



**VARIABILIDADE DE MARCADORES *Alu* EM  
POPULAÇÕES NATIVAS AMERICANAS E ASIÁTICAS**

**Ana Helena Heller**

**Orientadora: Dra. Loreta Brandão de Freitas**

**Co-orientador: Dr. Sandro Luis Bonatto**

**Relatório apresentado à Comissão de  
Bacharelado do Departamento de Genética  
para obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas, Ênfase Molecular,  
Celular e Funcional**

**Porto Alegre, Dezembro de 2000**

BIO  
BIO  
110

À Congrad-Bio

Avaliação do Relatório para Obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional "Variabilidade de Marcadores *A/u* em Populações Nativas Americanas e Asiáticas"

Acadêmica Ana Helena Heller

Durante o período em que foi bolsista de Iniciação Científica, trabalhando no Projeto de Pesquisa que deu origem ao presente Relatório, a estudante demonstrou excelente capacidade de trabalho no laboratório, tendo desenvolvido a parte experimental aqui descrita e colaborado em outros dois projetos de pesquisa que integram uma dissertação de mestrado e um trabalho de Iniciação Científica respectivamente. Os resultados ora apresentados farão parte de um artigo *in extenso* a ser encaminhado para publicação nos próximos dias e representam uma importante contribuição ao conhecimento científico, uma vez que estas populações estão sendo estudadas pela primeira vez com este tipo de marcador.

Além disso, a estudante demonstrou significativo crescimento e amadurecimento científico e acadêmico durante o período, o que pode ser evidenciado na redação de seu Relatório e na apresentação de seu seminário, bem como em seu histórico escolar impecável.

Na condição de orientadora, sinto-me orgulhosa de encaminhar à Congrad-Bio o conceito **A, excelente**, para a avaliação da Ana Helena, e de comunicar que seu trabalho terá continuidade, agora como parte dos estudos de Mestrado, uma vez que a estudante foi selecionada entre 69 candidatos para o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, nível Mestrado-2001.

Loreta Brandão de Freitas  
Orientadora

Porto Alegre, 13 de dezembro de 2000.

À:

Dra. Loreta Brandão de Freitas - **Orientadora**

Segue a Avaliação do relatório para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

**Aluna:** Ana Helena Heller

**Título:** Variabilidade de Marcadores *Alu* em populações nativas americanas e asiáticas

O trabalho está apresentado na forma de uma monografia, dividido em introdução, objetivos, materiais e métodos e resultados e discussão.

A introdução apresenta com clareza o problema a ser estudado e, salienta a importância da investigação nesta área. Os objetivos são claros e pertinentes com o assunto apresentado na introdução. Os métodos utilizados foram adequados para alcançar os objetivos propostos. Os resultados obtidos foram bem analisados e interpretados.

**Conceito final do trabalho: A**

Apenas como sugestões, gostaria de salientar alguns pontos referentes à monografia:

Pg2: ....muitas controvérsias **vêm** girando .....

Pg3: falta referência na figura 1

“...e até maior que 20.000 anos.” Não está explicado no texto, até este momento, porque 20.000 anos ser considerado um tempo determinante.

Pg4: terceiro parágrafo: migrações simples e múltiplas

Pg5: seria interessante explicar o que são os haplogrupos A,B,C,D.

Pg8: falta referência na figura 3.

Pg10: faltam referências dos exemplos citados.

Pg11: no decorrer da discussão, são apresentadas comparações com populações africanas e asiáticas. Acho que estas comparações poderiam ser mencionadas como um objetivo.

Pg12. “As amostras de DNA estudadas são **provenientes....**”

**Sem mais e felicitando pelo trabalho,**

**Dra. Kátia Kvitko**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA  
Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43-111  
91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil  
Fax: 55 (51) 319-1512

**Dr. Sidia Maria Callegari Jacques**  
E-mail: [sidia@mat.ufgrs.br](mailto:sidia@mat.ufgrs.br)  
Fone: 55 (51) 316-6719

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2000.

**Aluna: Ana Helena Heller**

Título: "Variabilidade de marcadores Alu em populações nativas americanas e asiáticas"

Relatório apresentado à ComGrad Ciências Biológicas para obtenção do título de Bacharel

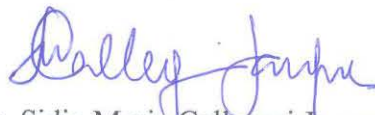
Conceito após a apresentação do seminário: B

Parecer: O trabalho é adequado para a obtenção do título de Bacharel, mas alguns pontos merecem revisão.

Pontos a melhorar:

1. O português na Introdução (tempos dos verbos; traduções do inglês, por exemplo: pg. 5: "... os mtDNA haplogrupos A,C e D...")
2. Figuras: mais cuidado na editoração:
  - 2.1. Fig1: Wai wai (nome correto é Wai Wai)
  - 2.2. Fig 2: Commonwealth of independent ....? (faltou palavra)
  - 2.3. Fig. 3 Atabascos do Canadá ou do Alaska? (os do trabalho são do Canadá e não do Alaska)
  - 2.4. Fig 7: Identificar heterozigotos e homozigotos no rodapé da figura ou na figura
  - 2.5. Fig 8: Explicar que os números no dendrograma são os resultados do teste de "bootstrap". Indicar o número de repetições usadas neste caso.
  - 2.6. Fig 9: Indicar em que eixo estão os componentes principais 1, 2 3 e, bem como a % de variância explicada por cada um deles.
3. Material e Métodos:
  - 3.1. Gavião e Surui não vivem na fronteira com o Pará, mas com o Amazonas.
  - 3.2. A descrição da análise estatística está muito resumida. Explicar melhor a análise de componentes principais, a % explicada da variância em cada CP, como usou os alelos (pg. 15).
  - 3.3. Faltou citar os programas usados na análise estatística.

