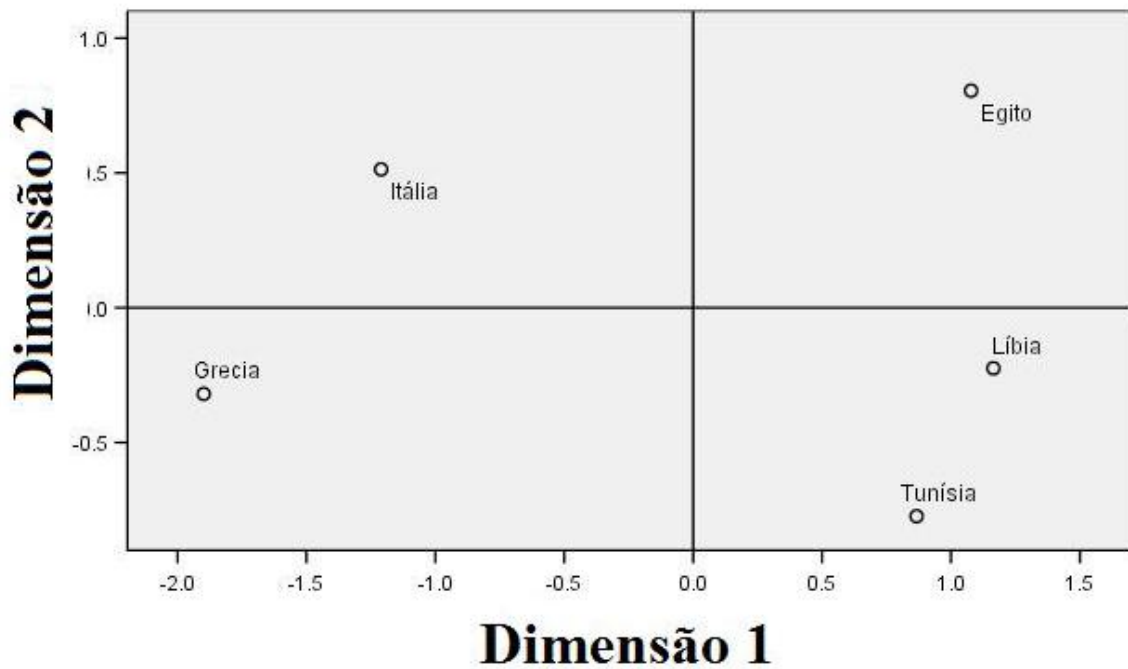


Figura 8A: Posicionamento da população da Líbia em relação a países da Europa e África do Norte. Gráfico em escala multidimensional. Na primeira dimensão observamos a separação entre países da Europa e África do Norte. Na segunda dimensão observamos a separação entre Grécia e Itália; separação entre Egito e Líbia/Tunísia.

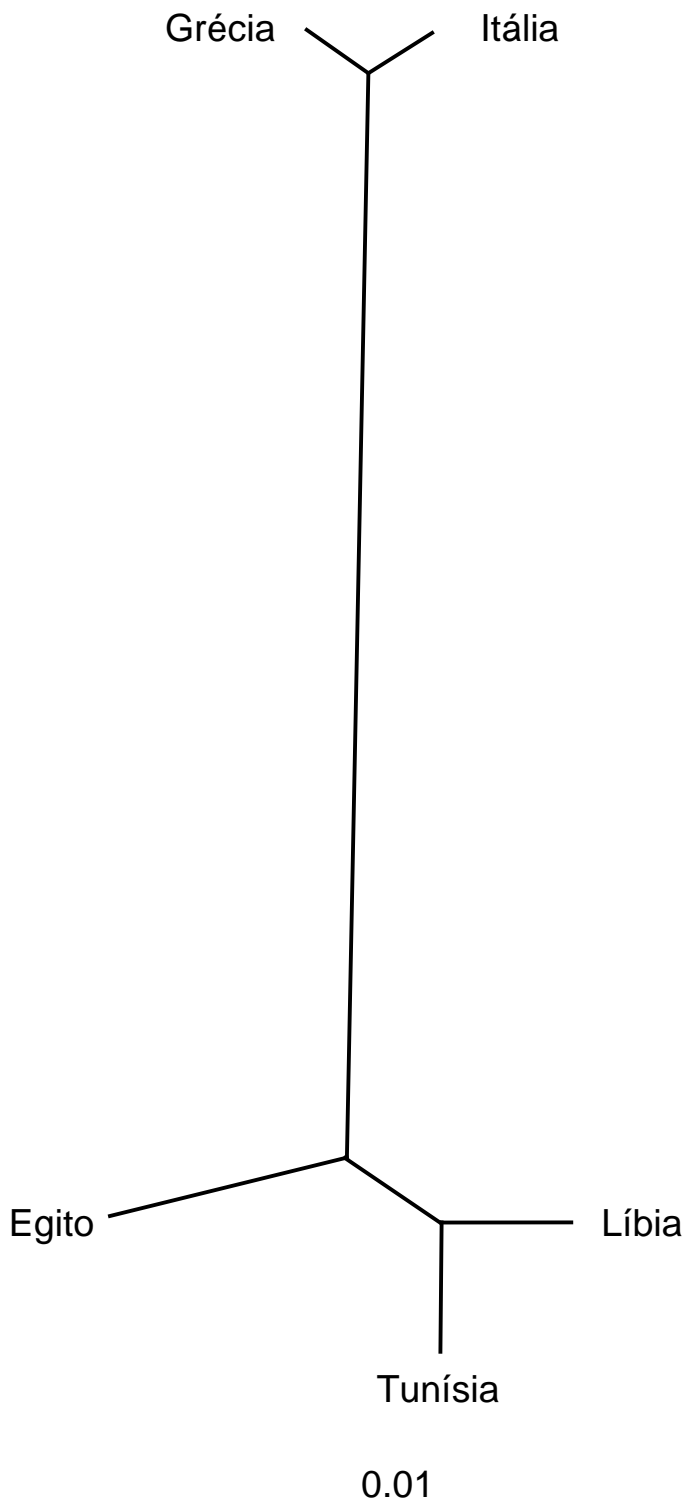


Figura 8B: Árvore filogenética das distâncias F_{ST} (marcadores autossômicos) entre populações de países da Europa e África do Norte. Dados obtidos através do programa GDA com algoritmo UPGMA e visualizados pelo *TreeView*.

5.2 Marcadores de STR do Cromossomo Y

Considerando a posição geográfica e a história da Líbia, a análise do cromossomo Y poderia acrescentar informações que esclarecessem o perfil da distribuição dos haplótipos atuais em relação ao período de crescimento de sua população. Além disso, os dados de haplótipos servirão para a formação de um banco de dados específicos da Líbia, visando o seu uso forense, tanto em casos criminais como em disputas cíveis.

As análises dos marcadores de STR do cromossomo Y foram realizadas a utilizando dois kits de amplificação de DNA comercialmente disponíveis. Os 16 marcadores (Tabela 3 em materiais e métodos) foram analisados em 130 indivíduos distribuídos em dois grupos étnicos: Árabes e Berberes. Na Figura 9 é mostrado o eletroferograma de uma análise da amostra R59 gerado pelo *software* de análise de fragmentos *Gene Mapper* v3.2. Este, em particular mostra a duplicação (15/16) no marcador do locus DYS19. Mais tarde esta duplicação foi confirmada pela análise da amostra de DNA do pai. No Anexo II e III podemos observar as tipagens de 130 indivíduos, em relação ao STR de cromossomo Y, utilizando os kits da *Applied Biosystems*, n=40 (A) e *Promega*, n=91 (B). Alguns loci em algumas amostras que falharam na amplificação multiplex com os kits, foram amplificados separadamente em PCR específicos, para estes loci os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida, corados com prata. Parte dos produtos de amplificação foi sequenciada para confirmação do número de repetições.

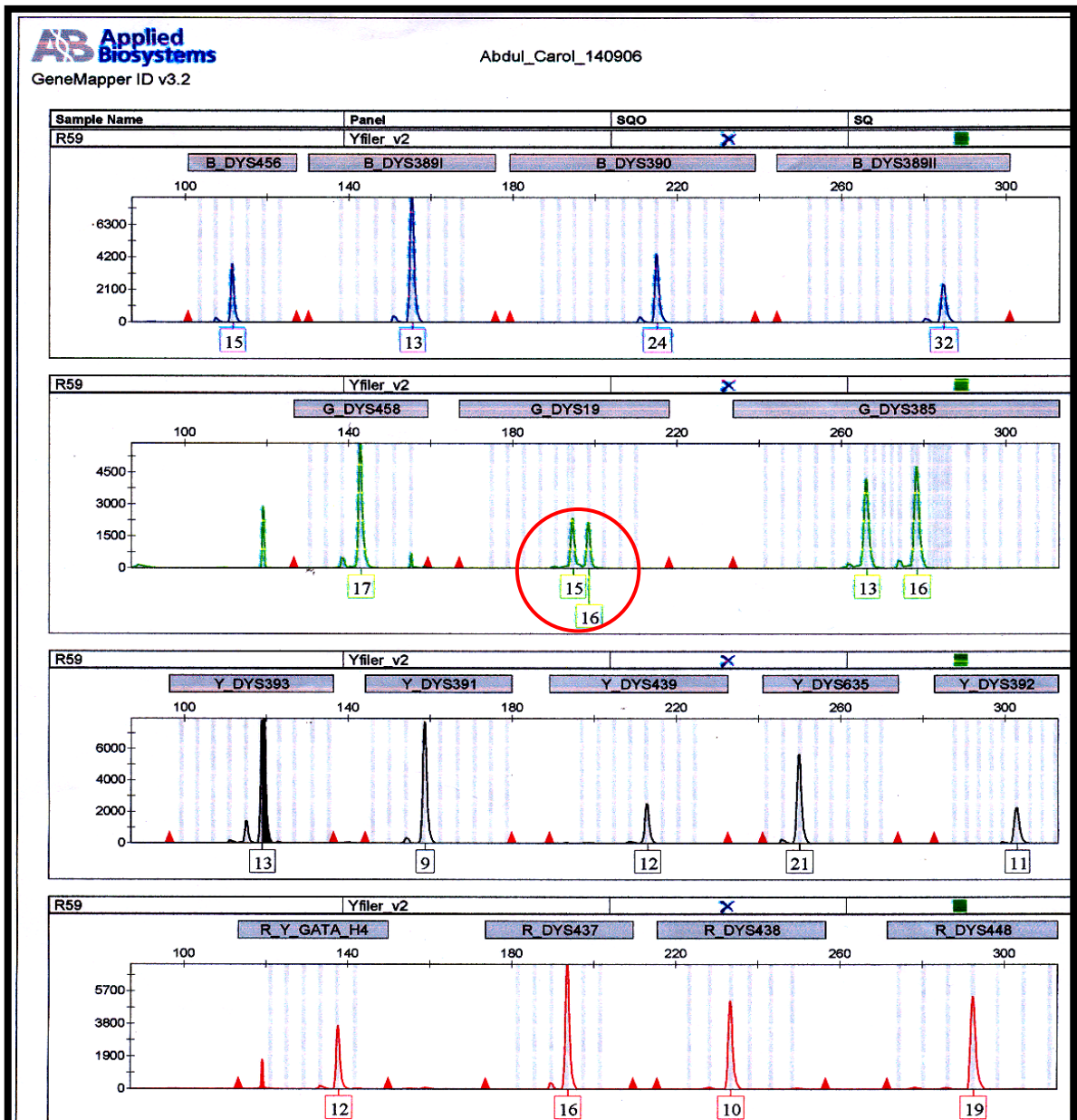


Figura 9. Eletroferograma de perfil de STR de cromossomo Y de um indivíduo (amostra R59). Os produtos de PCR da reação multiplex com 16 marcadores foram gerados com o kit *AmpFISTR Y Filer PCR Amplification* separados por eletroforese capilar em analisador genético AB3130. Os dados foram gerados pelo programa *GeneMapper v3.2*. Os picos de diferentes fluorocromos (tabela 3 em materiais e métodos) indicam o tamanho do alelo em pares de bases (linha superior do eletroferograma) com o correspondente número de repetições designando o alelo (caixas com número). O círculo indica duplicação (15/16) no locus do marcador DYS19.

Observamos na Figura 9 a presença de uma duplicação no locus DYS19 (15/16) na amostra R59 confirmada com material do pai. Outra duplicação foi observada no locus DYS439 (10/11) na amostra A40 (ANEXO II). Estas duplicações já foram observadas em outras populações, de acordo com o banco de dados *on line* Y-STR haplotype reference database - YHRD (www.yhrd.org). A duplicação DYS19 (15/16) foi observada, até esta data, em 34 de 68108 haplótipos de 524 populações (<0,05 %) estando presente na Europa, leste da Ásia, e entre Afro-Americanos, populações contendo misturas étnicas. A duplicação DYS439 (10/11) foi observada em 4 de 40591 haplótipos de 308 populações (<0,001 %) sendo encontrada na Europa e leste da Ásia.

Outras variações, como microvariantes, foram observadas em nossas amostras. A microvariante de DYS458 (alelo 18.2) foram observadas em 5 amostras (R13, R17, A21, A26 e A45) (ANEXO II). Este microvariante encontra-se presente em 126 de 13139 haplótipos (0,9 %) em 80 populações, até a dada, segundo o banco de dados Y-STR haplotype reference database - YHRD (www.yhrd.org). Em DYS385a/b encontramos 15.3, 16.3 e 17.3 em 3 haplótipos diferentes (15.3/15.3; 16.3/16.3; 16.3/17.3). Microvariantes com estes haplótipos ainda não foram relatados no banco de dados, com exceção do 15.3/15.3 encontrado em 2 de 66312 haplótipos (<0,003 %) em 490 populações (Sudeste da Europa e Sub-Saara). Até a presente data estes microvariantes foram relatados em outros haplótipos (14/16.3; 10/16.3; 12/16.3; 13/16.3; 12/15.3; 13/15.3; 14/15.3; 11/17.3; 13/17.3; 14/17.3; 15/17.3; 15.3/17.3) (www.yhrd.org).

5.2.1 Diversidade de haplótipos do cromossomo Y

A Tabela 7 mostra os haplótipos mínimos (contendo 10 marcadores STR) observados para 130 indivíduos Líbios do gênero masculino, compondo 102 haplótipos entre Líbios Árabes e Berberes. A diversidade haplotípica dos Líbios Árabes foi 0,9827 e dos Líbios Berberes de 0,9679, calculada usando o programa Arlequin.

Com o objetivo de investigar a possível distribuição em populações do mundo dos haplótipos (102) encontrados na Líbia, pesquisamos os haplótipos mínimos (10 STRs de cromossomo Y: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385, DYS438, DYS439) em Banco de Dados de Referência (www.yhrd.org) do cromossomo Y (*Y-STR haplotype reference database* - YHRD) quanto à sua frequência em outras populações. A Figura 10 mostra este resultado em percentual. Os perfis de STR do cromossomo Y mostram que 64% dos haplótipos encontrados na nossa população não são encontrados no Banco de Dado, sugerindo que são únicos da população da Líbia, e 26% dos haplótipos são encontrados em Banco de Dados de populações Africanas.

Com o objetivo de saber que tipo de relação existe entre as etnias Líbio Árabe e Líbio Berbere, utilizamos a frequência destes haplótipos para a construção de um gráfico que relaciona indivíduos com mesmos haplótipos em círculos, que são unidos a outros em forma de rede (programa *Median joining Network*). Deste modo podemos associar grupos de indivíduos com haplótipos mais próximos. Na Figura 11 observamos que os grupos Líbios Berberes e Líbios Árabes compartilham haplótipos mínimos do cromossomo Y, sugerindo que não é possível identificar haplótipos mais frequentes ou específicos de cada etnia.

Tabela 7. Haplogrupos de STR do Cromossomo Y entre os grupos étnicos majoritários da Líbia: Árabes e Berberes

Haplogrupo	Amostras	Haplótipo Mínimo*	Árabe	Berbere	Total
		DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385, DYS438, DYS439			
HG01	A10	13, 12, 28, 24, 10, 11, 13, 13/15, 10, 11	1		1
HG02	R16	13, 12, 29, 23, 10, 11, 13, 16/18, 10, 10		1	1
HG03	L216	13, 12, 29, 23, 10, 11, 13, 17/17, 10, 11	1		1
HG04	A22, L41	13, 12, 29, 23, 10, 11, 13, 17/18, 10, 10	2		2
HG05	L211	13, 12, 29, 23, 10, 11, 13, 17/18, 10, 11	1		1
HG06	L195	13, 12, 29, 24, 10, 11, 13, 17/19, 10, 10	1		1
HG07	R03	13, 12, 29, 24, 11, 11, 13, 18/19, 10, 10	1		1
HG08	A12	13, 12, 30, 24, 10, 11, 13, 17/19, 10, 10	1		1
HG09	A42	13, 12, 30, 25, 10, 11, 13, 17/19, 11, 10		1	1
HG10	L02	13, 13, 29, 23, 10, 11, 13, 16/16, 10, 14	1		1
HG11	LB05, LB26, LB32, R70	13, 13, 29, 24, 09, 11, 13, 13/14, 10, 10		4	4
HG12	A52, L177, R01, L14	13, 13, 29, 24, 09, 11, 13, 13/15, 10, 10	3	1	4
HG13	L122	13, 13, 29, 24, 09, 11, 13, 13/16, 10, 10	1		1
HG14	A39	13, 13, 29, 24, 09, 11, 13, 13/17, 10, 10	1		1
HG15	R12	13, 13, 29, 24, 12, 11, 13, 13/13, 10, 10	1		1
HG16	L145	13, 13, 30, 24, 11, 12, 13, 13/15, 10, 10		1	1
HG17	L03	13, 13, 31, 25, 10, 12, 13, 16/16, 10, 14	1		1
HG18	R65	13, 13, 32, 22, 09, 11, 13, 14/15, 10, 13	1		1
HG19	LB10	13, 13, 32, 25, 10, 12, 13, 15/15.3, 10, 13		1	1
HG20	L119	13, 14, 30, 23, 09, 11, 13, 13/14, 08, 10	1		1
HG21	L10	13, 14, 30, 23, 10, 11, 13, 12/12, 10, 11	1		1
HG22	L22	13, 14, 30, 23, 9/11, 11, 13, 12/15, 10, 11	1		1
HG23	R45	13, 14, 30, 24, 09, 10, 13, 13/15, 10, 10	1		1