4. Resultados:
  - 4.1. A tabela deve vir logo após a citação no texto.
  - 4.2. No loco 4.65, não só Ache mas também Guaraní apresentam ausência da inserção Alu.
  - 4.3. A comparação com dados da literatura deve apresentar estes dados para o leitor poder julgar a Discussão (ex. pg 18, parágrafo 4).
  - 4.4. O que é f? Freq média? (p 19)
  - 4.5. Falta uma tabela com as distâncias genéticas
  - 4.6. Pg 23: a tribo Ache não se mostrou mais distante das demais tribos americanas no dendrograma, somente na ACP. Na verdade, a discussão da posição das várias populações no dendrograma envolveu o gráfico da ACP antes mesmo de apresentá-lo no texto.
5. Conclusão: (pg 26) *Os resultados concordam com dados (quais?) sobre o relacionamento genético entre as populações.*
6. Referências: mais cuidado. Há trabalhos sem título, títulos incompletos e livros sem o título em negrito ou itálico.



Profª. Sidia Maria Callegari Jacques

## INTRODUÇÃO

### 1. Povoamento das Américas

Por mais de um século, muitas controvérsias giram em torno do povoamento do Novo Mundo. Uma riqueza de dados genéticos, antropológicos, dentais e lingüísticos vem sendo acumulada na área de evolução humana nas Américas. Essas controvérsias dizem respeito à origem, data e ponto da primeira entrada, rotas de expansão, além do número e frequência das migrações. Mas em um ponto a maioria dos cientistas concorda: os nativos americanos são derivados de ancestrais do Norte da Ásia, que alcançaram o Novo Mundo atravessando o Estreito de Bering a pé, durante a última glaciação (Novick et al, 1998).

Diante de algumas condições adversas, o homem teve que se adaptar para conseguir sobreviver. Com o tempo, a capacidade cultural humana para adaptações aumentou e, por isso, acredita-se que a entrada do homem no Novo Mundo tenha ocorrido a partir do Pleistoceno. É provável que essa entrada tenha ocorrido devido a uma interação entre o aumento das adaptações culturais e o decréscimo no rigor climático (Rogers et al, 1992). Entre as adaptações culturais relevantes destaca-se a utilização do fogo, a caça de grandes animais e a construção de moradias. Sugere-se também, que a extinção da megafauna do Hemisfério Oeste tenha ocorrido com a aparição repentina de predadores humanos no Novo Mundo. Porém, há alguns argumentos contra este postulado (Rogers et al, 1992).

Acredita-se que a cultura Clovis representou os primeiros americanos, que aproveitaram o corredor livre de gelo entre Laurentide e Cordilleran, tendo acesso ao Norte da América a partir do Alaska, enquanto que uma ponte de terra entre a Sibéria e o Alaska ainda estava aberta (Nettle, 1999), conforme mostra a figura 1.

Supõe-se que a migração de povos do Velho Mundo para o Novo Mundo esteja baseada em duas rotas: uma costeira e uma interior. A rota interior ocorreu entre a massa de gelo de Laurentide, localizada à leste, e a massa de gelo de Cordilleran, localizada à oeste da Beringia. A rota costeira aconteceu ao longo da costa do Pacífico, na América do Norte, e é considerada a mais significativa no processo de ocupação do Novo Mundo,

devido as melhores condições ambientais existentes. Fortes dados lingüísticos também suportam a rota costeira como a principal rota de entrada do homem nas Américas. Centros de diversidade lingüística estariam concentradas na porção costeira do Pacífico e estariam praticamente ausentes nas áreas do interior (Rogers et al, 1992).

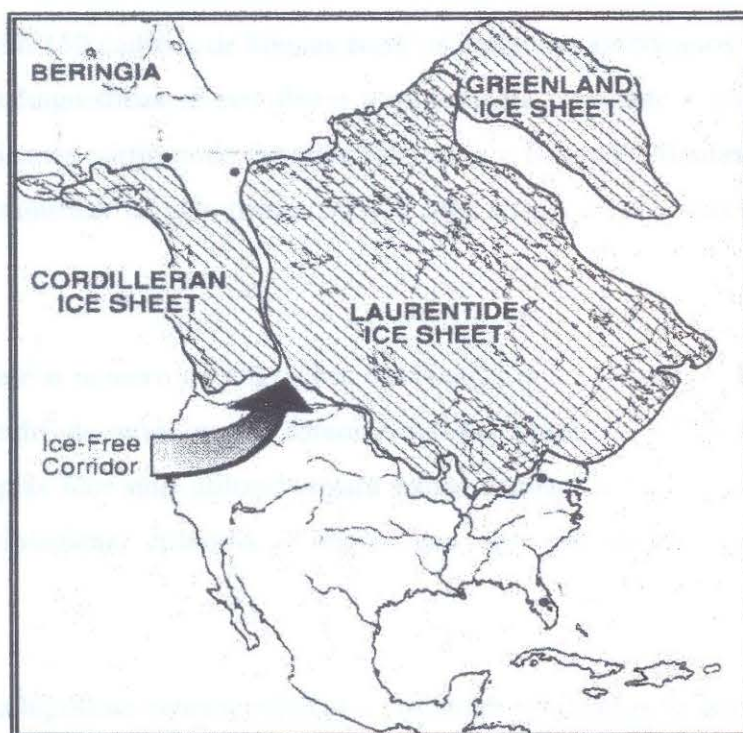


Fig. 1: mapa mostrando o provável local de entrada do homem no Novo Mundo.

Além de dados arqueológicos, existem argumentos lingüísticos e moleculares usados para tentar datar o povoamento das Américas. Entre os dados moleculares, estudos sobre variação de mtDNA em populações contemporâneas de nativos americanos têm mostrado um tempo de divergência maior que 11.200 anos e até maior que 20.000 anos. Isso leva a crer na ocorrência de uma colonização pré-Clovis, já que a cultura Clovis tem sido datada entre 11.000 e 11.500 anos (Nettle, 1999). Apesar disso, alguns pesquisadores sustentam que esses povos pré-Clovis consistiriam de populações bem pequenas (Lewn, 1998). Durante os últimos 50 anos, a opinião geral era que os famosos caçadores Clóvis, armados com seus projéteis de pontas acanaladas tenham sido os primeiros humanos a atravessar da Sibéria ou do nordeste da Ásia para o Alasca, colonizando o Novo Mundo. Porém, não explica como até agora não se encontraram evidências, no Alasca, da

existência de sítios do tipo Clóvis. Uma alternativa é que os humanos atravessaram antes de 12.000 anos, trazendo uma cultura pré-Clóvis diferente e menos especializada e que a técnica da acanaladura se espalhou mais tarde. Essa hipótese foi comprovada pela aceitação do sítio de Monte Verde, no Chile, com mais de 12.500 anos (Dillehay, 1997).

Num dos mais recentes estudos sobre diversidade lingüística, Nichols (1990) mostra que existem 150 padrões de línguas entre os indígenas americanos. A autora propõe que as linhagens lingüísticas se ramificam a uma média constante e que, se todas essas linguagens americanas partiram de famílias Na-Denés e Eskimos-Aleutas, essas linhagens começaram a se ramificar há pelo menos 50.000 anos atrás, ou seja, mais cedo que a época de Clovis.

A forma e o número de migrações envolvidas no povoamento das Américas tem sido muito debatido, de modo que já foram propostas simples e múltiplas migrações. As migrações múltiplas têm sido utilizadas para tentar explicar a diversidade observada em características biológicas, culturais e lingüísticas dos nativos americanos (Rogers et al, 1992).

Diversas hipóteses tentam explicar a origem dos humanos na América. A hipótese do modelo tripartido propõe três ondas de migração, partindo do Nordeste da Ásia e dando origem a três grandes grupos lingüísticos e genéticos, que são: Eskaleuta, Na-Dené e Ameríndio. Esta hipótese sugere que a primeira migração tenha ocorrido, aproximadamente, há 15.000 anos, originando os Ameríndios (Paleoíndios), a segunda entre 15.000 e 10.000 anos atrás, originando o grupo Na-Dené e a terceira há 10.000 anos, formando os Eskaleutas. Esta hipótese tem ganho apoio de dados dentários (Greenberg et al, 1986) e dados genéticos de DNA mitocondrial e nuclear. Um cenário diferente foi proposto por Szathmary (1979), que achou uma íntima relação entre Na-Denés e Esquimós e, com isso, sugeriu que a diferenciação com os Ameríndios teria ocorrido na Beringia, pelo bloqueio do corredor livre de gelo de Alberta. Desta forma, teria isolado os povos do Sul dos do Norte (Bonatto and Salzano, 1997a).

Rogers et al (1992) propuseram modelos de migrações simples e Cavalli-Sforza et al. (1994) propuseram múltiplas migrações. Existe a dúvida se as diferenças observadas



entre os nativos americanos são realmente significativas e se as diferenças existentes entre essas populações são suficientes para postular mais de uma migração (Laughlin, 1986). A alternativa então, seria propor padrões de diversidade com base na diferenciação através de mecanismos de isolamento dentro das Américas (Rogers et al, 1992). Esse isolamento poderia ser devido às grandes massas de gelo que cobriram boa parte da América do Norte durante a última glaciação e que permitiram somente algumas áreas possíveis para habitação. Recentemente, tanto antropólogos físicos quanto arqueólogos vêm questionando seriamente o modelo de migração tripla. Eles sugeriram, com base em estudos da morfologia craniana humana, que populações não-mongolóides também entraram no Novo Mundo. Esses achados levantaram a possibilidade de uma quarta migração, mais antiga (Dillehay, 1997).

Estudos com base em DNA mitocondrial, sugeriram um modelo de três ou quatro migrações (Torroni et al, 1993). Esta hipótese propunha que os Ameríndios teriam se originado a partir de duas migrações. A primeira, carregando os mtDNA haplogrupos A, C e D, entre 17.000 e 34.000 anos atrás, e a segunda, as seqüências de mtDNA somente do haplogrupo B. Uma terceira migração originaria os Na-Denés, postulados como os mais recentes por apresentarem mais baixa diversidade do haplogrupo A do que os Ameríndios (Bonatto and Salzano, 1997b). Em contraste, Horai et al (1993), usando dados de seqüência da região controladora (CR), postularam que cada haplogrupo principal representaria migrações separadas, que teriam ocorrido em torno de 14.000 e 21.000 anos atrás. Wallace et al (1995) e Starikovskaya et al (1998) propuseram que a migração dos Ameríndios à América teria ocorrido aproximadamente entre 26.000-34.000 anos, do haplogrupo B em torno de 12.000 e 15.000 anos e os Na-Denés há aproximadamente 7.000 e 9.000 anos atrás. Recentes estudos com RFLP e Região Controladora de mtDNA sugerem uma única migração, ocorrida provavelmente entre 30.000 e 40.000 anos atrás. Este modelo diz que houve um aumento populacional depois da colonização da Beringia e, em seguida, uma expansão através do corredor livre de gelo de Alberta. Um colapso nas placas de gelo de Laurentide e Cordilleran bloqueou o corredor Alberta e isolou a Beringia do resto do continente americano. Esse isolamento pode explicar a íntima afinidade entre Na-Dené e Esquimó, a relação distante com os Ameríndios e também, o motivo dos grupos Na-Dené e Esquimó terem uma baixa diversidade de DNA mitocondrial (Bonatto and Salzano, 1997a). Esta hipótese que, ao contrário do modelo das "três ondas", coloca a

Beringia como o local de estabelecimento e expansão populacional é conhecida como “out of Beringia”, em contraste com o tradicional “out of Ásia”. A figura 2 mostra as rotas de migração dos haplogrupos A, B, C e D.