HG24	A33	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 12/13, 10, 11		1	1
HG25	LB31, R20	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 12/15, 10, 10	2		2
HG26	L15	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 13/13, 10, 10	1		1
HG27	L181	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 13/14, 09, 10		1	1
HG28	L124, L37, L72, LB25	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 13/14, 10, 10	2	2	4
HG29	LB29	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 13/14, 10, 11		1	1
HG30	L34	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 13/15, 09, 13		1	1
HG31	A41, L06, L07, L141, L29	13, 14, 30, 24, 09, 11, 13, 13/15, 10, 10	3	2	5
HG32	L126	13, 14, 30, 24, 10, 10, 13, 13/15, 10, 10	1		1
HG33	R05	13, 14, 30, 24, 10, 11, 13, 13/14, 10, 10	1		1
HG34	LB22	13, 14, 30, 25, 09, 11, 07, 14/15, 10, 13		1	1
HG35	L136	13, 15, 29, 24, 09, 11, 13, 13/14, 10, 10		1	1
HG36	L38	14, 11, 27, 22, 10, 10, 14, 15/18, 10, 10	1		1
HG37	L19	14, 12, 28, 24, 10, 11, 13, 17/18, 10, 10		1	1
HG38	L52	14, 12, 28, 25, 11, 13, 13, 11/14, 11, 11		1	1
HG39	L157	14, 12, 29, 23, 10, 07, 13, 17/18, 10, 10		1	1
HG40	LB27	14, 12, 29, 23, 10, 11, 13, 16.3/17.3, 10, 10		1	1
HG41	A45	14, 12, 29, 24, 11, 11, 12, 13/20, 10, 11	1		1
HG42	L18	14, 12, 29, 25, 09, 12, 13, 17/18, 10, 13	1		1
HG43	R92	14, 13, 27, 22, 10, 10, 11, 17/17, 10, 11	1		1
HG44	R68	14, 13, 27, 25, 12, 11, 12, 13/13, 11, 11	1		1
HG45	A44, LB07	14, 13, 29, 22, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11		2	2
HG46	L117	14, 13, 29, 22, 11, 12, 12, 13/19, 10, 11	1		1
HG47	L186	14, 13, 29, 23, 10, 10, 12, 14/19, 09, 11	1		1
HG48	L04	14, 13, 29, 25, 11, 13, 12, 11/14, 12, 12	1		1
HG49	L40, L160	14, 13, 30, 22, 10, 11, 12, 13/19, 10, 11	1	1	2
HG50	R13	14, 13, 30, 22, 11, 11, 08, 13/20, 10, 11		1	1
HG51	LB18	14, 13, 30, 22, 11, 11, 11, 13/13, 10, 11		1	1
HG52	L21	14, 13, 30, 22, 11, 11, 12, 13/18, 10, 11	1		1
HG53	L81, LB28	14, 13, 30, 22, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11	1	1	2
HG54	L134, L164, LB06, R17	14, 13, 30, 22, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11	2	2	4

HG55	LB11	14, 13, 30, 22, 12, 11, 08, 12/12, 10, 11		1	1
HG56	L89	14, 13, 30, 23, 10, 11, 12, 12/18, 10, 12	1		1
HG57	L23	14, 13, 30, 23, 10, 11, 12, 14/21, 10, 11	1		1
HG58	L12, L132, L178	14, 13, 30, 23, 11, 11, 11, 13/20, 10, 11	3		3
HG59	A26, L178, LB24, R46	14, 13, 30, 23, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11	4		4
HG60	L212	14, 13, 30, 23, 11, 11, 12, 13/19, 10, 14	1		1
HG61	L165	14, 13, 30, 24, 09, 11, 13, 13/15, 10, 10	1		1
HG62	L171	14, 13, 30, 24, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11	1		1
HG63	A16, L19	14, 13, 30, 25, 09, 12, 13, 17/18, 10, 12	2		2
HG64	L83	14, 13, 31, 22, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11	1		1
HG65	L168	14, 13, 31, 22, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11	1		1
HG66	L78	14, 13, 31, 22, 11, 11, 12, 14/14, 10, 11		1	1
HG67	LB23	14, 13, 31, 25, 10, 11, 13, 15.3/19, 10, 11		1	1
HG68	A21	14, 14, 31, 22, 11, 11, 12, 13/19, 10, 11	1		1
HG69	LB01	14, 14, 31, 24, 10, 13, 13, 11/14, 12, 13		1	1
HG70	L39	15, 12, 28, --, 09, --, 12, 14/14, 09, 11	1		1
HG71	R67	15, 12, 29, 21, 09, 11, 12, 12/12, 10, 11	1		1
HG72	A24	15, 12, 29, 22, 11, 11, 14, 12/16, 10, 11		1	1
HG73	L55	15, 12, 29, 23, 10, 11, 13, 17/18, 10, 10		1	1
HG74	L01, L198	15, 12, 29, 23, 10, 11, 13, 17/18, 10, 10	1	1	1
HG75	R06	15, 12, 29, 25, 10, 11, 12, 14/15, 09, 10	1		1
HG76	L196	15, 12, 29, 25, 10, 11, 12, 14/15, 09, 10	1		1
HG77	L28	15, 12, 30, 23, 10, 11, 14, 13/14, 10, 12		1	1
HG78	A27	15, 12, 30, 23, 10, 11, 14, 13/15, 10, 11	1		1
HG79	R69	15, 12, 30, 25, 09, 11, 14, 11/16, 11, 11	1		1
HG80	LB08	15, 13, 25, 23, 11, 12, 16, 09/11, 12, 11		1	1
HG81	R15	15, 13, 29, 24, 11, 13, 13, 13/13, 12, 13	1		1
HG82	A15	15, 13, 29, 24, 11, 13, 13, 13/15, 12, 13	1		1
HG83	A40	15, 13, 29, 24, 9, 11, 12, 13/17, 10, 10/11	1		1
HG84	L156	15, 13, 30, 21, 10, 11, 13, 15/17, 11, 12	1		1
HG85	L140	15, 13, 30, 23, 10, 11, 15, 15/17, 11, 10	1		1

HG86	R75	15, 13, 30, 24, 10, 11, 13, 17/19, 10, 12	1		1
HG87	R89	15, 13, 31, 24, 10, 11, 13, 10/11, 10, 11	1		1
HG88	A30	15, 13, 31, 24, 10, 11, 13, 11/11, 10, 11	1		1
HG89	LB30	15, 14, 30, 21, 10, 11, 12, 11/12, 10, 11	1		1
HG90	A17	15, 14, 30, 23, 10, 10, 14, 14/20, 11, 12	1		1
HG91	R99	15, 14, 30, 24, 11, 13, 13, 13/14, 10, 14	1		1
HG92	LB03	15, 14, 31, 21, 10, 11, 13, 14/17, 11, 12		1	1
HG93	R81	15, 14, 31, 23, 10, 11, 13, 11/11, 10, 11	1		1
HG94	R59	15/16, 13, 32, 24, 09, 11, 13, 13/16, 10, 12	1		1
HG95	LB14	16, 12, 28, 21, 10, 11, 14, 13/15, 10, 11		1	1
HG96	LB02	16, 12, 29, 21, 10, 11, 14, 12/12, 10, 11		1	1
HG97	L131	16, 12, 29, 25, 10, 08, 12, 14/15, 09, 10	1		1
HG98	R95	16, 12, 30, 21, 10, 11, 13, 14/18, 11, 12	1		1
HG99	L128	16, 13, 30, 21, 10, 11, 14, 16/18, 10, 11	1		1
HG100	L54	16, 14, 30, 23, 11, 13, 13, 13/13, 13, 12		1	1
HG101	LB09	16, 14, 30, 24, 11, 12, 14, 13/13, 11, 13		1	1
HG102	R48	17, 13, 30, 21, 10, 11, 13, 17/18, 11, 13	1		1
Total			85	45	130

* Quando da utilização de marcadores uniparentais de cromossomo Y para os propósitos citados no item anterior, devem ser seguidas as seguintes normas: recomenda-se a utilização de pelo menos o haplotipo estendido (DYS19, DYS385a,b; DYS389I/II; DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438 e DYS439) proposto pelo SWGDAM (2004) e amplamente utilizado em *Y Chromosome Haplotype Reference Database* www.yhrd.org;

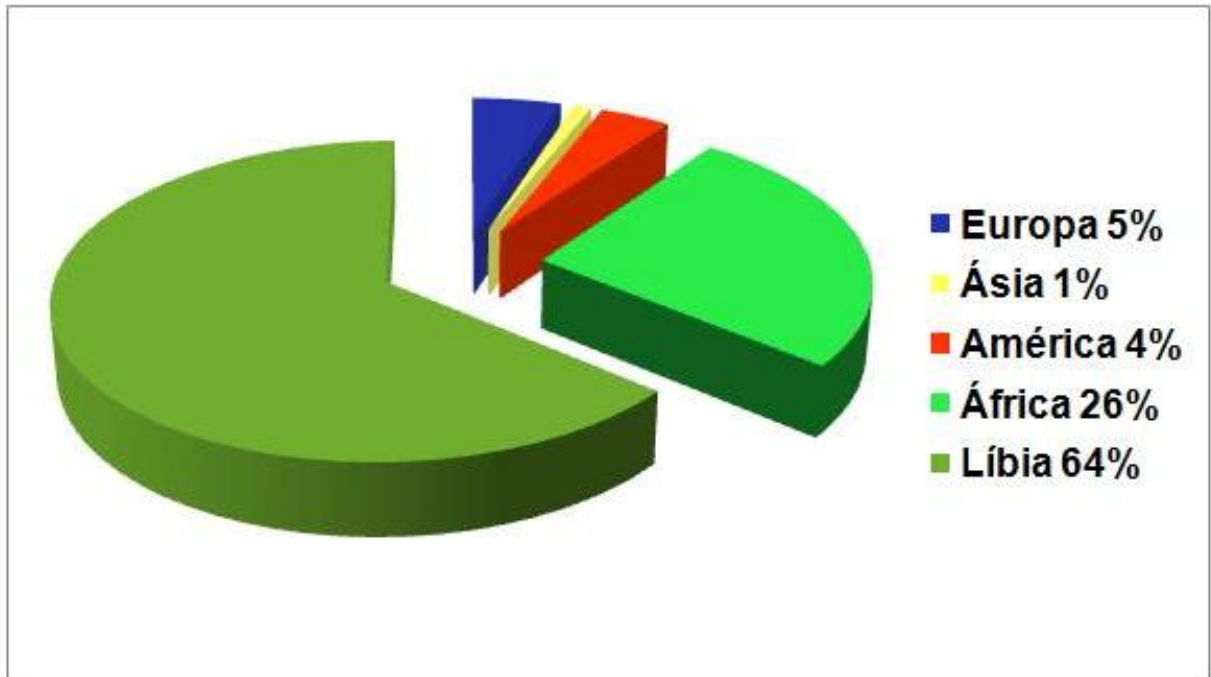


Figura 10: Distribuição percentual em populações do mundo dos haplótipos (haplótipo mínimo- 10 marcadores) de cromossomo Y encontrados na população da Líbia. Busca no Banco de Dados Referencia de Haplótipos de STR de Y- (*Y-STR haplotype reference database – YHRD-* www.yhrd.org). 64% dos haplótipos encontrados na população da Líbia representam os Haplótipos que não foram encontrados no Banco de Dado.

Uma segunda questão que poderíamos responder seria qual a relação filogenética entre a população da Líbia e as populações que possivelmente formaram o que hoje encontramos na Líbia: Líbios Árabes (LAR) e Líbios Berberes (LBR). Entre elas temos as populações da África do Norte: Argélia (ARG), Marrocos (MAR), Marrocos Berberes do Sudeste (SUB), Saharawi (SAH), Mozabite (MZB) e Egito (EGT). O país da Ásia investigado foi o Iêmen (IEM). Da Europa, comparamos com a Espanha (ESP), Itália (ITA) e Turquia (TUR). Da África Sub-Saariana analisamos a África Central (AFR) e Moçambique (MZC). Como último grupo populacional analisado, incluímos dados gerados por um grupo da Alemanha, Immel e cols., da população da Líbia parcialmente caracterizada, pois não distingue Árabes de Berberes (IMMEL, *et al.*, 2006).

Para calcularmos a distância genética entre estas populações, utilizamos dados da frequência de haplótipos com 7 marcadores, encontrados na literatura científica em 14 populações. Estes dados foram utilizados para o cálculo de F_{ST} no programa GDA por UPGMA, vistos na Tabela 8. Podemos observar que entre as populações representadas AFR, África Central; ARG, Argélia; EGT, Egito; ITA, Itália; LAR, Líbios Árabes; LBR, Líbios Berberes; Líbios LIB (IMMEL, *et al.*, 2006); MAR, Marrocos; MOZ, Mozabite; SAH, Saharawi; SUB, Berberes do Sudeste; ESP, Espanha; TUR, Turquia; MZC, Moçambique; IEM, Iêmen, TUN, Tunísia; a maior distância genética (0,3997) está entre Saharawi (SAH) e Moçambique (MZC). A distância menor encontra-se entre Moçambique (MZC) e África Central (AFR) (0,0141); Argélia (ARG) e Líbios Berbers (LBR) (0,0057); Líbios Berberes (LBR) e Líbios (LIB) (0,000).

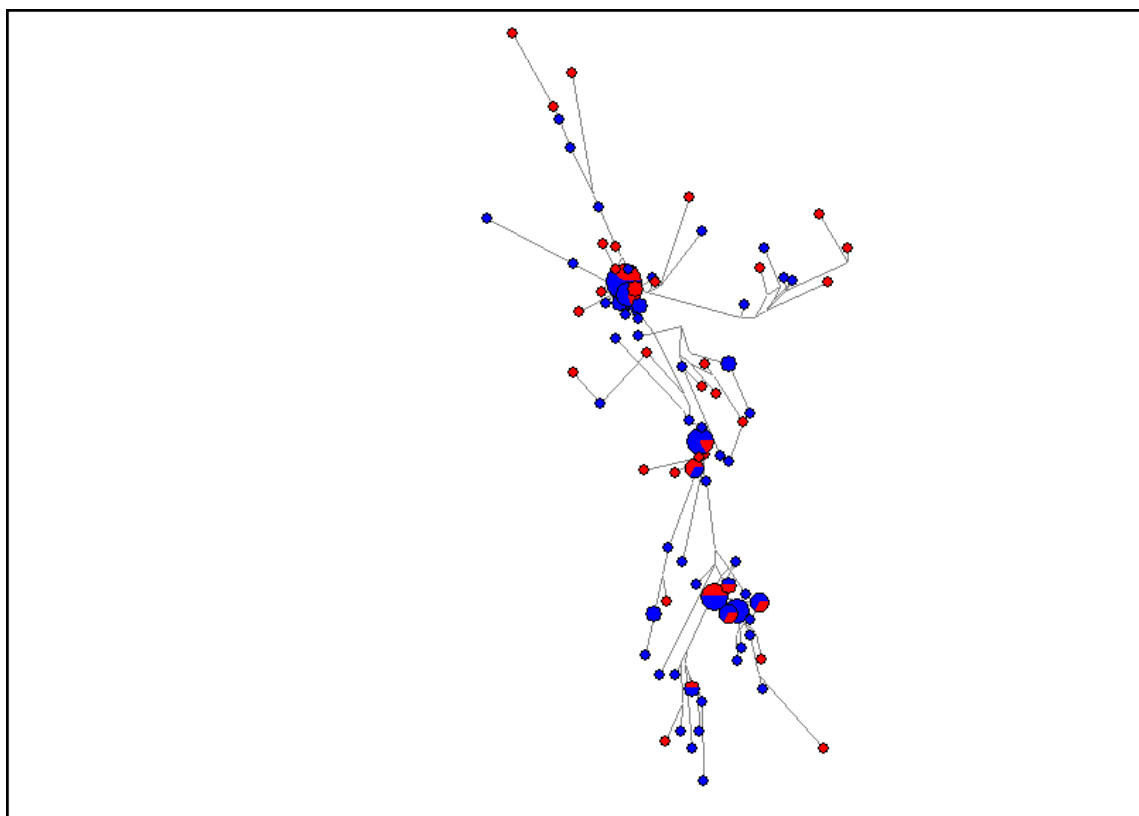


Figura 11: Árvore em rede dos haplótipos de STR de cromossomo Y (haplótipo mínimo – 10 marcadores). Foi utilizado o programa *Median Joining Network* v4.5.1.0. (www.fluxus-engineering.com) O tamanho dos círculos representa o número de indivíduos com mesmo haplótipo. Os círculos se ligam uns aos outros por linhas de comprimento variado, proporcional ao número de modificações dos STR que diferenciam os haplótipos. A cor azul indica os indivíduos de etnia Árabe e o vermelho de etnia Berbere.

Estes dados podem ser observados em um gráfico de escala multidimensional (MDS) mostrados na Figura 12A. Nesta figura pode ser notado que a Líbia (LIB, LAR e LBR) está situada mais próxima aos países da África do Norte (ARG, EGT e TUN) do que de África Central (AFR) e Moçambique (MZC).

Da mesma forma utilizamos os dados de F_{ST} para visualizar a relação destas populações em formato de árvore. A Figura 12B, mostra a árvore sem a população referência externa, portanto sem raiz. Este resultado evidencia tanto as distâncias entre as populações, quanto as similaridades. Vemos que os Líbios Berberes e Líbios Árabes se posicionam no mesmo ponto, claramente indicando que as duas amostras étnicas não são diferentes, sob a análise do cromossomo Y.

Os grupos étnicos da Líbia (Árabes e Berberes) se posicionaram próximos dos grupos representativos das populações Árabes (EGT, IEM, TUN e ARG), e distantes dos grupos representativos de populações Berberes (MAR, SUB, MOZ e SAH). Na dimensão 1, da Figura 12 A, as populações da África Sub-Saariana (AFR e MZC), populações Européias (ITA, TUR e ESP) e as populações Árabes da África do Norte (TUN, ARG, EGT, LIB, LAR e LBR) e da Ásia (IEM) ficaram agrupadas e separadas das outras populações da África do Norte (MAR, SUB, MOZ e SAH), com maior proporção de Berberes. Na dimensão 2, as populações da Ásia, África do Norte e da Áfricae Sub-Saariana (IEM, TUN, ARG, EGT, LIB, LAR, LBR, SUB, MOZ, SAH, MAR, AFR e MZC) separado de populações da Europa (ITA, ESP e TUR). A população da Líbia se mostrou homogênea e agrupada com as populações Árabes do Norte da África (TUN, ARG e EGT).

Tabela 8 - Distâncias Genéticas, F_{ST} , entre populações da África do Norte, Europa, Ásia e África do Sub-Saarian, calculada a partir dos haplótipos de STR do cromossomo Y, usando o programa Arlequin.

	AFR	ARG	EGT	ESP	ITA	LAR	LBR	MAR	MOZ	SAH	SUB	TUR	LIB	MZC	IEM	TUN
AFR	0															
ARG	0,1672	0														
EGT	0,1122	0,0400	0													
ESP	0,2078	0,1286	0,0909	0												
ITA	0,2894	0,2430	0,2059	0,1746	0											
LAR	0,1277	0,0112	0,0223	0,1251	0,2122	0										
LBR	0,1447	0,0057	0,0403	0,1219	0,2200	0,0000	0									
MAR	0,3181	0,1980	0,2141	0,2732	0,2131	0,1748	0,1829	0								
MOZ	0,3782	0,2914	0,2826	0,3480	0,3126	0,2806	0,3025	0,0710	0							
SAH	0,3715	0,2551	0,2827	0,3268	0,2750	0,2169	0,2144	0,0939	0,2167	0						
SUB	0,3221	0,1920	0,2229	0,2857	0,2112	0,1641	0,1641	0,0138	0,1252	0,0701	0					
TUR	0,2522	0,2221	0,1729	0,1929	0,0905	0,1798	0,1992	0,2230	0,3420	0,2862	0,2346	0				
LIB	0,1569	0,0242	0,0550	0,1128	0,2035	0,0034	0,0000	0,1869	0,2887	0,2145	0,1731	0,1856	0			
MZC	0,0141	0,1816	0,1186	0,2460	0,3220	0,1427	0,1638	0,3318	0,3868	0,3997	0,3342	0,2832	0,1824	0		
IEM	0,1820	0,0632	0,0471	0,1638	0,2404	0,0503	0,0714	0,2416	0,3512	0,2988	0,2521	0,1877	0,0815	0,1920	0	
TUN	0,2165	0,0263	0,0987	0,1881	0,2874	0,0354	0,0198	0,1893	0,2729	0,2292	0,1650	0,2755	0,0434	0,2291	0,1209	0

AFR, África Central (ARROYO-PARDO *et al.* 2005); ARG, Argélia (ROBINO *et al.* 2008); EGT Egito (OMRAN *et al.* 2008); ESP, Espanha (SÁNCHEZ *et al.* 2007); ITA, Itália (RICCI *et al.* 2001); LAR, Líbios Árabes; LBR, Líbios Berberes; MAR, Marrocos (BOSCH *et al.* 2000); MOZ, Mozabite (BOSCH *et al.* 2000); SAH, Saharawi (BOSCH *et al.* 2000); SUB, Berberes do Sudeste (BOSCH *et al.* 2000); TUR, Turquia (DÖNBAK *et al.* 2006); LIB, Líbia (IMMEL *et al.* 2006); MZC, Moçambique (ALVES, *et al.* 2003); IEM, Iêmen (IMMEL *et al.* 2004); TUN; Tunísia (CHERNI *et al.* 2005).

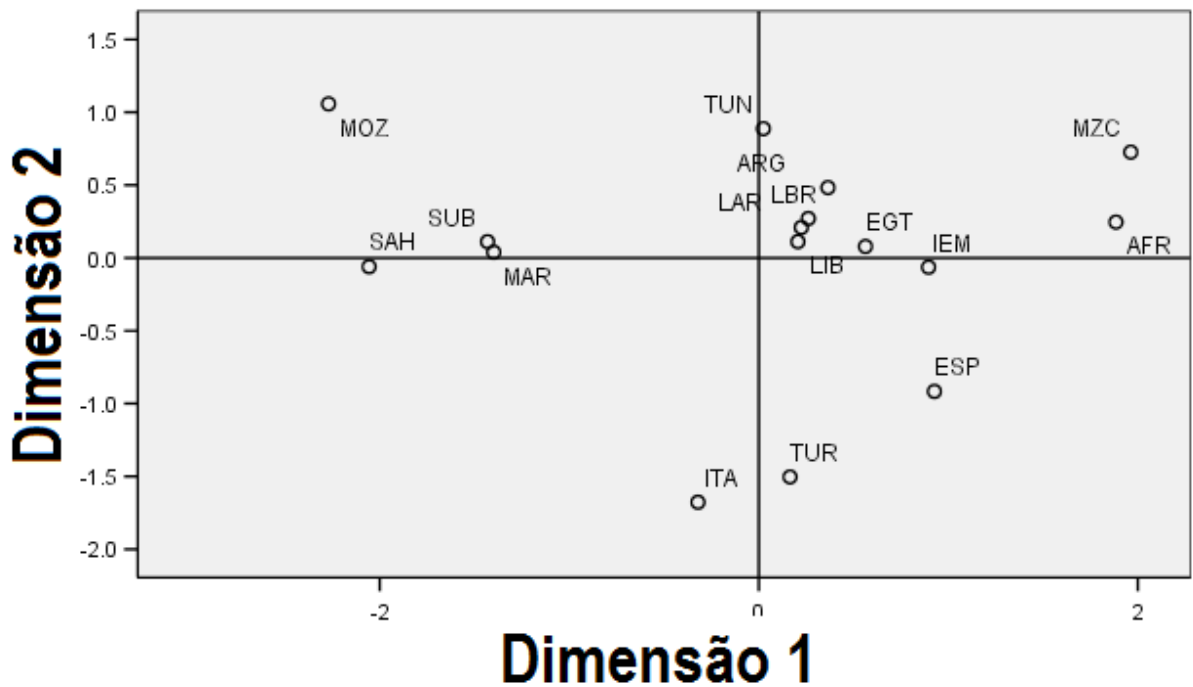


Figura 12A: Posicionamento das populações dos Líbios Árabes e Líbios Berberes em relação a países da Europa, Ásia, África do Norte e África Sub-Saariana. Gráfico de escala multidimensional (MDS) gerado a partir dos dados de F_{ST} dos haplótipos de STR do cromossomo Y, contidos na tabela 8. ITA, Itália; LAR, Líbios Árabes; LBR, Líbios Berberes; MAR, Marrocos; MOZ, Mozabite; SAH, Saharawi; SUB, Berberes do Sudeste; TUR, Turquia; LIB, Líbia; MZC, Moçambique; IEM, Iêmen; TUN; Tunísia; ARG, Argélia; AFR, África Central; EGT, Egito; ESP, Espanha.

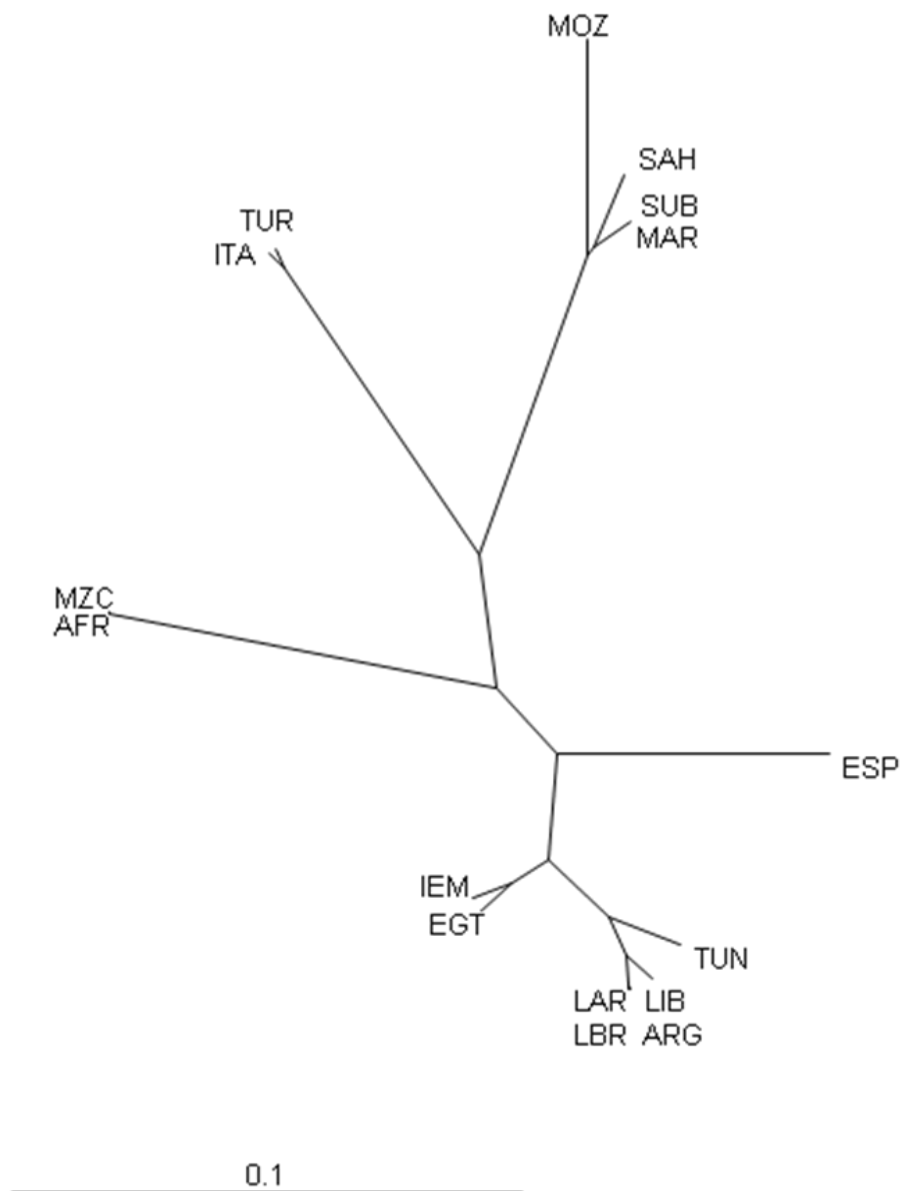


Figura 12B: Árvore filogenética das distâncias F_{ST} entre estas populações. As distâncias genéticas, definidas pelo F_{ST} , dos haplotipos de STR do cromossomo Y, foram usadas para estabelecer uma árvore filogenética, pelo algoritmo UPGMA.

5.3 Análise do DNA mitocondrial

5.3.1 Haplótipos e Haplogrupos de DNA mitocondrial

As amostras de DNA de 154 indivíduos Líbios de origem Árabe e Berbere foram amplificadas com iniciadores específicos das regiões HVI e HVII do DNA mitocondrial. Os haplótipos e os respectivos haplogrupos são mostrados na Tabela 9 designados como descrito em Material e Métodos (item 4.10.1).

Para verificar a adequação e qualidade das amostras utilizamos o programa *median joining network* que sugere uma rede filogenética entre os haplogrupos descritos cujas sequências são livres de mutações fantasmas (eventos mutacionais não relacionados com a formação de haplogrupos e conseqüentemente a migração humana). A Figura 13 mostra uma árvore estrelada produzida com os haplótipos de HVI obtidos da Tabela 9 com o programa *Median-Network*.

Na Figura 13 os círculos informam os haplogrupos, sendo a área do círculo proporcional ao número de indivíduos que carregam o haplogrupo. As linhas que conectam um círculo a outro indicam as etapas de mutação de um haplogrupo a outro. Os dados obtidos desta população são coerentes e livres de mutações fantasmas, isentos de reticulações que aparecerem na árvore quando padrões de incompatibilidade existem nas sequências, apontando possíveis mutações artificiais.

Nossos resultados mostram 154 indivíduos não relacionados, homens e mulheres, categorizados em dois grupos étnicos majoritários: Líbios de origem Árabe (92) e Líbios de origem Berbere (62). Na comparação com a sequência de referência observamos que a maioria das mudanças observadas nas amostras foi de transição (>95 %). Na posição do nucleotídeo 263A da região HVII presente na rCRS (considerada rara), na maioria de amostras encontramos a mutação 263G.

Comparando as sequências das nossa amostras com a sequência referência rCRS, a substituição do tipo transição foi o polimorfismo dominante e a troca entre as bases T e C foram as mais freqüentes. Em estudo sobre o padrão de substituição de nucleotídeos nas regiões HVI e HVII, observou-se uma taxa de substituição em HVI duas vezes maior que HVII. Esta diferença é devida, principalmente, à alta frequência de transições de pirimidina em HVI (MEYER, *et al*, 1999). As mudanças mais freqüentes observadas na região controle HVII de mtDNA com respeito a rCRS foram à posição 263 (rCRS) de A para G; a inserção de C mais comum foi no nucleotídeo 309 e 315.

Tabela 9 - Sítios de mutação observados nas sequências da região controle da mtDNA com respeito a rCRS.

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 – nt 340)	Árabe	Berbere
1.	LB22	B5	16243 16256 263 309.1 315.1		1
2.	R92	H	16129 73 263	1	
3.	LB24	H	16233 263 309.1 309.2 315.1	1	
4.	LB04	H	16258 16304 73 143 146 195 199 263 309.1 315.1		1
5.	A20	H	16174 16304 263 309.1 315.1	1	
6.	LB03	H	16218 73 150 189 263 315.1		1
7.	LB08	H	16218 73 195 202 263 309.1 315.1		1
8.	A11	H	16256 73 151 152 182 186 189 247 263 315.1 316	1	
9.	A08	H	93 95 152 185 189 236 247 263 315.1		1
10.	A12	H	73 146 189 200 263 315.1	1	
11.	A13	H	263 309.1 315.1	1	
12.	A37	H	263 309.1 309.2 315.1		1
13.	L04	H	73 150 189 195 263 295 309.1 315.1	1	
14.	L52	H	73 118 143 146 152 195 263 315.1		1
15.	R54	H	263 309.1 309.2 315.1		1
16.	R75	H	73 150 152 195 235 263 295 309.1 315.1	1	
17.	L140	H	16086 152 263 309.1 315.1	1	
18.	LB13	H	16189 16304 263 309.1 315.1		1
19.	LB35	H	16189 16304 73 152 182 185T 247 263 315.1		1
20.	LB39	H	16189 16304 73 146 150 152 182 195 207 263 309.1 315.1.		1

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 – nt 340)	Árabe	Berbere
21.	A35	H	16304 73 143 146 152 195 263 309.1 315.1	1	
22.	LB06	H	16304 263 309.1 309.2 315.1		1
23.	LB38	H	16304 93 185 189 200 247 263 315.1		1
24.	R106	H	16311 263 309.1 309.2 315.1	1	
25.	L63	H	16300 16362 73 263 309.1 315.1	1	
26.	L213	H	R73 152 182 185T 195 247 263 315.1		1
27.	A04	H	73 263 315.1	1	
28.	A19	H	73 263 271 295 315.1	1	
29.	A24	H	263 309.1 315.1		1
30.	R18	H	239 263 309.1 309.2 315.1	1	
31.	R23	H	73 150 195 263 315.1		1
32.	LB20	HV	16067 16343 151 152 263 309.1 315.1		1
33.	LB34	HV	16148 16162 16209 16343 73 263 295 309.1 315.1		1
34.	R24	HV	16298 73 150 195 200 263 295 315.1	1	
35.	L81	J	16051 16069 16126 16188 16331 93 121 146 152 185 189 204 207 247 263 309.1 315.1	1	
36.	A15	J	16069 16114 16126 16215 16265 263 309.1 315.1	1	
37.	R67	J	16069 16126 16241 73 146 150 152 263 315.1	1	
38.	A44	J	16069 16126 16231 16261 73 150 195 263 309.1 315.1		1
39.	R03	J	16032 16069 16126 73 152 263 315.1	1	
40.	R95	J	16069 16126 73 185 188 228 263 295 309.1 315.1	1	
41.	L40	J1	16069 16126 16261 16361 263. 309.1 315.1	1	
42.	A55	J1	16069 16126 16129 16145 16261 152 195 263 309.1 315.1		1

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 – nt 340)	Árabe	Berbere
43.	R68	J1	16126 16193 16234 16300 16308 73 150 152 263 309.1 315.1	1	
44.	L54	J1a	16069 16126 A16141 16294 73 263 309.1 315.1		1
45.	R107	J1a	16069 16126 16241 263 315.1	1	
46.	LB47	J1b	16069 16126 16145 16222 16261 16311 93 95 185 189 236 247 263 309.1 315.1		1
47.	A31	J1b	16069 16126 16145 16222 16261 73 143 146 152 195 263 309.1 315.1	1	
48.	L21	J1d	16069 16193 16300 16309 152 236 263 309.1 315.1	1	
49.	LB28	K	16093 16168 16224 16311 263 309.1 315.1		1
50.	A26	K	16093 16224 16311 146 152 263 298 315.1	1	
51.	L124	K	16224 16311 73 143 146 152 195 263 309.1 309.2 315.1		1
52.	R50	K	16093 16224 16311 73 152 263 309.1 315.1	1	
53.	R09	K	16224 16294 16311 16327 73 152 263 309.1 315.1	1	
54.	A06	K1	16224 16311 73 150 195 263	1	
55.	L28	K1a	16093 16224 16311 263 315.1		1
56.	L58	L	16093 16111A 16189 16192 16223 16278 16294 16309 73 150 228 263 315.1		1
57.	R02	L	16209 16223 16292 16294 16311 16327 73 150 195 263 315.1	1	
58.	A14	L0	16168 16187 16188 16223 16230 16256 16320 204 263 309.1 315.1	1	
59.	A17	L0a	16129 16148 16168 16172 16187 16188 16189 16223 16230 16278 16311 16320 73 146 152 195 309.1 315.1	1	
60.	L29	L0a	16093 16129 16148 16168 16172 16187 16189d 16209 16223 16230 16278 16293 16311 16320 73 151 152 263 315.1		1
61.	A05	L1	16129 16169 16172 16187 16189 16223 16230 16278 16311 16327 73 152 182 186A 189C 195 247 263 297 316	1	

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 – nt 340)	Árabe	Berbere
62.	R89	L1	16032 16064 16069 16126 16136 16240 16270 16278 73 150 263 315.1	1	
63.	A27	L1	16093 16126 16145 16187 16189 16223 16264 16270 16278 16293 16311 73 143 150 263 309.1 315.1	1	
64.	L97	L1	16124 16223 16191 16320 263 309.1 315.1		1
65.	R25	L1	16126 16187 16189 16223 16264 16278 16293 16311 118 146 152 263 298 315.1	1	
66.	R70	L1	16298 16320 73 150 195 263 295 315.1 316		1
67.	R07	L1b	16126 16187 16189 16223 16264 16270 16278 16293 16311 73 146 152 263 315.1	1	
68.	L171	L1b	16126 16187 16189 16223 16264 16278 16293 16311 263 309.1 315.1	1	
69.	L55	L1b1	16126 16189 16187 16223 16264 17270 17278 16293 16311 73 152 263 295 309.1 315.1		1
70.	L01	L1b1	16126 16187 16189 16223 16264 16270 16278 16293 16311 73 263 309.1 309.2 315.1	1	
71.	L12	L1c	16223 16286 16320 73 152 263 315.1	1	
72.	L119	L2	16114A 73 152 263 315.1	1	
73.	LB23	L2	16114A 16129 16213 16223 16278 16362 73 143 146 152 182 189G 195 263 309.1 315.1		1
74.	L131	L2	16173 16223 16278 16294 73 263 315.1	1	
75.	LB21	L2	16189 16192.1 16223 16241 16270 16278 16294 16309 73 150 263 315.1		1
76.	A18	L2	16111 16145 16184 16223 16239 16278 16292 16355 73 143 150 152 153 189 263 309.1 315.1	1	
77.	R26	L2	16114A 16129 16213 16223 16278 73 143 146 152 182 189 195 263 315.1	1	
78.	R97	L2a	16093 16189 16192 16223 16278 16294 16309 73 152 263 309.1 309.2 31.1	1	
79.	R46	L2a	16223 16278 16294 16300 16309 73 152 182T 185T 195 247 263 309.1 315.1	1	
80.	LB41	L2a	16223 16278 16294 16309 73 263 315.1		1
81.	R52	L2a	16189 16192 16223 16278 16294 16309 73 143 146 151 152 195 263 309.1 315.1	1	

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 – nt 340)	Árabe	Berbere
82.	L72	L2a	16189 16192 16223 16278 16294 16344 195 263 315.1	1	
83.	A46	L2a	16223 16278 16294 16300 16309 73 152 263 295 309.1 315.1		1
84.	R01	L2a	16278 16294 16309 73 152 263 315.1	1	
85.	A09	L2a	16189 16192 16223 16241 16278 16294 16309 73 150 189 200 263 315.1	1	
86.	A22	L2a	16189 16192 16223 16278 16294 195 263 309.1 315.1	1	
87.	R06	L2a1	16093 16189 16192 16223 16278 16294 16309 73 195 200 263 309.1 315.1	1	
88.	L126	L2a1	16189 16192 16223 16278 16294 16309 73 146 150 152 182 183 195 198 204 238.1 263 315.1	1	
89.	R08	L2a1	16189 16192 16223 16278 16294 16309 73 263 309.1 315.1	1	
90.	R16	L2a1	16189 16192 16223 16278 16294 16309 73 150 263 315.1		1
91.	A29	L2a2	16209 16223 16278 16294 16301 16354 73 142 146 152 182 189 195 309 310	1	
92.	A43	L3	16223 16278 16362 73 152 263 315.1	1	
93.	L78	L3	16223 16286 16320 73 152 204 207 263 315.1		1
94.	R41	L3	16223 16286 16320 73 150 195 263 315.1		1
95.	A41	L3	16093 16209 16223 16234 16256 16327 73 150 195 263 309.1 315.1	1	
96.	L15	L3	16124 16166 16167 16223 73 189 195 263 315.1	1	
97.	LB15	L3	16124 16166 16167 16223 73 189 200 263 309.1		1
98.	L79	L3	16124 16223 16291 16320 73 263 309.1 315.1	1	
99.	A25	L3	16124 16189 16223 16288 16325 73 143 146 152 195 199 263 309.1 315.1	1	
100.	LB19	L3	16172 16209 16223 16266A 16292 73 143 146 152 195 263 309.1 315.1		1
101.	L122	L3	16209 16223 16292 16294 16311 16327 73 146 152 195 263 309.1 315.1	1	
102.	L37	L3*	16209 16223 16311 73 150 152 263 309.1 315.1	1	