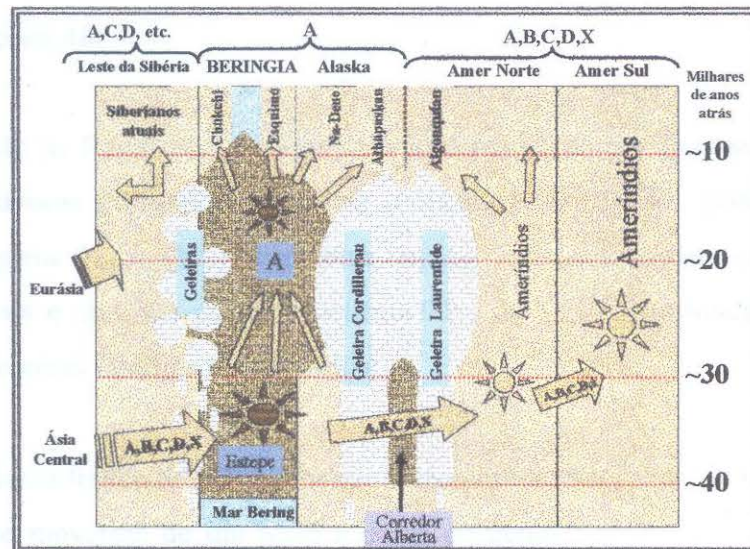


Fig.2: Esquema mostrando as rotas de migração dos haplogrupos segundo Bonatto e Salzano (1997a,b)

Outro aspecto bastante investigado diz respeito ao local de origem da população fundadora do Novo Mundo. Segundo Merriwether et al (1996) a Mongólia representa a melhor candidata como local de origem da população fundadora do Novo Mundo, porque apresenta maior número de haplogrupos fundadores (os 4 haplogrupos), do que as populações geograficamente mais próximas da Sibéria. Kolman et al (1995) também sustentam que os mongóis representam um grupo central no entendimento das relações genéticas e evolucionárias entre as populações indígenas do leste asiático e do Novo Mundo e descarta os povos siberianos como possíveis fundadores do Novo Mundo por não apresentarem o haplogrupo B, apesar da proximidade geográfica com as Américas.

Atualmente, a distribuição da diversidade genética humana continua sendo objeto de interesse, tanto para a evolução humana como em implicações forenses e doenças genéticas. Estudos realizados com DNA mitocondrial, cromossomo Y e outros marcadores polimórficos autossômicos têm mostrado que a maior diversidade genética humana é encontrada dentro da população e não entre populações. Essas diversidades são

relativamente baixas, indicando uma recente origem e um pequeno tamanho para a população humana ancestral (Jorde et al, 2000).

## 2. Inserções *Alu*

A inserção de fragmentos móveis de ácidos nucléicos em determinados locais do genoma pode provocar profundos efeitos na estrutura e função dos genes. Sabe-se que somente uma pequena fração (1%) do genoma humano é necessário para codificar todas as proteínas essenciais e que boa parte dos outros 99% do DNA é formada por elementos repetitivos de diferentes famílias e subfamílias.

Dentro dessa fração de DNA repetitivo encontra-se um grupo de transposons, que são capazes de se moverem de um local a outro no genoma. Uma das superfamílias de retroposons é composta de retroposons não virais, que podem ser classificados como elementos intercalados curtos (SINE) ou longos (LINE). Dentro da família SINE, as inserções *Alu* são as mais numerosas e melhor caracterizadas no genoma de primatas (Szmulewicz et al, 1998).

Os elementos *Alu* estão presentes em mais de 500.000 cópias por genoma haplóide e constituem aproximadamente 5% do genoma total. Tiveram sua origem provavelmente a partir do gene 7SL RNA, mobilizando-se através de transcritos derivados da RNA polimerase III (Rogers et al, 1983). Apesar de os elementos *Alu* terem divergido, eles ainda mantêm a seqüência aproximadamente 90% similar ao gene 7SL RNA, embora o gene tenha 150 pares de base (Szmulewicz et al, 1998). A estrutura básica de um elemento *Alu* mostra uma organização dimérica, na qual o monômero direito está 31 nucleotídeos distante do monômero esquerdo. A metade esquerda do elemento contém um promotor típico de RNA polimerase III, que direciona o início da transcrição (Novick et al, 1995).

As seqüências *Alu* consistem em aproximadamente 280 pares de base de comprimento, são altamente metiladas, ricas em CG e contêm vários códons de parada nas direções senso e antisenso (Mighell et al, 1997). Além disso, apresentam uma seqüência

rica em A's entre os dois dímeros e uma cauda poli (A) à 200 pares de base da extremidade 3' (Szmulewicz et al, 1998). A figura 3 mostra, em esquema, seqüência de DNA contendo ou não elementos *Alu*.

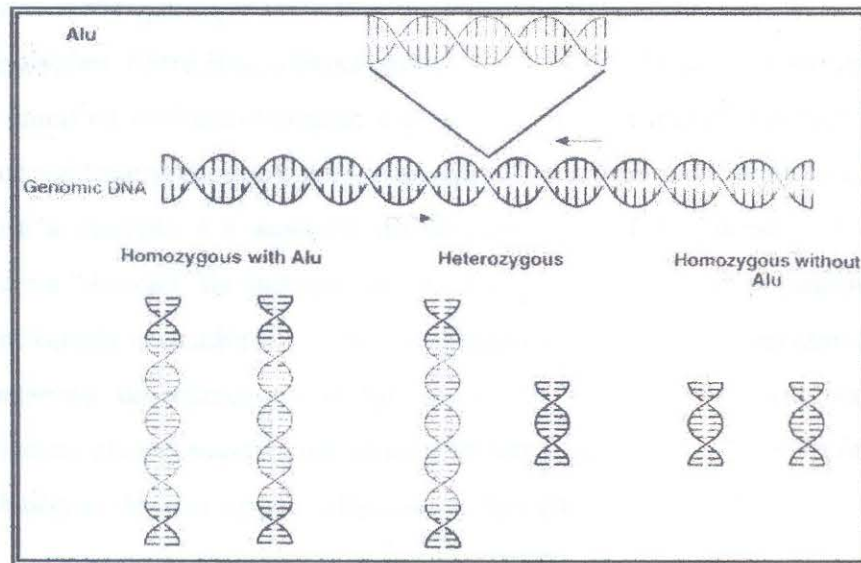


Fig. 3: Esquema mostrando seqüência de DNA com e sem inserções *Alu*.

As seqüências *Alu* dentro do genoma humano podem ser divididas em grupos de elementos relacionados, as subfamílias, com base em mutações diagnósticas. Um dos grupos de elementos *Alu* formado mais recentemente foi chamado de HS (human-specific) ou PV (predicted variant) e é derivado da subfamília CS de repetições *Alu*. Alguns HS sofreram retroposição tão recentemente que ainda não estão totalmente fixados no genoma humano (Batzler et al, 1996), ou seja, há cromossomos com e sem a inserção. A distribuição desses elementos varia em populações distintas geograficamente. A origem dos genes tem sido altamente conservada a mais de 100 milhões de anos. As poucas mudanças ocorreram durante a evolução e os nucleotídeos alterados em posições diagnósticas permitem a identificação das famílias (Britten, 1994).

As inserções mais antigas datam em torno de 65 milhões de anos, enquanto que a inserção *Alu* HS mais antiga ocorreu, aproximadamente, há 2,8 milhões de anos, por isso, esse tipo de marcador genético permite reconstruções filogenéticas bastante precisas (Novick et al, 1995).

Uma vez inseridos em locais específicos do cromossomo, a maioria dos elementos *Alu* não está sujeita à perda ou rearranjo, caracterizando-se, dessa forma, como marcadores genéticos estáveis.

Há várias razões para que essas inserções polimórficas sejam úteis para estudos de genética de populações. Entre elas, a baixa probabilidade de perda da inserção incorporada em um evento único na evolução humana, a existência de uma técnica simples, com base no PCR (polymerase chain reaction), para avaliação do genótipo individual para cada loco polimórfico para a inserção e a ausência do elemento no estado ancestral. Conhecer o estado ancestral e a “direção” da mutação facilita a análise das relações populacionais, não conseguida com outros marcadores. O fato do ancestral hipotético apresentar frequência zero para a presença da inserção e incluir a raiz de uma árvore evolutiva entre as populações africanas atuais, sugere uma origem africana para inserções polimórficas *Alu*. Isso reforça a hipótese de uma origem africana recente para o homem moderno (Batzer et al, 1994).

Mas, afinal, os elementos *Alu* têm alguma função? A sua presença afeta as seqüências vizinhas e o genoma como um todo? Esses elementos transponíveis foram inicialmente considerados meros parasitas no genoma, sem nenhum efeito maior no organismo. Essa percepção era conhecida como a Hipótese do Gene Egoísta (Orgel and Crick, 1980). Esses elementos também eram vistos como fósseis moleculares ou inconseqüentes para a célula e para a evolução das espécies (Novick et al, 1996). Uma nova alternativa para a hipótese do DNA egoísta foi um modelo chamado Canalização do Genoma (von Sternberg et al, 1992). Nesse processo, todas as mudanças evolutivas devem se adaptar ao contexto genético prevalecente, uma vez que o padrão de organização genômico está estabelecido (Novick et al, 1996). Recentes evidências moleculares da estrutura e evolução desta classe de seqüências indicam que os elementos transponíveis representam uma origem dramática de variação genética e que as inserções *Alu* são responsáveis por inúmeras desordens genéticas (Szmulewicz et al, 1998).

Portanto, sabe-se hoje que, além da importância dos elementos *Alu* em estudos populacionais, eles têm o seu papel comprovado também na organização, função e

evolução do genoma. São inúmeros os exemplos de inserções *Alu* atuando como organizadores, ativadores e silenciadores na expressão de genes.

## OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos evolutivos que levaram ao povoamento das Américas, conhecendo melhor a diversidade genética dos povos indígenas americanos.

Os objetivos específicos do presente estudo são:

- a) analisar as diferentes frequências de inserção de alguns elementos *Alu* em povos nativos americanos;
- b) verificar seu polimorfismo e analisar os resultados para o estudo da origem e evolução desses povos;
- c) comparar os resultados obtidos no estudo dos povos nativos americanos com os obtidos com populações da Sibéria e da Mongólia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de DNA estudadas são de sete tribos indígenas brasileiras, uma tribo paraguaia, duas siberianas, uma atabasca e duas mongóis. Detalhes sobre as populações são apresentados na tabela 1. As figuras 4, 5 e 6 mostram os mapas dos continentes com as populações estudadas.

Tribo	n	Localização geográfica	Grupo lingüístico (Greenberg, 1987)
Xavante	30	MT	Gê-Chavante
Gavião	28	PA e RO	Tupi-Mondé
Suruí	23	PA e RO	Tupi-Mondé
Zoró	28	MT	Tupi-Mondé
Wai Wai	25	PA, AP e RR	Carib-Waiwai
Cinta Larga	31	MT	Tupi-Mondé
Guarani	30	MT	Tupi-Guarani
Ache	58	Paraguai	Tupi-Guayaki
Chukchi	20	Sibéria	Chukchi
Esquimó	30	Sibéria	Esquimó
Na-Dené	26	Canadá	Athapaskan
Khoton	50	Mongólia	Khoton
Khalkh	50	Mongólia	Khalkh





Fig.4: Mapa da América do Sul mostrando a localização geográfica das tribos sul-americanas.

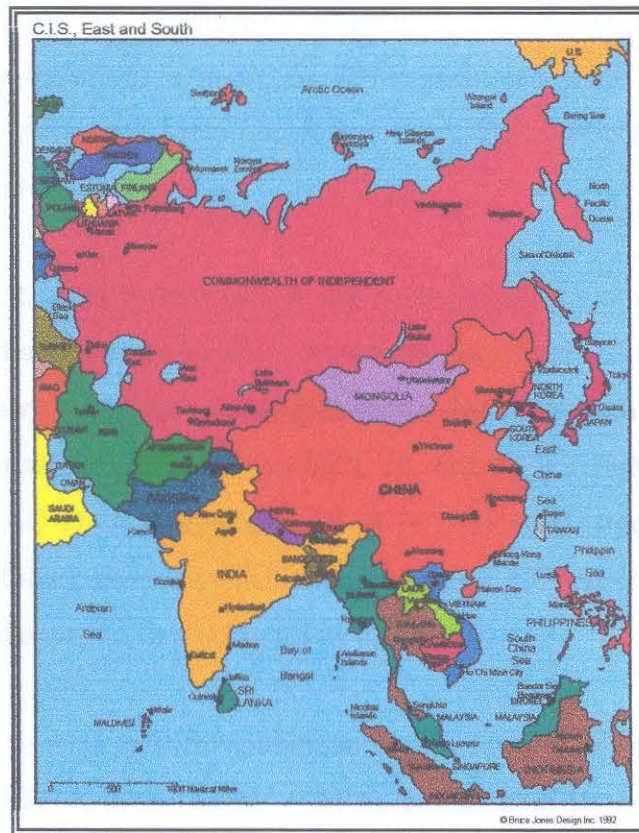


Fig. 5: Mapa da Ásia mostrando a localização geográfica da Mongólia.