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 – nt 340)	Árabe	Berbere
103.	A30	L3*/N*	16041 16223 150 199 263 309.1 315.1	1	
104.	R17	L3*/N*	16041 16223 263 315.1		1
105.	L06	L3a	16145 16176G 16223 73 152 263 295 309.1 315.1		1
106.	R05	L3b	16124 16223 16278 16362 73 146 150 152 182 195 198 207 263 315.1	1	
107.	R81	L3b	16124 16223 16278 16362 228 263 315.1	1	
108.	A16	L3b	16223 16278 16362 263 309.1 315.1	1	
109.	A33	L3b1	16145 16223 16278 16362 73 143 146 152 195 263 309.1 309.2 315.1		1
110.	R12	L3e	16223 73 150 152 195 203 215 263 295 315.1	1	
111.	LB10	L3e	16223 16327 73 150 152 195 263 309.1 309.2 315.1		1
112.	L101	L3e	16223 16311 16320 152 263 315.1	1	
113.	LB12	L3e	16032 16223 16320 73 146 152 195 263 309.1 315.1		1
114.	L105	L3e	16172 16189 16193.1 16193.2 73 152 182 185T 189 195 247 263 309.1 315.1		1
115.	R48	L3e2b	16172 16189 16223 16320 73 150 152 189 195 283 295 315.1		1
116.	LB17	M	16176 16209 16223 16234 152 263 309.1 309.2 315.1		1
117.	A42	M1	16129 16185 16189 16223 16249 16311 16348 73 150 152 182 195 198 204 242 263 315.1		1
118.	L18	M1	16129 16209 16223 16249 16311 73 195 263 279 309.1 315.1	1	
119.	LB09	M11	16223 73 263 309.1 315.1		1
120.	R15	M11	16223 73 146 150 152 195 200 244 263 309.1 315.1	1	
121.	LB11	M1b1	16129 16185 16189 16191D 16223 16249 16311 73 152 182 185 195 247 263 315.1		1
122.	A03	M7	16093 16295 16362 152 263 309.1 315.1	1	
123.	LB27	Pre-HV	16092 16126 16224 16362 263 309.1 315.1		1
124.	LB32	Pre-HV	16126 16304 16362 73 143 146 152 195 263 309.1 309.2 315.1		1

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 - nt 340)	Árabe	Berbere
125.	LB14	Pre-HV	16126 16304 16362 73 146 152 195 263 309.1 309.2 315.1		1
126.	A32	Pre-HV1	16126 16291 16362 73 143 146 152 195 263 315.1	1	
127.	A07	Pre-HVI	16126 16183 16189 16193.1 16232 16362 263 309.1 309.2 315.1	1	
128.	A28	Pre-HVI	16126 16304 16362 73 263 309.1 315.1		1
129.	L89	T	16187 16260 16270 16296 263 309.1 315.1	1	
130.	L14	T	16126 16304 16362 152 263 309.1 315.1	1	
131.	A23	T	16126 16294 16311 16343 (T72C) 195 263 315.1		1
132.	A10	T1	16126 16163 16186 16189 16235 16294 263 309.1 315.1	1	
133.	LB31	T1	16126 16163 16186 16198 16294 263 315.1	1	
134.	A01	T1	16126 16163 16186 16188D 16189 16294 73 150 263 315.1		1
135.	L03	T1	16126 16186 16189 16294 16355 16356 73 114 152 263 309.1 315.1	1	
136.	LB26	T2	16241 16304 146 152 195 263 309.1		1
137.	L96	T3	16126 16146 16292 16294 152 263 309.1 315.1	1	
138.	R29	T3	16126 16146 16292 16294 263 315.1		1
139.	LB29	U3	16067 16343 263 309.1 315.1		1
140.	R11	U5	16041 16192 73 263 309.1 315.1	1	
141.	L07	U5	16270 73 189 235 263 309.1 315.1	1	
142.	A39	U5	16189 16192 16270 73 195 263 315.1	1	
143.	L22	U5	16243 16256 73 152 182 195 247 315.1	1	
144.	LB33	U5b	16189 16270 73 195 263 315.1		1
145.	R22	U6	16172 16219 16311 73 152 217 263 315.1	1	
146.	LB25	U6a	16172 16183C 16189 16193.1 16239 16278 73 189 235 263 309.1 315.1		1

Número	Amostra	Haplogrupo	HVI (nt 16024 - nt 16365) HVII (nt 73 - nt 340)	Árabe	Berbere
147.	LB46	V	16153 16298 93 239 263 315.1		1
148.	A38	V	16298 73 150 152 189 195 263 295 315.1	1	
149.	L23	V	16298 73 152 263 295 309.1 315.1	1	
150.	L38	V	16298 263 3091 315.1	1	
151.	L41	V	16298 263 315.1	1	
152.	R13	V	16298 73 152 263 309.1 315.1	1	
153.	R58	V	16298 152 263 309.1 315.1	1	
154.	A21	V	16189 16298 251 263 315.1	1	

Total

92

62

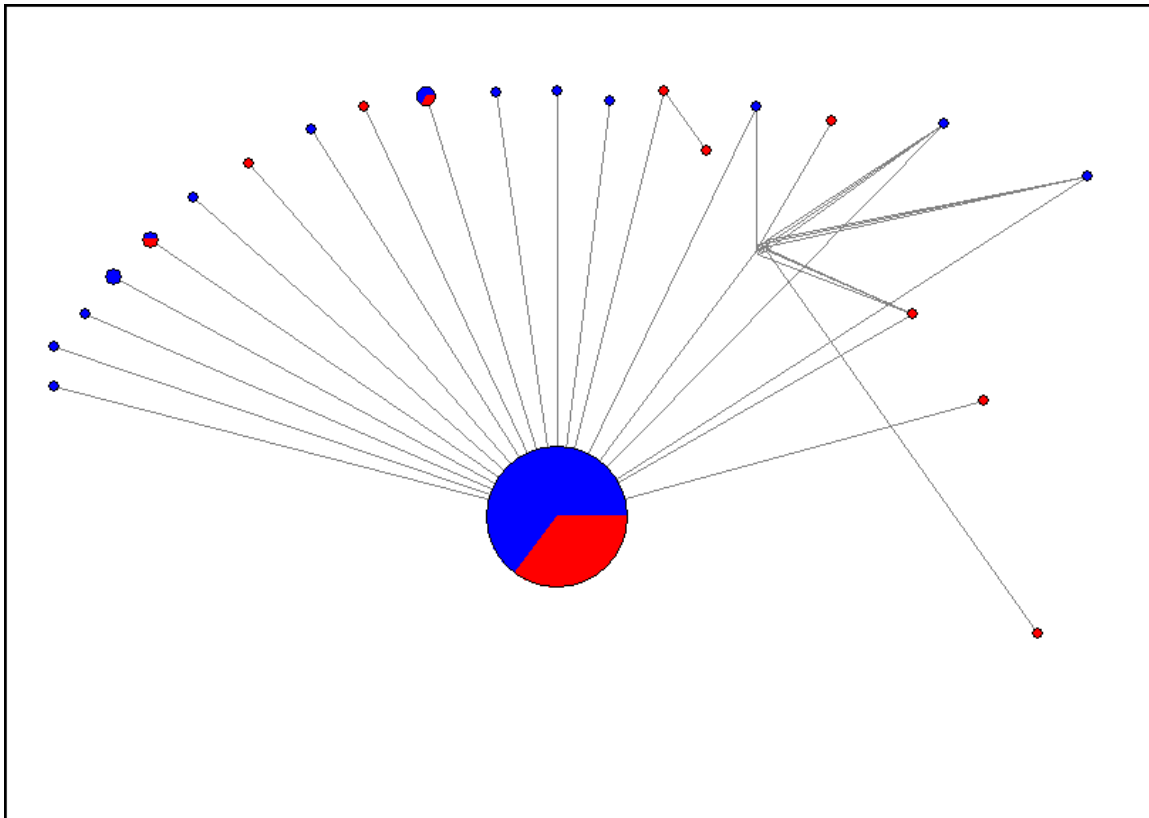


Figura 13: Distribuição homogênea de haplótipos de DNA mitocondrial dos Líbios de origem Berbere e Árabe. Árvore em rede das sequências de DNA mitocondrial da região HVI obtida com o programa *Median Joining Network*. Os círculos informam os haplogrupos e a área do círculo é proporcional ao número de indivíduos que carregam o haplogrupo. As linhas que conectam um círculo a outro indicam as etapas de mutação de um haplogrupo a outro. A cor azul indica os indivíduos de etnia Árabe e os vermelhos de etnia Berbere.

5.3.2 Distribuição de haplogrupos entre os grupos étnicos Árabes e Berberes

Os haplogrupos obtidos foram descritos para outras regiões na África do Norte, Ásia e Europa, tais como H, J, K, L, T, M, U, V e B.

Observamos que haplogrupos presentes em populações Europeias (H, HV, J, K, pré HV, T, U e V), Africanas (macrohaplogrupo L) e Asiáticas (B e M) estão representados em ambos os grupos étnicos da população Líbia, Árabe e Berbere. A diversidade genética entre os Líbios Árabes foi de 0,9145 e entre os Líbios Berberes foi de 0,9149 (calculado pelo programa Arlequin). Porém os haplogrupos Africanos estão mais representados no grupo Árabe e os haplogrupos Asiáticos mais representados no grupo Berbere. No entanto, o cálculo de F_{ST} (0,002) entre as duas etnias sugere que não existe diferença entre os dois grupos na Líbia (Tabela 10). A distribuição mais detalhada dos haplogrupos, como descrito no ANEXO IV, pode ser melhor interpretada quando observada a distância genética entre os dois grupos étnicos da Líbia com outros grupos Berberes e Árabes da África do Norte e Ásia. A distância genética F_{ST} foi calculada baseada na frequência de ocorrência do haplogrupos destas populações estudadas, Árabe Asiático (Iêmen, Arábia Saudita) e da África do Norte (Tunísia, Argélia, Marrocos e Egito) e grupos étnicos Berberes da África do Norte (Berberes do Marrocos, Berberes do Sul de Marrocos, Saharawi, Mozabite), através do programa Arlequin. Este dados, mostrados na Tabela 10, foram utilizados para obtenção de um gráfico de escala multidimensional no programa SPSS v.14. Na Figura 14 observamos que os grupos Berberes, Mozabite (MOZ) e Saharawi (SAH), ficam separados dos demais grupos da África do Norte tanto como da Arábia Saudita (ARA) e Iêmen (IEM). Isto pode ser explicado por estarem, Mozabite e Saharawi, como um grupo mais isolado geograficamente na área do deserto de Saara.

Os Líbios Árabes se posicionaram próximos do lêmén, o que poderia representar a migração original de tribos do lêmén, no século VII, em direção a África do Norte. Os Líbios Berberes se posicionaram próximos das populações da África do Norte (ARG, MBR, MOZ, SAH, TUN, SUB e MAR), com distância genética próxima do zero (-0,0067) em relação a Tunísia (TUN). Geograficamente a Líbia está mais próxima da Tunísia de que as outras populações. Notadamente, as distâncias genéticas entre o grupo da Líbia (Árabes e Berberes juntos) não apresenta diferenças significativas em relação aos grupos da África do Norte.

Tabela 10 – Distâncias genéticas, medida em F_{ST} , entre populações do Norte da África, Sub-Saara, Ásia e Europa a partir dos haplótipos de DNA mitocondrial.

	LAR	LBR	LIB	ARG	MAR	MBR	MOZ	SAH	SUB	TUN	ITA	PIB	TUR	IRQ	SIR	IEM	ARA	EGT	SUD	QUE	ETI
LAR	0																				
LBR	0,0021	0																			
LIB	-0,0062	-0,0058	0																		
ARG	0,0236	0,0057	0,0156	0																	
MAR	0,0133	0,0048	0,0093	0,0057	0																
MBR	0,0671	0,0470	0,0571	0,0274	0,0307	0															
MOZ	0,0611	0,0545	0,0571	0,0604	0,0219	0,0502	0														
SAH	0,0180	0,0137	0,0156	0,0445	0,0079	0,0744	0,0477	0													
SUB	0,0139	0,0104	0,0118	0,0027	-0,0072	0,0122	0,0256	0,0161	0												
TUN	0,0040	-0,0067	-0,0008	0,0059	-0,0026	0,0386	0,0365	0,0131	0,0017	0											
ITA	0,0878	0,0598	0,0744	0,0336	0,0449	0,0014	0,0830	0,0953	0,0265	0,0485	0										
PIB	0,1044	0,0750	0,0904	0,0436	0,0511	0,0074	0,0838	0,1032	0,0289	0,0619	0,0030	0									
TUR	0,0389	0,0198	0,0308	0,0420	0,0394	0,0442	0,0686	0,0533	0,0351	0,0262	0,0537	0,0691	0								
IRA	0,0256	0,0139	0,0204	0,0390	0,0306	0,0404	0,0609	0,0375	0,0211	0,0190	0,0550	0,0688	-0,0009	0							
SIR	0,0356	0,0223	0,0299	0,0543	0,0410	0,0536	0,0673	0,0430	0,0365	0,0252	0,0734	0,0922	0,0042	-0,0013	0						
IEM	0,0168	0,0207	0,0180	0,0576	0,0465	0,1045	0,0821	0,0445	0,0559	0,0238	0,1227	0,1420	0,0333	0,0294	0,0340	0					
ARA	0,0528	0,0422	0,0481	0,0837	0,0765	0,1085	0,1020	0,0770	0,0791	0,0518	0,1230	0,1438	0,0196	0,0209	0,0194	0,0227	0				
EGT	0,0179	0,0140	0,0160	0,0385	0,0320	0,0626	0,0652	0,0452	0,0373	0,0176	0,0813	0,1034	0,0146	0,0163	0,0154	0,0133	0,0220	0			
SUD	0,0933	0,1311	0,1050	0,1712	0,1494	0,2310	0,1836	0,1499	0,1558	0,1267	0,2418	0,2583	0,1508	0,1534	0,1578	0,0796	0,1418	0,0907	0		
QUE	0,0805	0,0880	0,0813	0,1308	0,1062	0,2002	0,1573	0,0948	0,1324	0,0998	0,2166	0,2371	0,1294	0,1340	0,1309	0,0650	0,1231	0,0747	0,0631	0	
ETI	0,0479	0,0529	0,0493	0,0937	0,0823	0,1494	0,1094	0,0791	0,0955	0,0588	0,1697	0,1913	0,0685	0,0709	0,0653	0,0214	0,0474	0,0260	0,0482	0,0474	0

LAR, Líbios Árabes; LBR, Líbios Berberes; LIB, Líbia (Árabes e Berberes); ARG, Argélia (PLAZZA *et al.*, 2003); MAR, Marrocos (PLAZZA *et al.*, 2003); MBR, Marroquinos Berberes (PLAZZA *et al.*, 2003); MOZ, Mozabites (PLAZZA *et al.*, 2003); SAH, Saharawi (PLAZZA *et al.*, 2003); SUB; Berberes do Sudeste (PLAZZA *et al.*, 2003); TUN, Tunisia (PLAZZA *et al.*, 2003); ITA, Itália (PLAZZA *et al.*, 2003); PIB, Península Ibérica (PLAZZA *et al.*, 2003); TUR, Turquia (ABU-AMERO *et al.*, 2007); IRQ, Iraque (ABU-AMERO *et al.*, 2007); SIR, Síria (ABU-AMERO *et al.*, 2007); IEM, Iêmen (ABU-AMERO *et al.*, 2007); ARA, Arábia Saudita (ABU-AMERO *et al.*, 2007); EGT, Egito (ABU-AMERO *et al.*, 2007), SUD, Sudão (ABU-AMERO *et al.*, 2007); QUE, Quênia (ABU-AMERO *et al.*, 2007); ETI, Etiópia (ABU-AMERO *et al.*, 2007).

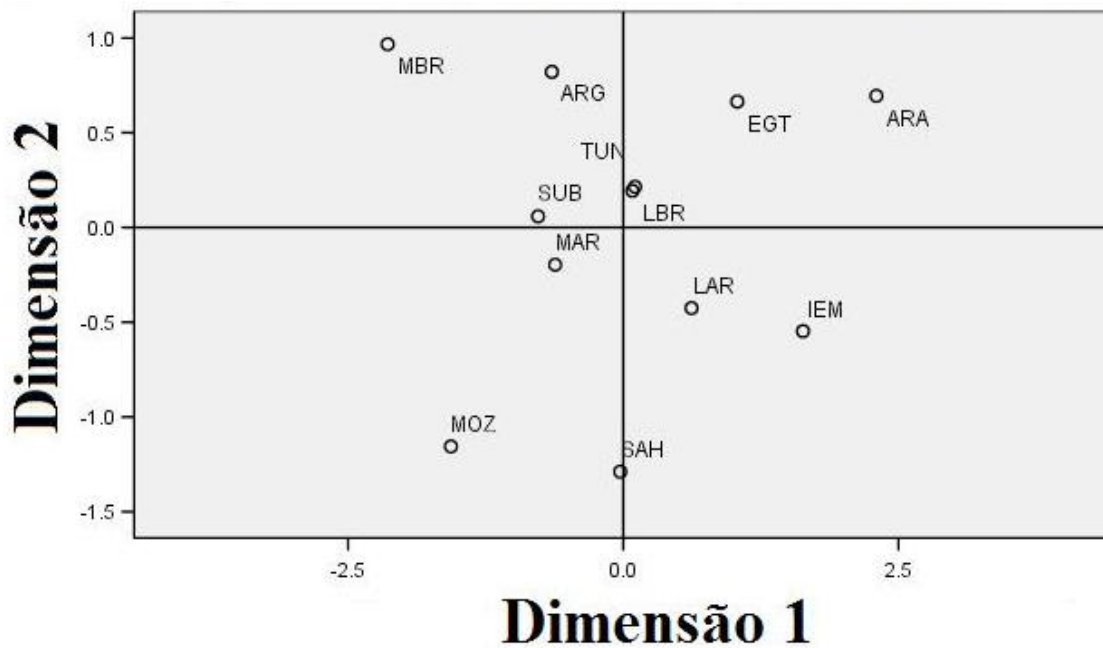


Figura 14: Posicionamento das populações dos Líbios Árabes e Líbios Berberes em relação às populações dos Berberes da África do Norte, Árabes da África do Norte e Árabes da Ásia. Gráfico de escala multidimensional (MDS) gerado a partir dos dados de F_{ST} dos haplogrupos de DNA mitocondrial contidos na tabela 10. LAR, Líbios Árabes; LBR, Líbios Berberes; MAR, Marrocos; MOZ, Mozabite; SAH, Saharawi; SUB, Berberes do Sudeste; IEM, Iêmen; TUN; Tunísia; ARG, Argélia; IEM, Iêmen; ARA, Arábia Saudita; EGT, Egito.