Fig. 6: Mapa mostrando a localização geográfica das tribos siberianas.

A amplificação dos fragmentos desejados foi feita através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir de DNA genômico total. Para isso, utilizou-se *primers* específicos para cada loco, que foram: TPA, PV, APO, ACE, FXIII, D1, A25, 3.23, 4.32, 4.75, 4.59 e 4.65.

Para o PCR, cada *primer* teve a sua condição favorável determinada, sendo as diferentes temperaturas de anelamento mostradas na tabela 2. A tabela 3 contém a seqüência dos *primers* utilizados. As reações foram realizadas com 1µl de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de TAQ DNA polimerase e água mili-Q estéril, totalizando 25µl. Para os *primers* PV e 4.65 foi acrescentado DMSO equivalente a 10% do volume da reação e para o *primer* A25 a concentração de MgCl<sub>2</sub> foi de 4mM.

O produto de cada PCR foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% com tampão TBE 1X (Tris Borato- EDTA), corado com Brometo de Etídio (EtBr) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. O gel com os padrões de amplificação obtidos foram fotografados com câmera digitalizadora Kodak Digital Science DC 40, gerando a imagens como a da figura 7.

Os padrões de amplificação dos indivíduos foram transformados em tabelas de frequência de inserção e os resultados agrupados por componentes principais (Rohlf, 1998) e “neighbor-joining” (Saitou e Nei, 1987), utilizando-se matrizes de distância de Nei (1972).

Tabela 2: Temperatura de anelamento dos *primers*

Primer	Temperatura de anelamento
TPA, ACE e 4.75	58°C
PV	54°C
APO	50°C
FXIII	56°C
D1	70°C
A25	63°C
3.23, 4.32 e 4.59	60°C
B65	59°C
4.65	61°C

Tabela 3: Sequência dos *primers* em 12 locos.

Inserção	Sequência <i>primer</i> 5'	Sequência <i>primer</i> 3'
A25	5'-CCACAAATAGGCTCATGTAGAAC-3'	5'-TATAATATGGCCTGGATTATACC-3'
TPA	5'-GTAAGAGTTCCGTAACAGGACAGCT-3'	5'-CCCCACCCTAGGAGAACTTCTCTTT-3'
PV	5'-AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT-3'	5'-TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG-3'
FXIII	5'-TCAACTCCATGAGATTTTCAGAAAGT-3'	5'-CTGGAAAAAATGTATTCAGGTGAGT-3'
D1	5'-TGCTGATGCCCAGGGTTAGTAAA-3'	5'-TTTCTGCTATGCTCTTCCCTCTC-3'
APO	5'-AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG-3'	5'-AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA-3'
ACE	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'
3.23	5'-GGTGAAGTTTCCAACGCTGT-3'	5'-CCCTCCTCTCCCTTTAGCAG-3'
4.32	5'-GTTTATTGGGCTAACCTGGG-3'	5'-TGACCTGCTAACTTGTACTTTAACC-3'
4.59	5'-TTTCTGAACCTGAAGACAGG-3'	5'-TCTCAATTTCTTCTCATAATGCA-3'
4.65	5'-TGAAGCCAATGGAAAGAGAG-3'	5'-ACAGGAGCATCTAAACCTTGG-3'
4.75	5'-CAGCATTACATACAATAGTTAGGAGC-3'	5'-GTGATATTTGTCTTTCTGTACCTGG-3'

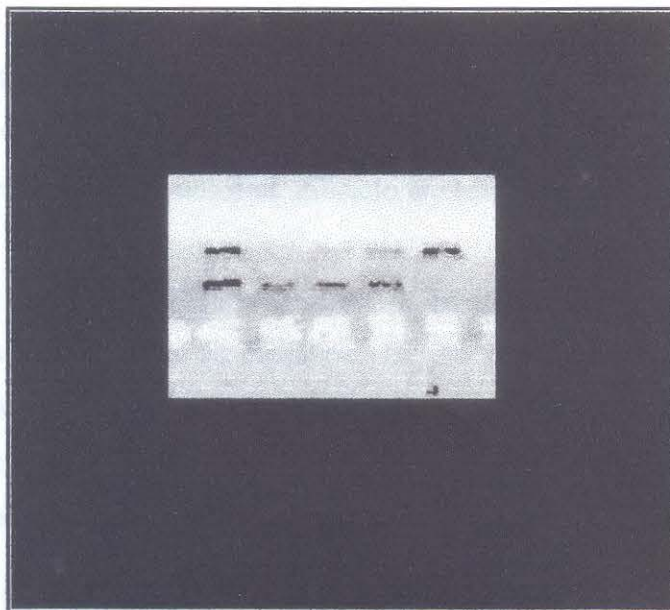


Fig. 7: Fotografia de um gel de agarose indicando padrões de heterozigotos, homozigotos para a presença e ausência de inserção *Alu*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando 12 marcadores polimórficos *Alu*, determinou-se a sua distribuição em 13 populações, com base na presença ou ausência do elemento através da técnica de PCR.

A tabela 4 mostra os valores das freqüências de inserção *Alu* nos 12 locos analisados e, também o número amostral utilizado em cada população.