5.3.3 Comparação dos Haplogrupos com populações geograficamente relacionadas

Com objetivo de compreender a expansão dos haplogrupos de DNA mitocondrial no Norte da África, comparamos as populações vizinhas e aquelas que tem participação na história da Líbia. Extraímos os dados do ANEXO IV, onde estão mostradas as frequências dos haplogrupos disponíveis destas populações. Estes dados foram utilizados para calcularmos as distâncias genéticas F_{ST} (com o programa Arlequin) mostradas na Tabela 10.

Nesta tabela observamos que a maior distância genética F_{ST} é entre a população do Sudão (SUD) com Península Ibérica (PIB) (0,2583) e com Itália (ITA) (0,2418).

Por não apresentarem distâncias genéticas F_{ST} significativas agrupamos os dados de Líbios Berberes e Árabes e outras populações com pequena distância genética para verificar a distribuição das populações da África do Norte, Sub-Saara, Ásia (Arábia Saudita, Iêmen, Síria e Iraque) e Europa (Turquia, Itália e Península Ibérica). Extraímos estes dados de F_{ST} da tabela 10 que foram visualizados em um gráfico de escala multidimensional (MDS), gerado no programa SPSSv.14, apresentado na Figura 15 A. Observamos que as populações da Península Ibérica e Itália ficam distantes de populações do Sub-Saara, sendo que a distribuição das populações entre elas pode ser dividida como pertencentes ao continente Europeu e Asiático e separadas daquelas dos países da África (Figura 15 A).

Os mesmos dados de F_{ST} selecionados para a Figura 15 A, foram utilizados para visualizar uma árvore filogenética sem raiz, (Figura 15 B) gerada pelo programa GDA, por *neighboring-joining* e visualizado em *TreeView*.

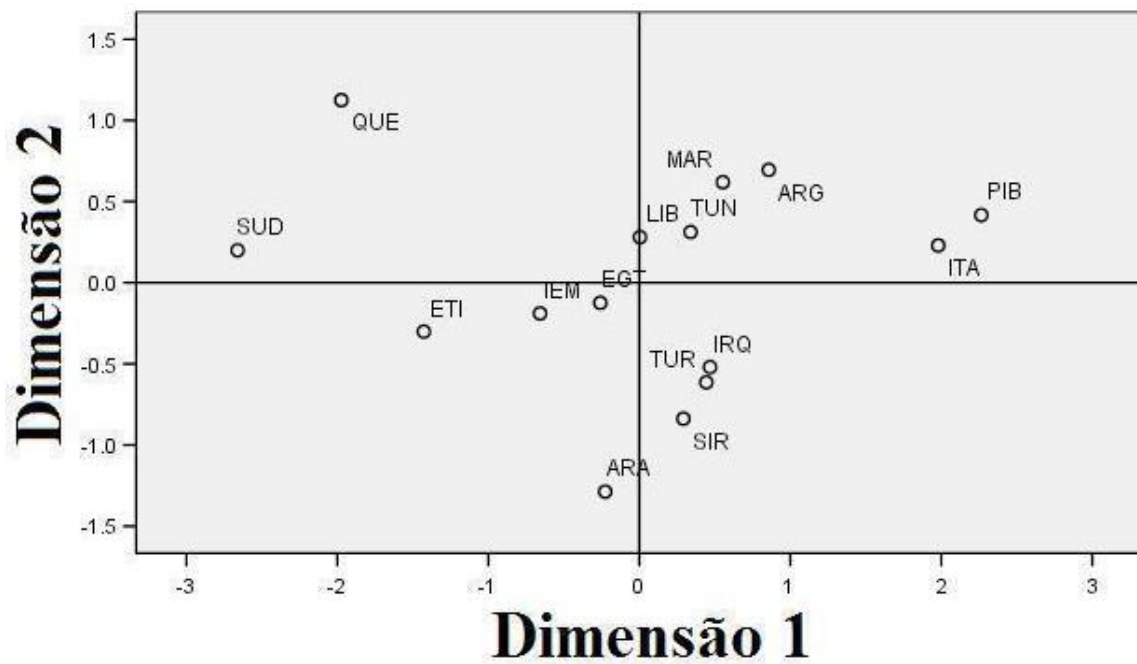


Figura 15 A: Posicionamento da população da Líbia em relação às populações da Europa, Ásia, África do Norte e África Sub-Saariana. Gráfico de escala multidimensional (MDS) gerado a partir dos dados de F_{ST} dos haplogrupos de DNA mitocondrial contidos na tabela 10. LIB, Líbia; ARG, Argélia; MAR, Marrocos; TUN, Tunísia; ITA, Itália; PIB, Península Ibérica; TUR, Turquia; IRQ, Iraque; SIR, Síria; IEM, Iêmen; ARA, Arábia Saudita; EGT, Egito; SUD, Sudão; QUE, Quênia; ETI, Etiópia.

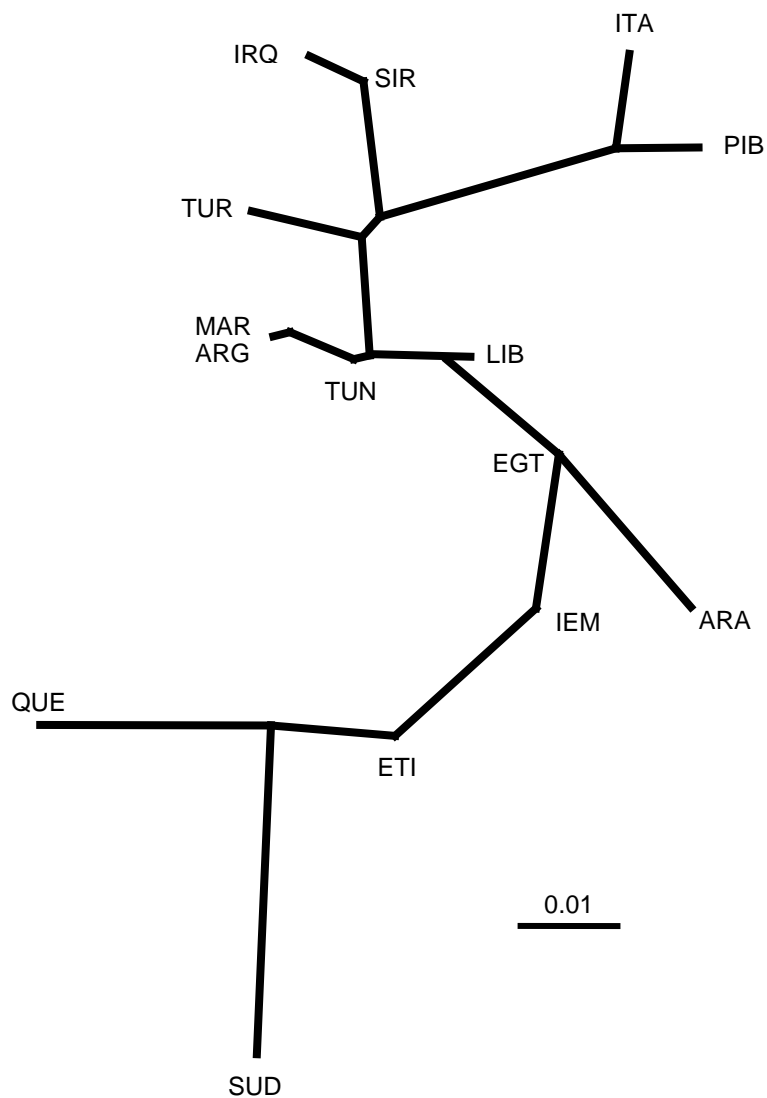


Figura 15 B: Posicionamento de populações da África do Norte, Ásia, Europa e África Sub-Saariana. Distâncias genética $-F_{ST}$, dos haplogrupos de DNA mitocondrial algoritmo (*Neighbour-Joining*) foram usadas para gerar uma árvore filogenética com *TreeView*. LIB, Líbia; ARG, Argélia; MAR, Marrocos; TUN, Tunísia; ITA, Itália; PIB, Península Ibérica; TUR, Turquia; IRAQ, Iraque; SIR, Síria; IEM, Iêmen; ARA, Arábia Saudita; EGT, Egito, SUD, Sudão; QUE, Quênia; ETI, Etiópia

6. Discussão

Durante a migração homem para novas regiões geográficas, mutações genéticas iam ocorrendo e pela seleção se desenvolvendo em novos haplogrupos. Cada haplogrupo se comportando como uma linhagem evolutiva independente. Condições climáticas e ambientais das diferentes regiões do mundo, contribuíram para o espalhamento ou o estabelecimento, por deriva ou fluxo gênico, destes haplogrupos. Quanto mais antigo for o haplogrupo, maior a sua distribuição geográfica (Figura 16). Parte dos haplogrupos tem uma distribuição geográfica restrita a algumas partes do globo, permitindo a construção da sua origem geográfica ou étnica. Os homens quando deixaram a suas marcas genéticas, migraram para diferentes regiões continentais, há aproximadamente 60.000 anos atrás. Estas marcas são possíveis de serem vistas ainda hoje pelo gradiente da distribuição das frequências alélicas (CAMPBELL & TISHKOFF, 2008).

A partir de estudos filogeográficos, e o mapeamento das frequências dos marcadores genéticos, pôde ser criado um quadro que sugere por onde e quando os ancestrais do homem moderno se deslocaram. Estes fluxos migratórios um pequeno grupo de Africanos deixaram descendentes para ocupar os mais longínquos pontos de terra (CAMPBELL & TISHKOFF, 2008).

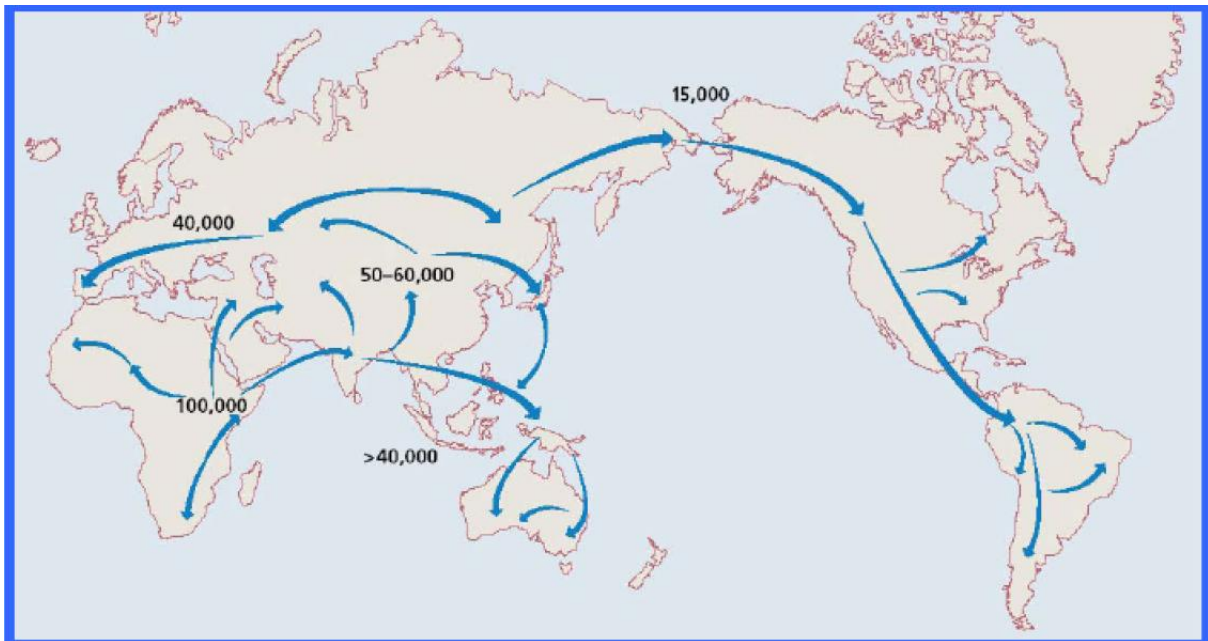


Figura 16: O mundo e as migrações históricas. A diáspora do homem moderno a partir da África para Ásia, Europa e Oceania e depois para as Américas. Os números correspondem à estimativa em anos determinada principalmente por fósseis encontrados em diferentes lugares. Fonte CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994.

O geneticista John Avise define a filogeografia como o campo de estudo dos principais processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas dentro das espécies, com ênfase em fatores históricos (AVISE, 2000). A filogeografia ajuda a contar a história da humanidade desde sua gênese, reconstruindo os processos evolutivos que a originaram, até os eventos de colonização mais recentes. Os modelos evolutivos propõem mecanismos possíveis pelos quais determinados grupos populacionais, padrões da variação e história demográfica, são observados nas populações modernas.

Os cientistas acreditam que os humanos modernos surgiram na região da África Sub-Saariana há cerca de 150 e 200 mil anos. Acredita-se que quando as populações começaram a crescer e se espalhar, elas teriam subido o vale do Nilo, já

que o rio oferecia água e comida necessárias para a viagem, até o Mediterrâneo (FORSTER & MATSUMURA, 2005).

Recentemente, pesquisadores ingleses afirmaram ter identificado uma nova rota percorrida pelos humanos modernos quando saíram da África. A nova pesquisa, publicada no final de 2008 (OSBORNE *et al.*, 2008), sugere uma rota que atravessa o Saara e chega aonde hoje se localiza a Líbia. Segundo os pesquisadores, a presença de um "corredor úmido" através da Líbia poderia ter possibilitado que os primeiros humanos modernos cruzassem o deserto do Saara, que na época, assim como hoje, cobria grande parte do território Africano e teria representado um grande obstáculo para o êxodo dos humanos.

Na nova pesquisa foram usadas imagens feitas por satélite e identificados fósseis de antigos leitos de rios cruzando o Saara na Líbia, seguindo ao norte da região central do Saara até a costa do Mediterrâneo (OSBORNE *et al.*, 2008). Depois de uma análise geoquímica, os pesquisadores afirmaram que os leitos dos rios eram ativos durante o último período interglacial, e que havia cursos de água vitais no que hoje é uma região árida.

Dados anteriores haviam mostrado que houveram intensas chuvas na região sul do Saara, entre 130 e 170 mil anos atrás num intervalo entre as eras do Gelo, conhecido como o último período interglacial. Essas chuvas teriam contribuído para prover os rios que cruzavam o Saara, oferecendo um caminho alternativo ao corredor do Nilo (OSBORNE *et al.*, 2008).

Isto é reforçado pelo trabalho de Osborne e cols (2008) que analisaram diferentes elementos químicos presentes em conchas de lesmas em duas áreas nos fósseis dos leitos dos rios e também fósseis de microfósseis platônicos no mar Mediterrâneo. Apesar de estarem a centenas de quilômetros das rochas vulcânicas

do Saara, os testes feitos revelaram uma rocha vulcânica característica nas duas conchas e que era bem diferente das rochas encontradas em regiões próximas, sugerindo que a água proveniente das montanhas vulcânicas da região do Saara seria a única fonte desta característica encontrada nas conchas.

Apesar de não estar claro qual rota seguiu, o *Homo sapiens* deixou a África há cerca de 100 mil anos, como sugerem os esqueletos que foram encontrados nos sítios arqueológicos de Es Skhul e Qafzeh, em Israel. Análises genéticas sugerem que as populações que hoje moram fora da África são descendentes de uma migração que se originou no leste do continente há cerca de 60 ou 70 mil anos. É provável que alguns desses pioneiros tivessem atravessado o mar Vermelho no estreito de Bab-el-Mandeb, o que os levou do Chifre da África (*Horn of Africa*) até a Península Arábica.

A possibilidade de novos estudos arqueológicos no Saara da Líbia, apesar de difícil e trabalhosa, irá trazer informações importantes da história humana entre centenas de milhares de anos passados.

Com o objetivo de entender a composição da população Líbia através de marcadores genéticos e produzir e parâmetros populacionais para emprego em banco de dados, coletamos material biológico de amostras desta região divididas em origem étnica Árabe e Berbere.

Neste trabalho, analisamos 15 marcadores de STR autossômicos em 55 amostras de indivíduos não relacionados, de 31 homens e 24 mulheres, nos quais comparamos a frequência de oito marcadores (D16S539, D18S51, D21S11, D3S1358, D8S1179, FGA, TH01 e vWA) com outras populações. Podemos sugerir que as populações geograficamente mais próximas e com mesma linguagem (África do Norte) são geneticamente semelhantes, devido ao fato de que estes marcadores,

que apresentam recombinação genética, podem ser utilizados na investigação da história recente de uma população. Além disso, estas informações de dados populacionais podem ser usadas como fonte de referência para cálculos estatísticos forenses da população Líbia. Não realizamos estudo entre os dois grupos étnicos, Árabes e Berberes, devido ao pequeno número de amostras analisadas com marcadores autossômicos (55), no entanto uma análise global se mostra informativa quando comparada a outras populações (Figura 8A & B).

A análise do cromossomo Y, considerando a posição geográfica e a história da Líbia, pode acrescentar informações ao perfil da distribuição dos haplótipos atuais em relação ao período de crescimento de sua população. Nosso trabalho com os marcadores STR de linhagem de cromossomo (Y-STR) em amostra da população da Líbia atual traz informação desta região do mundo nos últimos 1000 anos. Os 130 indivíduos distribuídos em dois grupos étnicos, Árabes e Berberes, foram tipados para STR do cromossomo Y. Observamos a duplicação no locus DYS19, resultando nos alelos 15/16, e no locus DYS439, representada pelos alelos 10/11. Estas duplicações são observadas em outras populações e apresentam frequências de $<0,05$ e $<0,0001$, respectivamente (www.yhrd.org). Duplicações de loci de sequências de repetição no cromossomo Y são conhecidas como no caso do marcador DYS385a/b. A duplicação DYS19, assim como deleções, foram anteriormente observadas (BALARESQUE *et al.*, 2009). Outras duplicações foram relatadas e algumas associadas com infertilidade masculina, como no locus DYS439 (Bosch, 2004). Em nossa amostras foram observadas em 2 loci em 2 amostras (DYS439 e DYS448). Butler e Schoske descreveram uma duplicação no locus DYS464 (BUTLER & SCHOSKE, 2004), em que ocorreram duplicações nas regiões franqueadoras onde os iniciadores da reação de PCR se anelam. Porém estes

dados são baseados em estudos em populações específicas, disponibilizados no Banco de Dados Referência (www.yhrd.org). Outros autores alertam para implicações decorrentes de duplicação nos loci DYS389II, DYS437 e DYS439, em relação a análises forenses em caso de mistura de material (DIEDERICHE *et al.*, 2005; GUSMÃO, *et al.*, 2005).

Encontramos microvariantes em DYS385a/b em 3 haplótipos diferentes (15.3/15.3; 16.3/16.3; 16.3/17.3). Microvariantes com estes haplótipos ainda não foram relatadas no Banco de Dados (www.yhrd.org), com exceção de 15.3/15.3 encontrado em 2 cromossomos entre 66312 haplótipos (<0,003%), em 490 populações (Sudeste da Europa e Sub-Saara). Até o presente doze haplótipos microvariantes foram relatados (14/16.3; 10/16.3; 12/16.3; 13/16.3; 12/15.3; 13/15.3; 14/15.3; 11/17.3; 13/17.3; 14/17.3; 15/17.3; 15.3/17.3) (www.yhrd.org).