Conforme pode-se verificar na tabela 4, os locos APO e 4.75 apresentam as maiores freqüências de inserção do elemento *Alu* em praticamente todas as populações estudadas, onde há destaque para a fixação do elemento no loco 4.75 em 11 das 13 populações analisadas. Já as mais baixas freqüências de inserção foram encontradas nos locos A25 e 4.65, sendo que, nas tribos Gavião e Cinta Larga há ausência total da inserção para o loco A25, e para a tribo Ache em relação ao loco 4.65. A baixa freqüência desses dois elementos sugere uma origem mais recente.

Nota-se também que o número amostral para as populações Guarani, Esquimó e Chukchi nos locos 4.32, 4.59 e 4.65 é um pouco menor que a média. Isso se deve à dificuldade de amplificação do DNA dessas tribos, apesar do protocolo de cada PCR estar definido. Acredita-se que o principal motivo desse problema esteja na seqüência dos *primers* não muito bem desenhada associada a um material biológico de não tão boa qualidade. Isso provocou um certo atraso no desenvolvimento do trabalho devido às inúmeras repetições da técnica de PCR a fim de se obter um número amostral satisfatório de material amplificado para o estudo.

Comparando os dados obtidos com dados publicados, percebe-se que os valores de freqüências de inserção nas tribos estudadas neste trabalho são muito semelhantes aos de outras populações nativas americanas, quando se analisa os locos ACE, TPA, APO, PV e FXIII (Batzer et al, 1994; Batzer et al, 1996; Novick et al, 1998). O mesmo acontece quando os locos envolvidos são 3.23, 4.32, 4.65 e 4.75 (Arcot et al, 1996). O aspecto mais marcante é que a grande parte dessas populações americanas também apresentou freqüência de inserção igual a 100% para os locos APO e 4.75. A propósito, a maioria das populações humanas apresenta altas freqüências de inserção para o loco APO, com

exceção da população nigeriana que apresentou frequência em torno de 0,50 (Batzer et al, 1994; Novick et al, 1998).

Observando os valores das frequências no loco PV, percebe-se uma gradação de frequência aparentemente relacionada com a distribuição geográfica. As maiores frequências foram observadas nos continentes americano e asiático e as mais baixas nas populações euro e afro-americanas. Nestas populações, a frequência encontrada para APO foi de 0,09 e 0,177 respectivamente (Batzer et al, 1994; Novick et al, 1998).

No loco FXIII, as menores frequências de inserção ocorrem no continente africano e as maiores nos continentes asiático e americano. As mais baixas frequências foram encontradas na Nigéria e pigmeus africanos, com frequência de 0,08 e 0,02 respectivamente, ou seja, valores bem menores do que os encontrados em populações americanas (Novick et al, 1998). Há, inclusive, fixação do alelo em populações sul-americanas, como Gavião, Suruí, Zoró e Xavante.

Os locos ACE e TPA apresentam baixas frequências de inserção em populações africanas e do sudoeste asiático. De um modo geral, as populações asiáticas e africanas apresentam frequências de inserção *Alu* para o loco ACE variando de 0,118 em um grupo de pigmeus africanos à 0,39 em uma população asiática (Greek Cypriot) e entre 0,22 (pigmeus africanos) e 0,57 (Turkish Cypriot) para o loco TPA (Batzer et al, 1994; Novick et al, 1998). Porém, nas populações americanas, o loco ACE apresenta altas frequências ( $f \sim 1,00$ ) e o loco TPA apresenta frequências intermediárias ( $f \sim 0,55$ ).

O loco 4.65 caracteriza-se por apresentar baixas frequências de inserção em populações americanas, afro-americanas, caucasóides e, também, nas populações Khoton e Khalkh, da Mongólia. O valor encontrado para afro-americanos é 0,16 e 0,01 para caucasóides, semelhantemente aos valores encontrados para as populações asiáticas deste estudo. Já os locos 4.59 e 3.23 mostram altas frequências na maioria das populações humanas mundiais ( $f > 0,74$ ) (Arcot et al, 1996).

De um modo geral, as menores frequências de inserção *Alu* foram encontradas nas populações africanas e as maiores entre americanos e asiáticos.

Tabela 4: Frequências de inserção *Alu* em 12 locos e o número amostral utilizado para cada loco

	n médio	n	TPA	n	ACE	n	APO	n	A25	n	FXIII	n	PV	n	D1	n	3.23	n	4.32	n	4.59	n	4.65	n	4.75
Guarani	31	31	0.70	35	0.83	29	0.93	31	0.09	31	0.94	30	0.78	33	0.39	30	0.80	25	0,14	20	0,69	15	0,00	25	1.00
Ache	56	41	0.86	76	1.00	36	1.00	76	0.01	73	0.61	69	0.76	31	0.58	71	0.91	63	0.18	31	0.97	31	0.00	73	1.00
C. Larga	27	31	0.48	27	0.83	29	0.91	28	0.00	24	0.94	27	0.91	23	0.28	28	0.52	25	0.12	26	0.92	26	0.04	24	1.00
Gavião	28	30	0.80	28	0.93	30	1.00	28	0.00	30	1.00	30	0.90	28	0.55	24	0.33	26	0.15	26	0.42	28	0.20	30	1.00
Wai Wai	22	18	0.78	21	0.98	23	1.00	23	0.04	23	0.87	23	0.87	23	0.54	23	0.61	20	0,10	21	0.74	18	0,03	23	1.00
Suruí	23	22	0.41	23	0.87	24	1.00	24	0.06	24	1.00	24	0.94	21	0.29	22	0.45	21	0.21	22	0.57	23	0.09	24	1.00
Zoró	29	27	0.70	26	0.96	33	0.97	30	0.02	28	1.00	33	0.79	32	0.56	30	0.43	31	0.21	18	0.63	26	0.04	30	1.00
Xavante	31	30	0.42	30	0.68	33	1.00	32	0.23	30	1.00	32	0.81	31	0.53	33	0.69	31	0.24	30	0.72	32	0.08	29	1.00
Na-Dené	24	25	0.46	24	0.63	24	0.98	25	0.10	25	0.98	23	0.59	23	0.48	25	0.68	24	0.06	22	0.61	16	0,03	22	1.00
Esquimó	26	42	0.49	22	0.68	49	0.96	18	0.25	19	0.90	21	0.60	20	0,52	35	0.99	19	0.11	15	0,60	16	0,03	21	1.00
Chukchi	17	24	0.52	14	0.79	27	0.93	12	0.04	14	0.89	12	0.54	10	0.55	23	0.98	15	0,40	14	0.71	10	0,20	21	1.00
Khoton	53	53	0.43	53	0.52	53	0.89	53	0.21	53	0.77	53	0.71	53	0.35	53	0.97	53	0.47	53	0.60	53	0.02	53	1.00
Khalkh	41	41	0.50	41	0.61	41	0.89	41	0.15	41	0.83	41	0.65	41	0.40	41	0.96	41	0.39	41	0.85	41	0.13	41	0,99