Apesar de não termos utilizado marcadores bialélicos de linhagem de cromossomo Y, que traçam informações sobre ancestralidade mais antiga, nosso estudo evidencia tanto as distâncias entre as populações quanto as similaridades. Os Líbios Berberes e Líbios Árabes possuem mesmo posicionamento no gráfico de escala multidimensional, indicando que as duas amostras étnicas, sob a análise do cromossomo Y, não são diferentes.

Por outro lado, uma amostra da população da Líbia, publicada e não separada por etnia (IMMEL *et al.*, 2006), quando comparada com nossos dados mostra uma distância F_{st} muito próxima a dos Líbios Árabes (0,0034) e nenhuma com relação aos Líbios Berberes (Tabela 8). Esta população se posiciona no grupo das populações da África do Norte. No nosso estudo os pontos de coleta de materiais biológicos na Líbia ficavam geograficamente mais perto da Tunísia, Argélia e Marrocos do que do Egito, que fica a leste da Líbia. Nossos dados com os

marcadores de STR de Y refletem esta observação. Por outro lado, o Iêmen historicamente tem relações com Líbia pela migração de suas tribos para a região da África do Norte, após a invasão da força Árabe, e nossos dados corroboram esta aproximação genética ($F_{ST} = 0,0503/0,0714$ - Tabela 8). As populações do Marrocos (Mozabite, Saharawi e Marrocos Berberes do Sudeste) ficam agrupadas e separadas das outras populações estudadas.

Nossos achados confirmam a história do século VII, quando a força Árabe invadiu a região da África do Norte. A maioria dos homens Berberes escaparam na direção oeste, para Argélia e Marrocos. A conquista Árabe foi avançando até que os Berberes se refugiaram nas montanhas e deserto, se isolando como as tribos Mozabite e Saharawi (Figura 17). Portanto os marcadores STR de cromossomo Y sugerem que as tribos Mozabite e Saharawi, que moram no deserto, e os Berberes de Marrocos, (Berberes do Sudeste) ficaram mais isolados do que as populações do norte da África, incluindo os Líbios Berberes. Deste modo, podemos sugerir que as tribos Berberes, que permaneceram na região invadida pelos Árabes, são misturadas, uma vez que os homens Berberes do norte do Marrocos e Argélia, sob o comando de líderes Árabes, invadiram a Península Ibérica no século VIII (HITTI, 1990).

De acordo com a análise de marcadores STR do cromossomo Y a população da África Central e Mozambique ficaram no meio, entre os primeiros grupos (Líbios, Argélia, Egito, Itália, Espanha e Iêmen) e o grupo das populações da Turquia, Marrocos, Saharawi, Berberes de Sudeste e Mozabite. Historicamente, Itália e Espanha são relacionadas com as populações da África do Norte.

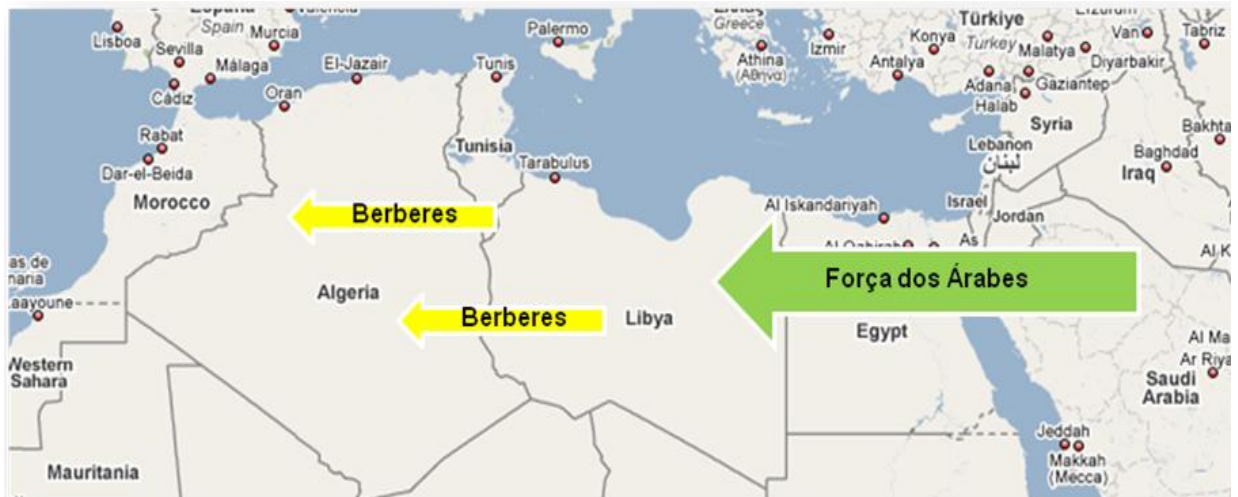


Figura 17. Mapa da África do Norte mostrando a invasão e avanço dos Árabes na direção de Morrocos utilizando a força dos Berberes.

Com objetivo de compreender a expansão das populações no Norte da África analisamos haplótipos de DNA mitocondrial dos Líbios Árabes e Berberes. Encontramos haplótipos (H, HV, J, K, pré HV, T, U e V) típicos de populações Européias, macrohaplogrupo L, de populações Africanas, e haplogrupos B e M encontrados em Asiáticos. Porém as distâncias genéticas medidas por F_{ST} entre os Líbios de origem Árabe e dos Berberes foi de 0,002, ou seja, são semelhantes. Estes resultados sugerem que não existe grande diferença entre os dois grupos étnicos na Líbia pela análise do DNA mitocondrial. No entanto essas diferenças observadas podem ser devidas a dominação Berbere na amostragem.

O estudo de González e cols. fornece evidência de que o haplogrupo M1 teve uma origem Asiática. A expansão do haplogrupo M1, a mais recente da África, ocorreu no noroeste. A propagação alcançou a Península Ibérica representado pelos Bascos (GONZÁLEZ, *et al.*, 2007). As linhagens M1 ocidentais e orientais participaram na colonização Neolítica do Saara. No ANEXO IV, a frequência do

haplogrupo M se apresentou elevada entre partes das populações da África do Norte; Líbios Berberes, Líbios Arabes, Argélia, Egito, Marrocos, Mozabite e Tunísia. No entanto, em outras populações Berberes, a frequência foi baixa. As populações do Sub-Saara, Sudão, Quênia e Etiópia também apresentaram uma alta frequência, assim como a Arábia Saudita e Iêmen. Geograficamente essas duas últimas populações ficam perto das populações do Sub-Saara, portanto, é sugerido que este haplogrupo tenha M1 para estabelecimento de sub-grupos.

Observamos que os grupos Berberes Mozabite e Saharawi ficaram isolados dos demais grupos da África do Norte, assim como a Arábia Saudita e Iêmen. As populações do norte da África de etnia Árabe, tais como Tunísia, Argélia, Marrocos e Líbia, situaram-se próximas e equidistantes dos Árabes e Berberes da África do Norte. Os Líbios Berberes estão mais próximos da população Árabe do Norte da África do que dos Berberes da mesma região. Desta forma as variações observadas dos haplótipos de DNA mitocondrial não revelaram uma identidade particular que os distingue entre os dois grupos étnicos. Interessante observar que o Egito fica entre os grupos da população da África do Norte e dos países Asiáticos (Arábia Saudita e Iêmen). Esta situação indica a participação do Egito na migração dos Árabes para o oeste Africano.

A distância genética medida por F_{ST} , entre os Líbios de origem Árabe e dos Berberes foi de 0,002, indicando que são semelhantes. A distância genética medida por F_{ST} de outras populações foram utilizadas para obtenção de um gráfico de escala multidimensional, onde observamos que os grupos Berberes, Mozabite e Saharawi ficam separados dos demais grupos da África do Norte, tais como a Arábia Saudita e Iêmen. Isto pode ser explicado por estarem, Mozabite e Saharawi, como um grupo mais isolado geograficamente na área do deserto do Saara.

A distância genética F_{ST} , de acordo com haplogrupos de DNA mitocondrial, maior é entre a população do Sudão e Quênia com a Península Ibérica (0,24). Isto pode ser um reflexo da distância geográfica e da história do Sudão, que teve domínio inglês. Os mais próximos são Marrocos e Berberes do Sul; Tunísia/Marrocos e Líbios Berberes; Iraque e Síria.

Ainda de acordo com haplogrupos de DNA mitocondrial, os países da África do Norte estão agrupados de modo que as populações Berberes estão mais próximas da Europa e as populações de conteúdo Árabe estão voltadas para Egito, Iêmen e Arábia Saudita e o restante da África.

Outros trabalhos devem ser realizados com outras populações de Berberes da Líbia da região de Zuara e de Gadamis, para melhor entender a relação entre as populações Berberes e Árabes da Líbia.

Nossos dados moleculares, juntamente com as evidências arqueológicas, (OSBORNE *et al.*, 2008) sugerem a participação da Líbia na migração humana da rota *Out of Africa*. Geograficamente, a posição central da Líbia a coloca como um corredor importante, que foi antigamente usado pelos homens para sair da África na direção da Europa, leste e oeste, especialmente naquela época em que a região não era árida.

7. Conclusão

Podemos listar os principais resultados e suas conclusões, obtidos de nosso trabalho:

- O primeiro Banco de Dados Genéticos das populações da Líbia foi iniciado com base no uso de marcadores moleculares.
- Sessenta e quatro (64) por cento dos haplótipos do cromossomo Y da população da Líbia foram únicos, não sendo encontrados em outras populações do mundo.
- As diferenças entre os Líbios Berberes e Líbios Árabes são linguísticas e culturais, mas não existem variações genéticas de acordo com os marcadores STR de cromossomo Y, haplogrupos de DNA mitocondrial.
- Os resultados dos marcadores de cromossomos autossômicos, cromossomo Y e mtDNA não indicam diferenças significativas entre as populações da África do Norte.
- O DNA mitocondrial dos dois grupos étnicos da Líbia (Árabe e Berbere) mostraram haplogrupos Europeu, Asiático e Africano, com frequência elevada dos haplogrupos Europeus.
- As frequências dos haplogrupos L (L0, L1, L2, L3 e L) na população da Líbia são mais altas quando comparadas com as populações da África do Norte e Européia.
- Nosso trabalho corrobora a noção de que a Líbia foi usada como corredor da expansão do homem moderno, ocorrida há mais de 60.000 anos, juntamente com o corredor *Horn of Africa* e o rio do Nilo.

6. Referências Bibliográficas

ABU-AMERO, KK., GONZÁLEZ, AM., LARRUGA, JM., BOSLEY, TM., CABRERA, VM..2007. Eurasian and African mitochondrial DNA influences in the Saudi Arabian population. *BMC Evol. Biol.*, 7: 32.

ALLARD MW, MILLER K, WILSON M, MONSON K., BUDOWLE B.; 2002. Characterization of the caucasian Haplogroups Present in the SWGDAM Forensic mtDNA Dataset for 1771 Human Control Region Sequences. *J Forensic Sci.*, 47:1-9.

ALLARD MW, POLANSKEY D, MILLER K, WILSON MR, MONSON KL, BUDOWLE B.; 2005. Characterization of human control region sequences of the African American SWGDAM forensic mtDNA data set. *Forensic Sci. Int.*, 148:169–179.

ALLARD MW, WILSON MR, MONSON KL., BUDOWLE B.; 2004. Control region sequences for East Asian individuals in the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods forensic mtDNA data set. *Legal Medicine*, 6:11–24.

ALTSCHUL, SF., GISH, W., MILLER, W., MEYERS, E.W., LIPMAN, D.J.; 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.*, 215:403-410.

ALVES, C., GUSMÃO, L., BARBOSA, J., AMORIM, A.; 2003. Evaluating the informative power of Y-STRs: a comparative study using European and new African haplotype data. *Forensic Sci. Int.*, 134: 126–133.

ANDERSON, S., BANKIER, AT., BARRELL, BG., DE BRUIJN, MHL., COULSON, AR., DROUIN, J., EPERON, IC., NIERLICH, DP., ROE, BA., SANGER, F., SCHREIER, PH., SMITH, AJH., STADEN, R., YOUNG, IG.; 1981. Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-464.

ANDREWS, RM., KUBACKA, I., CHINNERY, PF., LIGHTOWLERS, RN., TURNBULL, DM., HOWELL, N.; 1999.. Reanalysis and revision of the Cambridge Reference Sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23: 147.

ARROYO-PARDO, E., GUSMÃO, L., LÓPEZ-PARRA, AM., BAEZA, C., MESA, MS., AMORIM, A.; 2005. Genetic variability of 16 Y-chromosome STRs in a sample from Equatorial Guinea (Central Africa). *Forensic Sci. Int.*, 20;149(1):109-13.

AVISE, J.; 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard university Press, Cambridge, MA. (447 pp.).

BALARESQUE, P., PARKIN, EJ., ROEWER, L., CARVALHO-SILVA, DR., MITCHELL, RJ, VAN OORSCHOT, RA, HENKE, J., STONEKING, M., NASIDZE, I.,

WETTON, J., DE KNIJFF, P., TYLER-SMITH, C., JOBLING, MA.; 2009. Genomic complexity of the Y-STR DYS19: inversions, deletions and founder lineages carrying duplications. *Int. J Legal Med.*, 123(1):15-23.

BOSCH, E., CALAFELL, F., PEREZ-LEZAUN, A., COMAS, D., MATEU, E., BERTRANPETIT, J.; 1997. Population history of north Africa: evidence from classical genetic markers. *Human Biol.*, 69:295-311

BOSCH, E., CALAFELL, F., PÉREZ-LEZAUN, A., COMAS, D., IZAABEL, H., AKHAYAT, O., SEFIANI, A., HARITI, G., DUGOUJON, JM., BERTRANPETIT, J.; 2000. Y chromosome STR haplotypes in four populations from northwest Africa. *Int. J Legal Med.*, 114 :36–40.

BUDOWLE, B., ALLARD, MW., WILSON, MR., CHAKRABORTY, R.; 2003. Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annu Rev Genomics Hum. Genet.*, 4:119-141.

BUTLER, JM., SCHOSKE, R., VALLONE, PM., REDMAN, JW., KLINE, MC.; 2003. Allele frequencies for 15 autosomal STR loci on US Caucasian, African and Hispanic populations. *J Forensic Sci.*, 48(4).

BUTLER, JM. e SCHOSKE, R. ; 2004. Duplication of DYS19 flanking regions in other parts of the Y chromosome. *Int. J Legal Med.*, 118(3):178-83.

CAMPBELL, M C. e TISHKOFF S A.; 2008. African Genetic Diversity: Implications for Human Demographic History, Modern Human Origins, and Complex Disease Mapping. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9:403–33

CANN, RL. e WILSON, AC.; 1983 Length Mutations in Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, 104:99–711.

CANN, RL, STONEKING, M., WILSON, AC.; 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325:31-36.

CARDOSO, RL., NOGUEIRA, AR., SALIS, LH., URMÉNYI, TP., SILVA, R., MOURA-NETO, RS., PEREIRA, BB., RONDINELLI, E., SOUZA, E., SILVA, NA.; 2008. The association of ACE gene D/I polymorphism with cardiovascular risk factors in a population from Rio de Janeiro. *Braz. J Med. Biol. Res.*, 41(6):512-8.

CAVALLI-SFORZA, LL., MENOZZI, P., PIAZZA, A.; 1994. *The history and geography of human genes*. Princeton, Princeton University Press.

CAVALLI-SFORZA, LL.; 2003. *Genes, Povos e Línguas*. São Paulo: Companhia das Letras,

CAVALLI-SFORZA, LL.; 2007. Human Evolution and Its Relevance for Genetic Epidemiology. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.*, 8:1-15.

CHAKRABORTY, R. e RAO, C.R.; 1991. Measurement of genetic variation for evolutionary studies. *Handbook of statistics* Vol.8: 271-316..

CHERNI, L., PEREIRA, L., GOIOS, A., LOUESLATI, BY., KHIL, HK., GOMES, I., GUSMÃO, L., ALVES, C., SLAMA, A., AMORIM, A., ELGAAIED, AM.; 2005. Y-chromosomal STR haplotypes in three ethnic groups and one cosmopolitan population from Tunisia. *Forensic Sci. Int.*, 152: 95–99.

CIUNA, I., GUARNACCIA, M., GINESTRA, E., AGODI, A., PISCITELLO, D., SPITALERI, S., MARCÌ, G., PARAVIZZINI, G., TRAPANI, C., TRAVALI, S., SARAVO, L.; 2006. Allele frequencies for STR loci in a Sicilian population: Genetic prevalence and disequilibrium. *Int. Congress.Series*, 1288: 343– 345.

CROTEAU, DL., STIERUM, RH., BOHR, VA.; 1999. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutation Research*, 434:137-148.

CULLEN, M., MSLSDKY, M., HARDING, A., CARRINGTON, M.; 2003. High-density map of short tandem repeats across the human major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 54:900-910.

CURRAT M, e EXCOFFIER L.; 2004. Modern humans did not admix with Neanderthals during their range expansion into Europe. *PLoS Biology*, 2:2264–2274.

DIEDERICHE M., MARTÍN P., AMORIM A., CORTE-REAL F., GUSMÃO L.; 2005. A case of double alleles at three Y-STR loci: forensic implications. *Int. J Legal Med.*, 119(4):223-225.

DÖNBAK, L., BAJANOWSKI, T., BRINKMANN, B., HOHOFF, C.; 2006. Y-STR haplotypes in populations from the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Int. J Legal Med.*, 120: 395–396.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S.; 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.

FADHLAOUI-ZID, K., PLAZA, S., CALAFELL, F., BEN AMOR, M., COMAS, D., EL GAALED, B.; 2004. Mitochondrial DNA Heterogeneity in Tunisian Berbers, *Annals of Human Genetics*, 68, 222-233.

FAGUNDES, NJ., KANITZ, R., ECKERT, R., VALLS, AC., BOGO, MR., SALZANO, FM., SMITH, DG., SILVA, WA., JR, ZAGO, MA., RIBEIRO-DOS-SANTOS, AK., SANTOS, SE., PETZL-ERLER, ML., BONATTO SL.; 2008. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am. J Hum. Genet.*, 82(3):583-92.

FOISSAC, A., CROUAU-ROY, B., FAUR, S., THOMSEN, M., CAMBON-THOMSEN, A.; 1997. Microsatellites in the HLA region: an overview. *Tissue Antigens*, 49:197-214.

FOISSAC, A., SALHI, M., CAMBON-THOMSEN, A.; 2000. Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens*, 55:477-509.

FORSTER, P., e MATSUMURA, S.; 2005. Did Early Human Go North or South. *Science*, 38:965-966.

GOLDSTEIN, DB., e CHIKHI, L., 2002. Human migrations and population structure: what we know and why it matters. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 3:129-52.

GONZÁLEZ, AM., LARRUGA, JM., ABU-AMERO, KK., SHI, Y., PESTANO, J., CABRERA, VM.; 2007. Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa. *BMC Genomics*, 9;8:223.

GREENBERG, BD., NEWBOLD, JE., SUGINO, A.; 1983. Intraspecific nucleotide variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*, 31: 33-49.

GUSMÃO L, SÁNCHEZ-DIZ P, CALAFELL F, *et al.* 2005. Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites. *Hum. Mutat.*, 26(6):520-8.

HARPENDING, H. e ROGERS A.; 2000. Genetic perspectives on human origins and differentiation. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, 1:361–385.

HARTL, DL. e CLARK, AG.; 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates (3a ed.). Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 3ed. P. 122.

HISCOCK, P.; 1996. Transformations of Upper Palaeolithic implements in the Dabba industry from Haua Fteah (Libya). *Antiquity*, 70:657-664.

HITTI, PK. 1990. *The Arabs: A Short History*. Washington, DC: Gateway Editions.

HURLES, ME., DERMITZAKIS, ET., TYLER-SMITH, C.; 2008. The functional impact of structural variation in humans. *Trends Genet.*, 24(5):238-45.

HUTCHISON, CA., NEWBOLD, JE., POTTER, SS., EDGELL, MH.; 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251:536-538

IMMEL, U.-D.; ERHUMA, M.; MUSTAFA, T.; KLEIBER, M.; KLINTSCHAR, M. 2006. Population genetic analysis in a Libyan population using the PowerPlex 16 system. *Int. Congress.Series*, 1288:421-423.

IMMEL, U.-D.; KLEIBER, M.; KLINTSCHAR, M.; 2004. Y-chromosomal STR haplotypes in an Arab population from Yemen. *Int. Congress.Series*, 1261:340-343

INGMAN, M., KAESSMANN, H., PAABO, S., GYLLENSTEN, U.; 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408:708-13.

ISENBERG, AR., e MOORE, JM.; 1999. Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory. *Forensic Science Commun.*, 1(2):1-10.

JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L.; 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314, 67-73

JOBLING, MA., e TYLER-SMITH, C.; 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature*; 4:598-612.

KEYEUX, G., RODAS, C., GELVEZ, N., CARTER, D.; 2002. Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian populations. *Hum. Biol.*, 74(2):211-33.

KLINTSCHAR, M., AL-HAMMADI, N., REICHENPFADER, B.; 1999. Population genetics studies in the tetrameric short tandem repeat loci D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D12S11, D18S51, D5S818, D13S317 and D7S820 in Egypt. *Forensic Science Int.*, 104:23-31.

KNIGHT, A., UNDERHILL, PA., MORTENSEN, HM., ZHIVOTOVSKY, LA., LIN, AA., HENN, BM., LOUIS, D., RUHLEN, M., MOUNTAIN, JL.; (2003). African Y

chromosome and mtDNA divergence provides insight into the history of click languages. *Curr. Biol.*, 13:464–473

KUNKEL, TA., e LOEB LA.; 1981. Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science*, 213:765-767.

LEWIS, PO. e ZAYKIN, D.; 2001. GDA – Genetic data analysis: Version 1.1for Windows95/NT. Albuquerque: university of New Mexico. Free program distributed by the authors from <http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>.

LINDAHL, T. e NYBERG, B.; 1972. Rate of depurination of native desoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11:3610-3618.

LIU, H., PRUGNOLLE, F., MANICA, A., BALLOUX, F.; 2002. A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12(6):675-82.

MAHFOUDH-LAHIANI, N., REBAI, A., MAKNI, H.; 2006. Data for 10 autosomal STR markers in south Tunisian population. *Forensic Forensic Sci. Int.*, 164:254–256

METZ H. C., ed. 1987. *Libya: A Country Study*. Washington: GPO for the Library of Congress.

MEYER, S., WEIS, G., HAESELER, A.; (1999) Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics* 152:1103-1110.

MILLER, SA., DYKES, DD., POLESKY, HF.; 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16(3):1215.

MISHMAR, D., RUIZ-PESINI, E., GOLIK, P., MACAULAY, V., CLARK, AG., HOSSEINI, S., BRANDON, M., EASLEY, K., CHEN, E., BROWN, MD., SUKERNIK, RI., OLCKERS, A., WALLACE, DC.; 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:171-176.

NEI, M.; 1972. Genetic Distance between populations. *Amer.Nat.* 106:283-292.

NEI, M., e TAJIMA, F.; 1981. Genetic Drift and Estimation of Effective Population Size. *Genetics*. 98(3):625-640.

OMRAN, GA., RUTTY, GN., JOBLING, MA.; 2008. Diversity of 17-locus Y-STR. haplotypes in Upper (Southern) Egyptians. *Forensic Sci. Int.: Genetics Supplement*

Series. 1: 230-232.

OMRAN, GA., RUTTY, GN., JOBLING, MA.; 2009. Genetic variation of 15 autosomal STR loci in Upper (Southern) Egyptians. *Forensic Sci. Int.: Genetics*, 3 e39–e44

OSBORNE, AH., VANCE, D., ROHLING, EJ., BARTON, N., ROGERSON, M., FELLO, N.; 2008. Ahamid corridor across the Sahara for the migration of early modern humans out of Africa 120,000 years ago. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(43):16444-16447.

OTTO PG., OTTO PA., FROTA-PESSOA O. 1998. *Genética Humana e Clínica*. 1ª Edição. São Paulo (SP): Editora Roca.

PASCALI, VI., DOBOSZ, M., BRINKMAN, B.; 1999. Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts. *Int. J Legal Med.*, 112 (1):1.

PENA, SD.J. E BORTOLINI, MC.; 2004. Pode a genética definir quem deve se beneficiar das cotas universitárias e demais ações afirmativas? *Estud. av.* 18(50).

PLAZA, S., CALAFELL, F., HELAL, A., BOUZERNA, N., LEFRANCE, G., BERTRANPETIT, J., COMAS, D.; 2003. Joining the Pillars of Hercules: mtDNA Sequences Show Multidirectional Gene Flow in the Western Mediterranean. *Annl. Hum. Genet.*, 67(4):312-328.

PORTIN, P. 2007. Evolution of man in the light of molecular genetics: a review. Part I. Our evolutionary history and genomes. *Hereditas*, 144(3):80-95.

RANDO, JC., PINTO, F., GONZALEZ, AM., HERNAINDEZ, M., LARRUGA, M., CABRERA.; 1998. Mitochondrial DNA analysis of Northwest Africa populations reveals genetic exchanges with European, Near-Eastern, and sub-Saharan populations. *Ann. Hum. Genet.*, 62(Pt 6): 531-550

REYES, A., GISSI, C., PESOLE, G., SACCONI, C.; 1998. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. *Mol. Biol. Evol.*, 15:957-966.

RICCI, U., SANI, I., GIOVANNUCCI UZIELLI, ML.; 2001. Y-chromosomal STR haplotype in Tuscany (central Italy). *Forensic Sci. Int.*, 120: 210-212.

ROBINO, C., CROBU, F., DI GAETANO, C., BEKADA, A., BENHAMAMOUCH, S., CERUTTI, N., PIAZZA, A., INTURRI, S., TORRE, C.; 2008. Analysis of Y-chromosomal SNP haplogroups and STR haplotypes in an Algerian population sample. *Int. J Legal Med.*, 122(3):251-5.

RUIZ-PESINI, E., MISHMAR, D., BRANDON, M., PROCACCIO, V., WALLACE DC.; 2004. Effects of Purifying and Adaptive Selection on Regional Variation in Human mtDNA. *Science*, 303:223-226.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS T.; 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NW.

SÁNCHEZ, C., BARROT, AC., XIFRO, AA., ORTEGA, AM., A, I. GÓMEZ DE ARANDA, AI., HUGUET, BE., CORBELLA, AJ., GENE, AM.; 2007. Haplotype frequencies of 16 Y-chromosome STR loci in the Barcelona metropolitan area population using Y-Filer™ kit. *Forensic Sci. Int.*, 172:211–217.

SÁNCHEZ-DIZ, P., MENOUNOS, PG., CARRACEDO, A., SKITSA, I.; 2008. 16 STR data of a Greek population. *Forensic Sci. Int.: Genetics 2*: e71–e72.

SANTOS, FR., PANDYA, A., TYLER-SMITH, C., PENA, SDJ., SCHNFÍELD, M., LEONARD, WR., OSIPOVA, L., CRAWFORD, MH., E MITCHELL, RJ.; 1999. Central Siberian Origin for Native American Y Chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 64:619-628,

SCHAFFNER, SF. 2004. The X chromosome in population genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5(1): 43-51

SILVA, R., e MOURA-NETO, R.; 2004 Genetic diversity and admixture data on 11 STRs (F13B, TPOX, CSF1PO, F13A01, D7S820,LPL, TH01, vWA, D13S317, FESFPS, and D16S539) in a sample of Rio de Janeiro european-descendants population, Brazil. *Forensic Sci. Int.*, 142:51-53.

STARK AE.; 2005. The Hardy-Weinberg principle. *Genetics and molecular biology*.38(3): 485-485.

TORRONI, A., BANDELT, HJ.,MACAULAY, V.,RICHARDS,M., CRUCIANI,F., RENGO, C., MARTINEZ-CABRERA, V., VILLEMS,R., KIVISILD,T., METSPALU,E.,PARIK, J.,TOLK, HV.,TAMBETS,K., FORSTER,P., KARGER,B., FRANCALACCI, P., RUDAN, P., JANICIJEVIC, B., RICKARDS, O., SAVONTAUS,ML., HUOPONEN,K., LAITINEN,V., KOIVUMÄKI, S., SYKES, B., HICKEY, E., NOVELLETTO, A., MORAL, P., SELLITTO, D., COPPA, A., AL-ZAHERI, N., SANTACHIARA-BENERECETTI, AS.,1 ORNELLA SEMINO, O., SCOZZARI, R.; 2001. A Signal, from Human mtDNA, of Postglacial Recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 69:844–852

TORRONI, A., HUOPONEN, K., FRANCALACCI, P., PETROZZI, M., MORELLI, L., SCOZZARI, R., OBINU, D., SAVONTAUS, ML., WALLACE, DC.; 1996. Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations. *Genetics*, 144:1835-1850.

UPHOLT, WB., e DAWID, IB.; 1977. Mapping of mtDNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region. *Cell*,11:571-583.

VILLARD H. S., 1956. *Libya: the New Arab Kingdom of North Africa*. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY

VOGEL, F., e MOTULSKY AG.; 1997. *Human genetics, problems and approaches* (3a ed.). Springer-Verlag, Heidelberg, 684.

WALLACE DC.; 1992. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 61:1175.

WALLACE DC.; 2005. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu. Rev. Genet.*, 39:359-407.

WALLACE, DC., BROWN, MD., LOTT, MT.; 1999 Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*, 238:211-230.

WILSON MR., POLANSKEYM D., BUTLERM J., DIZINNO, JA., REPLOGLEM, J., BUDOWLE B.; 1995. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques*,18:662-669.

YAKES, MF., VAN HOUTEN, B.; 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:514-519.

ZHIVOTOVSKY, LA., UNDERHILL, PA., CINNIUGLU, C., KAYSER, M., MORAR, B., KIVISILD, T., SCOZZARI, R., CRUCIANI, F., DESTRO-BISOL, G., SPEDINI, G., CHAMBERS, GK., HERRERA, RJ., YONG, KK., GRESHAM, D., TOURNEV, I., FELDMAN, MW., KALAYDJIEVA, L.; 2004 The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time. *Am. J Hum. Genet.*, 74(1):50-61.

ANEXO I

Tabela de frequências alélicas dos STR autossômicos das populações do Líbia, Egito, Tunísia, Grécia e Itália

Alelo	D18S51					D16S539					D8S1179					TH01				
	Líbia	Egito	Tunísia	Grécia	Itália	Líbia	Egito	Tunísia	Grécia	Itália	Líbia	Egito	Tunísia	Grécia	Itália	Líbia	Egito	Tunísia	Grécia	Itália
5																0,000	0,000	0,000	0,002	0,001
6																0,231	0,206	0,244	0,263	0,269
7						0,000	0,000	0,000	0,002	0,000						0,250	0,204	0,241	0,140	0,143
8	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,021	0,036	0,035	0,027	0,037	0,000	0,015	0,007	0,022	0,011	0,139	0,115	0,154	0,166	0,089
9	0,009	0,000	0,000	0,000	0,002	0,135	0,151	0,100	0,135	0,167	0,000	0,006	0,007	0,008	0,020	0,287	0,374	0,221	0,192	0,254
9.3																0,065	0,081	0,095	0,222	0,227
10	0,000	0,002	0,007	0,003	0,008	0,094	0,104	0,052	0,087	0,085	0,020	0,057	0,052	0,089	0,085	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
10.2	0,000	0,002	0,005	0,000	0,000															
10.3																0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
11	0,019	0,008	0,010	0,034	0,016	0,344	0,268	0,356	0,284	0,306	0,127	0,108	0,095	0,060	0,086					
11.2	0,000	0,009	0,010	0,000	0,000															
12	0,148	0,166	0,104	0,141	0,155	0,271	0,255	0,241	0,284	0,246	0,118	0,111	0,144	0,112	0,107					
12.2	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000															
13	0,130	0,104	0,142	0,164	0,154	0,115	0,162	0,182	0,154	0,146	0,206	0,208	0,216	0,298	0,257					
13.2	0,009	0,002	0,000	0,000	0,001															
14	0,130	0,128	0,095	0,171	0,179	0,010	0,025	0,035	0,022	0,013	0,304	0,243	0,226	0,197	0,214					
14.2	0,000	0,002	0,002	0,000	0,000															
15	0,185	0,128	0,164	0,101	0,128	0,010	0,000	0,000	0,005	0,000	0,206	0,191	0,154	0,161	0,182					
15.2	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000															
16	0,130	0,134	0,177	0,134	0,129						0,020	0,046	0,075	0,042	0,036					
16.2	0,000	0,002	0,000	0,000	0,001															
17	0,111	0,102	0,080	0,122	0,086						0,000	0,011	0,017	0,008	0,002					
17.2	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000															
18	0,074	0,074	0,090	0,067	0,082						0,000	0,004	0,005	0,003	0,000					
18.2	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000															
19	0,046	0,062	0,067	0,034	0,029															
20	0,000	0,030	0,020	0,015	0,019															
21	0,000	0,026	0,020	0,003	0,002															
22	0,009	0,008	0,007	0,007	0,001															
23	0,000	0,000	0,000	0,002	0,008															
24	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000															
n	108	530	402	596	880	96	530	402	598	880	102	530	402	596	880	108	530	402	598	880

ANEXO I, CONTINUAÇÃO

FGA																										
ALELO	15	16,1	17	18	19	19,2	20	20,2	21	21,2	22	22,2	22,3	23	23,2	24	24,2	25	25,2	26	27	28	29	30	30,2	N
LÍBIA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,010	0,125	0,000	0,173	0,000	0,212	0,000	0,000	0,240	0,000	0,115	0,010	0,048	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	104
EGITO ¹	0,000	0,002	0,002	0,011	0,049	0,000	0,077	0,004	0,134	0,004	0,193	0,006	0,002	0,158	0,002	0,157	0,000	0,098	0,000	0,057	0,023	0,015	0,006	0,000	0,000	530
TUNÍSIA ²	0,000	0,000	0,002	0,002	0,062	0,000	0,092	0,000	0,169	0,002	0,149	0,000	0,000	0,182	0,000	0,162	0,000	0,095	0,000	0,050	0,005	0,020	0,000	0,005	0,002	402
GRÉCIA ³	0,000	0,000	0,002	0,010	0,062	0,000	0,091	0,002	0,208	0,005	0,193	0,008	0,000	0,159	0,008	0,117	0,002	0,101	0,002	0,027	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	596
ITÁLIA ⁴	0,003	0,000	0,000	0,013	0,064	0,000	0,095	0,000	0,163	0,000	0,175	0,013	0,000	0,169	0,000	0,169	0,000	0,086	0,000	0,038	0,003	0,006	0,003	0,000	0,000	314

D21S11																									
ALELO	24	24,2	25	25,2	26	27	28	28,2	29	29,2	30	30,2	31	31,2	32	32,2	33	33,2	34	34,2	35	36	37	38	N
LÍBIA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,111	0,000	0,213	0,000	0,204	0,000	0,056	0,148	0,019	0,139	0,000	0,065	0,000	0,009	0,009	0,009	0,000	0,000	108
EGITO ¹	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,036	0,123	0,004	0,268	0,002	0,243	0,013	0,047	0,089	0,004	0,106	0,002	0,040	0,004	0,006	0,006	0,002	0,002	0,002	530
TUNÍSIA ²	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,035	0,127	0,000	0,241	0,000	0,234	0,010	0,092	0,077	0,032	0,082	0,005	0,045	0,005	0,007	0,005	0,000	0,000	0,000	402
GRÉCIA ³	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,039	0,119	0,000	0,267	0,002	0,186	0,037	0,044	0,144	0,007	0,111	0,000	0,039	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	596
ITÁLIA ⁴	0,000	0,000	0,002	0,000	0,003	0,035	0,124	0,015	0,205	0,016	0,221	0,036	0,065	0,091	0,032	0,094	0,019	0,038	0,003	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	880

D3S1358										
ALELO	12	13	14	15	16	17	18	19	20	N
LÍBIA	0,009	0,000	0,055	0,218	0,373	0,245	0,073	0,027	0,000	110
EGITO ¹	0,000	0,006	0,072	0,306	0,262	0,228	0,117	0,009	0,000	530
TUNÍSIA ²	0,000	0,002	0,060	0,306	0,294	0,214	0,104	0,020	0,000	402
GRÉCIA ³	0,000	0,002	0,077	0,267	0,248	0,232	0,156	0,015	0,003	596
ITÁLIA ⁴	0,000	0,004	0,066	0,241	0,255	0,277	0,138	0,019	0,000	880

vWA															
ALELO	8	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	N
LÍBIA	0,000	0,000	0,000	0,010	0,096	0,183	0,268	0,202	0,183	0,048	0,010	0,000	0,000	0,000	104
EGITO ¹	0,000	0,000	0,000	0,002	0,087	0,104	0,292	0,272	0,164	0,066	0,013	0,000	0,000	0,000	530
TUNÍSIA ²	0,000	0,000	0,000	0,002	0,107	0,109	0,281	0,246	0,154	0,062	0,032	0,005	0,002	0,000	402
GRÉCIA ³	0,000	0,000	0,000	0,005	0,106	0,097	0,200	0,303	0,185	0,086	0,018	0,000	0,000	0,000	596
ITÁLIA ⁴	0,001	0,001	0,001	0,000	0,078	0,093	0,219	0,328	0,179	0,082	0,017	0,000	0,000	0,001	880

N, Números de cromossomos; ¹Omran *et al*, 2008; ²Mahfoudh-Lahiani *et al*, 2006; ³Sánchez-Diz *et al* 2008; ⁴Ciuna *et al*, 2006

ANEXO II

**Tabela de genótipos de marcadores do cromossomo Y obtidos com o kit *Amp FISTR Y-Filer*
(Applied Biosystems)**

No.	Amostra	DYS 19	DYS 389 I	DYS 389II	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 385a/b	DYS 438	DYS 439	DYS 437	DYS 456	DYS 458	DYS 635	GATA- H4	DYS 448
1.	R01	13	13	29	24	09	11	13	13/15	10	10	14	16	19	21	12	20
2.	R05	13	14	30	24	10	11	13	13/14	10	10	14	16	18	21	11	19
3.	R12	13	13	29	24	12	11	13	13/13	10	10	-	16	17	21	12	20
4.	R13	14	13	30	22	11	11	08	13/20	10	11	14	13	18.2	21	11	20
5.	R16	13	12	29	23	10	11	13	16/18	10	10	14	15	14	21	12	20
6.	R17	14	13	30	22	11	11	12	13/19	10	11	14	14	18.2	21	11	20
7.	R20	13	14	30	24	09	11	13	12/15	10	10	14	14	18	21	11	20
8.	R45	13	14	30	24	09	10	13	13/15	10	10	14	15	17	20	12	20
9.	R46	14	13	30	23	11	11	12	13/19	10	11	14	14	20	21	11	20
10.	R59	15/16	13	32	24	09	11	13	13/16	10	12	16	15	17	21	12	19
11.	R65	13	13	32	22	09	11	13	14/15	10	13	13	16	16	21	11	21
12.	R67	15	12	29	21	09	11	12	12/12	10	11	16	15	18	20	12	19
13.	R68	14	13	27	25	12	11	12	13/13	11	11	14	14	-	21	11	20
14.	R69	15	12	30	25	09	11	14	11/16	11	11	14	15	16	23	12	20
15.	R70	13	13	29	24	09	11	13	13/14	10	10	14	15	18	21	12	20
16.	R75	15	13	30	24	10	11	13	17/19	10	12	14	14	16	22	09	20
17.	R81	15	14	31	23	10	11	13	11/11	10	11	15	14	19	-	11	22
18.	R89	15	13	31	24	10	11	13	10/11	10	11	15	13	18	-	11	22
19.	R92	14	13	27	22	10	10	11	17/17	10	11	14	15	19	21	11	-
20.	R99	15	14	30	24	11	13	13	13/14	10	14	14	17	17	23	11	19
21.	R107	14	10	32	23	10	14	13	13/17	09	11	14	15	18	22	13	19/20
22.	A10	13	12	28	24	10	11	13	13/15	10	11	14	16	18	21	12	20
23.	A12	13	12	30	24	10	11	13	17/19	10	10	14	14	14	23	11	20
24.	A15	15	13	29	24	11	13	13	13/15	12	13	15	17	19	23	12	19

No.	Amostra	DYS 19	DYS 389 I	DYS 389II	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 385a/b	DYS 438	DYS 439	DYS 437	DYS 456	DYS 458	DYS 635	GATA-H4	DYS 448
25.	A16	14	13	30	25	09	12	13	17/18	10	12	14	15	15	21	12	19
26.	A17	15	14	30	23	10	10	14	14/20	11	12	16	15	19	26	12	19
27.	A21	14	14	31	22	11	11	12	13/19	10	11	14	14	18.2	21	11	20
28.	A22	13	12	29	23	10	11	13	17/18	10	10	14	15	14	21	11	20
29.	A24	15	12	29	22	11	11	14	12/16	10	11	16	17	16	21	12	21
30.	A26	14	13	30	23	11	11	12	13/19	10	11	14	14	18.2	21	11	20
31.	A27	15	12	30	23	10	11	14	13/15	10	11	15	14	17	21	11	20
32.	A30	15	13	31	24	10	11	13	11/11	10	11	14	14	18	23	11	21
33.	A33	13	14	30	24	09	11	13	12/13	10	11	14	16	18	22	12	20
34.	A39	13	13	29	24	09	11	13	13/17	10	10	14	15	18	21	12	20
35.	A40	15	13	29	24	09	11*	12	13/17	10	10/11	14	15	18	21	11	20
36.	A41	13	14	30	24	09	11	13	13/15	10	10	14	16	17	21	12	20
37.	A42	13	12	30	25	10	11	13	17/19	11	10	14	15	14	22	11	20
38.	A44	14	13	29	22	11	11	12	13/19	10	11	14	14	18	21	11	20
39.	A45	14	12	29	24	11	11	12	13/20	10	11	14	14	18.2	21	11	20
40.	A52	13	13	29	24	09	11	13	13/15	10	10	14	16	17	21	12	20

Microvariantes no locus DYS458 (alelo 18.2) em 5 indivíduos em R13, R17, A21, A26 e A45;

Duplicações em 3 locais: DYS19 (15/16) na amostra R58; DYS448 (19/20) na amostra R107; DYS439 (10/11) em amostra A40.

* (asterisco) Indica que falhou a detecção do locus com os primers do kits, e que o mesmo foi determinado por pares de primers específicos em reação monoplex de PCR, os produtos foram visualizados em gel de acrilaminada corados com prata. Os produtos de PCR foram então seqüenciados para confirmação do número de repetição dos alelos (materiais e métodos).

ANEXO III

Tabela de genótipos do cromossomo Y obtidos com o kit *PowerPlex Y (Promega)*

No.	Amostra	DYS 19	DYS 389I	DYS 389II	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 385a/b	DYS 438	DYS 439	DYS 437
1.	R03	13	12	29	24	11	11	13	18/19	10	10	-
2.	R06	15	12	29	25	10	11	12	14/15	09	10	15
3.	R15	15	13	29	24	11	13	13	13/13	12	13	-
4.	R48	17	13	30	21	10	11	13	17/18	11	13	14
5.	R95	16	12	30	21	10	11	13	14/18	11	12	-
6.	L01	15	12	29	23	10	11	13	17/18	10	10	14
7.	L02	13	13	31	25	10	12	13	16/16	10	14	14
8.	L03	13	13	31	25	10	12	13	16/16	10	14	14
9.	L04	14	13	29	25	11	13	12	11/14	12	12	15
10.	L06	13	14	30	24	09	11	13	13/15	10	10	14
11.	L07	13	14	30	24	09	11	13	13/15	10	10	14
12.	L10	13	14	30	23	10	11	13	12/12	10	11	14
13.	L12	14	13	30	23	11	11	12	13/20	10	11	14
14.	L14	13	13	29	24	09	11	13	13/15	10	11	14
15.	L15	13	14	30	24	09	11	13	13/13	10	10	14
16.	L16	14	13	30	23	09	14	13	15/17	09	12	14
17.	L18	14	12	29	25	09	12	13	17/18	10	13	14
18.	L19	14	12	28	23	10	11	13	17/18	10	10	14
19.	L21	14	13	30	22	11	11	12	13/18	10	11	14
20.	L22	13	14	30	23	09	11	13	12/15	10	11	14
21.	L23	14	13	30	23	10	11	12	14/21	09	13	15
22.	L28	15	12	30	23	10	11	14	13/14	10	12	16
23.	L29	13	14	30	24	09	11	13	13/15	10	10	14
24.	L34	13	14	30	24	09	11	13	13/15	10	10	14

No.	Amostra	DYS 19	DYS 389I	DYS 389II	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 385a/b	DYS 438	DYS 439	DYS 437
25.	L37	13	14	30	24	09	11	13	13/14	10	10	14
26.	L38	14	11	27	22	10	10	14	15/18	10	12	16
27.	L39	15	12	28	-	09	-	12	14/14	09	11	14
28.	L40	14	13	30	22	10	11	12	13/19	10	11	14
29.	L41	13	12	29	23	10	11	13	17/18	10	10	14
30.	L52	14	12	28	25	11	13	13	11/14	11	11	15
31.	L54	16	14	30	23	11	13	13	13/13	13	12	14
32.	L55	15	12	29	23	10	11	13	17/18	10	10	14
33.	L72	13	14	30	24	09	11	13	13/14	10	10	14
34.	L78	14	13	31	22	11	11	12	14/14	10	11	14
35.	L81	14	13	30	22	11	11	12	13/19	10	11	13
36.	L83	14	13	31	22	11	11	12	13/19	10	11	14
37.	L89	14	13	30	23	10	11	12	12/18	10	12	14
38.	L117	14	13	29	22	11	12	12	13/19	10	11	14
39.	L119	13	14	30	23	09	11	13	13/14	10	10	14
40.	L122	13	13	29	24	09	11	13	13/16	10	10	14
41.	L124	13	14	30	24	09	11	13	13/14	10	10	14
42.	L126	13	14	30	24	10	11	13	13/15	10	10	14
43.	L128	16	13	30	21	10	11	14	16/18	10	11	14
44.	L131	16	12	29	25	10	08	12	14/15	09	10	15
45.	L132	14	13	30	23	11	11	12	13/19	10	11	14
46.	L134	14	13	30	22	11	11	12	13/19	10	11	14
47.	L136	13	13	29	24	09	11	13	13/14	10	10	14
48.	L140	15	13	30	23	10	11	15	15/17	11	10	14
49.	L141	13	14	30	24	09	11	13	13/15	10	10	14
50.	L145	13	13	30	24	11	12	13	13/15	10	10	14
51.	L156	15	13	30	21	10	11	13	15/17	11	12	14
52.	L157	14	12	29	23	10	07	13	17/18	10	10	14
53.	L160	14	13	30	22	10	11	12	13/19	10	11	14

No.	Amostra	DYS 19	DYS 389I	DYS 389II	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 385a/b	DYS 438	DYS 439	DYS 437
54.	L164	14	13	30	22	11	11	12	13/19	10	11	14
55.	L165	13	14	30	24	09	11	13	13/15	10	10	14
56.	L168	14	13	31	22	11	11	12	13/19	10	11	14
57.	L171	14	13	30	24	11	11	12	13/19	10	11	-
58.	L177	13	13	29	24	09	11	13	13/15	10	10	14
59.	L178	14	13	30	23	11	11	12	13/19	10	11	14
60.	L181	13	14	30	24	09	11	13	13/14	09	10	-
61.	L186	14	13	29	23	10	10	12	14/19	09	11	-
62.	L195	13	12	29	24	10	11	13	17/19	10	10	14
63.	L196	15	12	29	25	10	11	12	14/15	09	10	15
64.	L198	15	12	29	23	10	11	13	17/18	10	10	14
65.	L211	13	12	29	23	10	11	13	17/18	10	11	14
66.	L212	14	13	30	23	11	11	12	13/19	10	14	14
67.	L216	13	12	29	23	10	11	13	17/17	10	11	13
68.	LB01	14	14	31	24	10	13	13	11/14	12	13	-
69.	LB02	16	12	29	21	10	11	14	12/12	10	11	16
70.	LB03	15*	14	31	21	10	11*	13	14/17	11	12	14
71.	LB05	13	13	29	24	09	11	13	13/14	10	10	-
72.	LB06	14	13	30	22	11	11	12	13/19	10	11	15
73.	LB07	14	13	29	22	11	11	12	13/19	10	11	15
74.	LB08	15	13	25	23	11	11*	16	09/11	12	11	-
75.	LB09	16	14	30	24	11	12	14	13/13	11	13	-
76.	LB10	13	13	32	25	10	12	13	15.3/15.3	10	13	-
77.	LB11	14	13	30	22	12	11	08	12/12	10	11	14
78.	LB14	16	12	28	21	10	11	14	13/15	10	11	-
79.	LB17	13	14	30	24	09	11	12	13/14	10	-	14
80.	LB18	14*	13	30	22	11	11*	11	13/13	10	11	14
81.	LB22	13	14	30	25	09	11	07	14/15	10	13	-
82.	LB23	14	13	31	25	10	11	13	16/19	10	11	14

No.	Amostra	DYS 19	DYS 389I	DYS 389II	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 385a/b	DYS 438	DYS 439	DYS 437
83.												
84.	LB24	14	13	30	23	11	11	12	13/19	10	11	-
85.	LB25	13	14	30	24	09	11	13	13/14	10	10	-
86.	LB26	13	13	29	24	09	11	13	13/14	10	10	-
87.	LB27	14	12	29	23	10	11	13	16.3/17.3	10	10	-
88.	LB28	14	13	30	22	11	11	12	13/19	10	11	14
89.	LB29	13	14	30	24	09	11	13	13/14	10	11	-
90.	LB30	15	14	30	21	10	11	12	11/12	10	11	-
91.	LB31	13	14	30	24	09	11	13	12/15	10	10	-
92.	LB32	13	13	29	24	09	11	13	13/14	10	10	-

* (asterisco) Indica que falhou a detecção do locus com os primers do kits, e que o mesmo foi determinado por pares de primers específicos em reação monoplex de PCR, os produtos foram visualizados em gel de acrilaminada corados com prata. Os produtos de PCR de cada amostra foram então seqüenciados para confirmação do número de repetição dos alelos (materiais e métodos).

ANEXO IV

Frequência dos Haplogrupos de mtDNA das populações e grupos étnicos (Árabes e Berberes) da África do Norte.

Pop.	Líbia (Árabes)	Líbia (Berberes)	Líbia	Argélia	Marrocos	Marroquinos (Berberes)	Mozabites	Saharawi	Marrocos (Berberes/Sul)	Tunísia
(n)	(92)	(62)	(154)	(47)	(50)	(64)	(85)	(56)	(50)	(47)
H	0,163	0,243	0,195	0,340	0,260	0,422	0,247	0,179	0,320	0,234
K	0,044	0,048	0,046	0,042	0,040	0,078	0,000	0,071	0,020	0,064
J	0,054	0,016	0,039	0,128	0,040	0,094	0,035	0,000	0,100	0,042
J1	0,054	0,048	0,052	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
J/T	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000
V	0,065	0,016	0,045	0,000	0,040	0,062	0,082	0,179	0,100	0,000
U3	0,000	0,016	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
U5	0,043	0,016	0,032	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
U6	0,011	0,016	0,013	0,000	0,080	0,078	0,282	0,054	0,060	0,042
U*	0,000	0,000	0,000	0,021	0,120	0,062	0,129	0,089	0,080	0,064
U	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T	0,066	0,064	0,065	0,042	0,040	0,156	0,047	0,018	0,040	0,064
B5	0,000	0,016	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HV	0,033	0,097	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,020	0,064
M	0,033	0,064	0,045	0,128	0,020	0,000	0,047	0,000	0,000	0,042
L0	0,022	0,016	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
L1	0,086	0,048	0,071	0,064	0,100	0,016	0,000	0,036	0,060	0,000
L2	0,174	0,082	0,137	0,064	0,060	0,000	0,059	0,071	0,100	0,128
L3	0,141	0,178	0,156	0,149	0,160	0,016	0,070	0,233	0,100	0,149
L	0,011	0,016	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
X	0,000	0,000	0,000	0,021	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021
W	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
I	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021
N	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Outros	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064

Frequência dos Haplogrupos de DNA mitocondrial das populações da África, Sub-Saara, Ásia e Europa

ANEXO IV (continuação)

Frequência dos Haplogrupos de DNA mitocondrial das populações da África, Sub-Saara, Ásia e Europa

Pop	Itália	Península Ibérica	Turquia	Iraque	Síria	Iêmen	Arábia Saudita	Egito	Sudão	Quênia	Etiópia
(n)	(411)	(887)	(494)	(116)	(119)	(221)	(553)	(244)	(79)	(141)	(344)
H	0,465	0,492	0,264	0,233	0,160	0,072	0,079	0,140	0,000	0,000	0,003
K	0,053	0,058	0,053	0,052	0,059	0,068	0,040	0,037	0,000	0,007	0,015
J	0,068	0,065	0,032	0,043	0,050	0,005	0,051	0,041	0,000	0,007	0,006
J1	0,000	0,000	0,056	0,086	0,033	0,104	0,159	0,049	0,000	0,000	0,015
J/T	0,009	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
V	0,032	0,050	0,032	0,078	0,059	0,009	0,000	0,008	0,013	0,007	0,000
U3	0,000	0,000	0,047	0,060	0,067	0,009	0,024	0,020	0,000	0,000	0,006
U5	0,000	0,000	0,022	0,009	0,017	0,009	0,004	0,016	0,000	0,000	0,003
U6	0,001	0,018	0,000	0,009	0,025	0,005	0,009	0,008	0,000	0,007	0,032
U*	0,088	0,131	0,028	0,026	0,025	0,014	0,011	0,020	0,000	0,000	0,003
U	0,000	0,000	0,067	0,061	0,083	0,055	0,052	0,024	0,000	0,000	0,009
T	0,120	0,073	0,087	0,078	0,117	0,023	0,063	0,131	0,000	0,000	0,038
B5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HV	0,012	0,014	0,167	0,216	0,236	0,099	0,222	0,090	0,013	0,021	0,142
M	0,006	0,007	0,040	0,009	0,000	0,086	0,067	0,073	0,041	0,042	0,154
L0	0,000	0,000	0,002	0,009	0,008	0,077	0,011	0,029	0,089	0,199	0,073
L1	0,008	0,006	0,000	0,017	0,018	0,014	0,006	0,016	0,026	0,042	0,029
L2	0,004	0,016	0,002	0,043	0,017	0,144	0,037	0,061	0,367	0,092	0,142
L3	0,017	0,010	0,008	0,017	0,025	0,095	0,017	0,052	0,077	0,304	0,081
L	0,000	0,000	0,038	0,000	0,008	0,050	0,081	0,098	0,368	0,262	0,206
X	0,039	0,017	0,030	0,017	0,018	0,018	0,027	0,012	0,000	0,000	0,006
W	0,024	0,014	0,016	0,000	0,025	0,000	0,011	0,012	0,013	0,007	0,009
I	0,011	0,005	0,010	0,000	0,000	0,005	0,009	0,016	0,000	0,000	0,006
N	0,011	0,010	0,028	0,017	0,025	0,051	0,073	0,049	0,000	0,007	0,023

ANEXO V - CONSENTIMENTO

Identification of Biological Samples

Name:.....

birthdate:.....

local of birth:.....

spoken language:

(please, check the language and the classification)

ARABIC, LIBYAN SPOKEN

Alternate names: LIBYAN VERNACULAR ARABIC, SULAIMITIAN ARABIC. *Dialects:* TRIPOLITANIAN ARABIC, SOUTHERN LIBYAN ARABIC, EASTERN LIBYAN ARABIC, NORTHEAST EGYPTIAN BEDAWI ARABIC.

Classification: Afro-Asiatic, Semitic, Central, South, Arabic.

ARABIC, STANDARD

Classification: Afro-Asiatic, Semitic, Central, South, Arabic.

AWJILAH

Alternate names: AUJILA, AUGILA, AOUJILA.

Classification: Afro-Asiatic, Berber, Eastern, Awjila-Sokna.

DOMARI

Dialects: HELEBI.

Classification: Indo-European, Indo-Iranian, Indo-Aryan, Central zone, Dom.

GHADAMÈS

Dialects: AYT WAZITEN, ELT ULID.

Classification: Afro-Asiatic, Berber, Northern, Zenati, East.

NAFUSI

Alternate names: DJERBI, NEFUSI, JABAL NAFUSI, JEBEL NEFUSI, JBEL NAFUSI. *Dialects:* ZUARA (ZOUARA, ZUWARAH, ZWARA, ZURAA), TAMEZRET (DUWINNA), JERBI (JERBA).

Classification: Afro-Asiatic, Berber, Northern, Zenati, East.

SAWKNAH

Alternate names: SOKNA.

Classification: Afro-Asiatic, Berber, Eastern, Awjila-Sokna.

TAMAHAQ, TAHAGGART

Alternate names: TAMASHEKIN, TOURAGE, TOMACHEK, TAMACHEK, TUAREG, TOUREG. *Dialects:* HOGGAR (AHAGGAREN, AJJER, TAHAGGART), GHAT (GANET, DJANET).

Classification: Afro-Asiatic, Berber, Tamasheq, Northern.

	language								local of birth
	ARABIC, LIBYAN SPOKEN	ARABIC, STANDARD	AWJILAH	DOMARI	GHADAMÈS	NAFUSI	SAWKNAH	TAMAHAQ	
PARENTS									
Mother									
Father									
GRANDPARENTS:									
Maternal									
grandmother									
grandfather									
Paternal									
grandmother									
grandfather									

TERM OF CONSENT

I am invited to participate in the study of DNA markers.

I deliberate declare that I am giving biological samples to be used for research of DNA markers in Population genetics.

I am aware that my personal information will be maintained confidential and the results obtained will be used for research only.

Name:

.....

I.D.:

.....

Local:

.....

Date:

.....

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)