A heterozigosidade média para cada população (Tabela 5), envolvendo os 12 locos (TPA, ACE, APO, A25, FXIII, PV, D1, 3.23, 4.32, 4.75, 4.32 e 4.59), variou de 0,177 na tribo Ache à 0,290 na tribo Xavante, entre os povos americanos. Esta heterozigosidade média pode ser considerada baixa, porém, está dentro dos padrões encontrados para outras populações americanas (Novick et al, 1998). As populações da Mongólia, Khoton e Khalkh, apresentaram os maiores graus de heterozigosidade, sendo os valores 0,320 e 0,311 respectivamente. Este valor um pouco mais alto que o das demais populações analisadas neste trabalho também foi encontrado para outras populações asiáticas e africanas (de 0,30 a 0,39 - Batzer et al, 1994; Novick et al, 1998).

Tabela 5: Heterozigosidade média e seu erro-padrão

Guarani	0,247403 ± 0,047841
Ache	0,177225 ± 0,055853
Cinta Larga	0,217334 ± 0,051163
Gavião	0,223268 ± 0,057557
Wai Wai	0,213917 ± 0,053492
Suruí	0,241164 ± 0,058829
Zoró	0,236358 ± 0,060703
Xavante	0,290137 ± 0,057175
Na-Dené	0,279820 ± 0,063790
Esquimó	0,281736 ± 0,060651
Chukchi	0,300811 ± 0,057864
Khoton	0,320827 ± 0,056369
Khalkh	0,311921 ± 0,048777
U.S. Caucasian	0,354318 ± 0,048129
African American	0,353058 ± 0,039008

A diferenciação genética entre as populações foi estimada através dos valores de  $G_{st}$  para cada loco (Tabela 6).

Os valores de  $G_{st}$  variaram de 0,045 para o loco D1 até 0,386 para o loco FXIII. Esses resultados refletem as diferenças entre as populações nativas estudadas a respeito das frequências de cada inserção *Alu* polimórfica. O valor de  $G_{st}$  unindo 12 locos foi 0,22002.

Tabela 6: Valores de Gst para os 12 locos e valor médio de Gst

Loco TPA	0,114382
Loco ACE	0,215987
Loco APO	0,091050
Loco A25	0,135436
Loco FXIII	0,386402
Loco PV	0,210637
Loco D1	0,045707
Loco 3.23	0,264323
Loco 4.32	0,146572
Loco 4.75	0,258925
Loco 4.59	0,391065
Loco 4.65	0,904478
Valor médio	0,22002

No dendrograma realizado através do método de “neighbor-joining” utilizando-se matrizes de distância de Nei (Figura 8), foram agrupados os resultados das frequências de inserção *Alu* obtidos com as 13 populações estudadas, envolvendo os 12 locos em questão. Verificou-se, então, que o posicionamento das populações nativas americanas, siberianas e da Mongólia está de acordo com a disposição destas populações nos respectivos continentes em que se encontram. O que se observa é o agrupamento das populações americanas; que por sua vez, estão separadas das populações asiáticas (Khoton e khalkh) e também das siberianas (Esquimó e Chukchi).

A população Na-Dené encontra-se mais próxima das populações sul-americanas do que das populações Esquimó Siberiano e Chukchi. Além disso, Esquimó e Chukchi dispõem-se bem próximas geneticamente, o que vale também pela proximidade geográfica entre elas.

Entre as populações brasileiras Cinta Larga, Suruí, Gavião e Zoró, verifica-se um agrupamento de acordo com as localizações geográficas dessas tribos, que estão situadas principalmente nos limites dos Estados do Mato Grosso, Pará e Rondônia. O agrupamento dessas tribos também está em concordância com dados lingüísticos, todas elas pertencem à família lingüística Tupi-Mondé.

A tribo Ache, do Paraguai, mostrou-se um pouco mais distante geneticamente das outras tribos sul-americanas, o que poderia ser explicado pelo seu acentuado isolamento histórico (Hill and Hurtado, 1996) e provável deriva genética, que lhe conferem baixa variabilidade genética. Essa baixa variabilidade foi verificada tanto em estudos com DNA mitocondrial (Schmitt et al., 2000) como para as inserções *Alu*.

As tribos Ache, Wai Wai, Guarani e Xavante estão próximas no dendrograma, porém não há relação com a localização geográfica (Guarani e Xavante estão no Mato Grosso, mas em extremidades opostas no Estado). Também não se observa nenhum padrão lingüístico entre elas. Bem pelo contrário, cada uma delas pertence a uma família lingüística diferente: Ache, Tupi-Guayaki; Wai Wai, Carib-Waiwai; Guarani, Tupi-Guarani e Xavante, Gê-Chavante.

Considerando a análise pelos componentes principais (Figura 9), a disposição das populações segue a mesma ordem apresentada pelo dendrograma de distância de Nei. Como pode-se verificar, as populações da Mongólia, Khoton e Khalkh, se encontram bem isoladas dos nativos americanos. Já as tribos Chukchi e Esquimó, da Sibéria, estão numa posição intermediária entre as populações da Mongólia e as nativas americanas. A tribo Na-Dené posicionou-se entre as populações americanas analisadas. As populações americanas, de um modo geral, apresentam-se dispersas neste tipo de gráfico tridimensional e a tribo Ache, do Paraguai, dispõe-se também isoladamente do restante dos outros americanos.

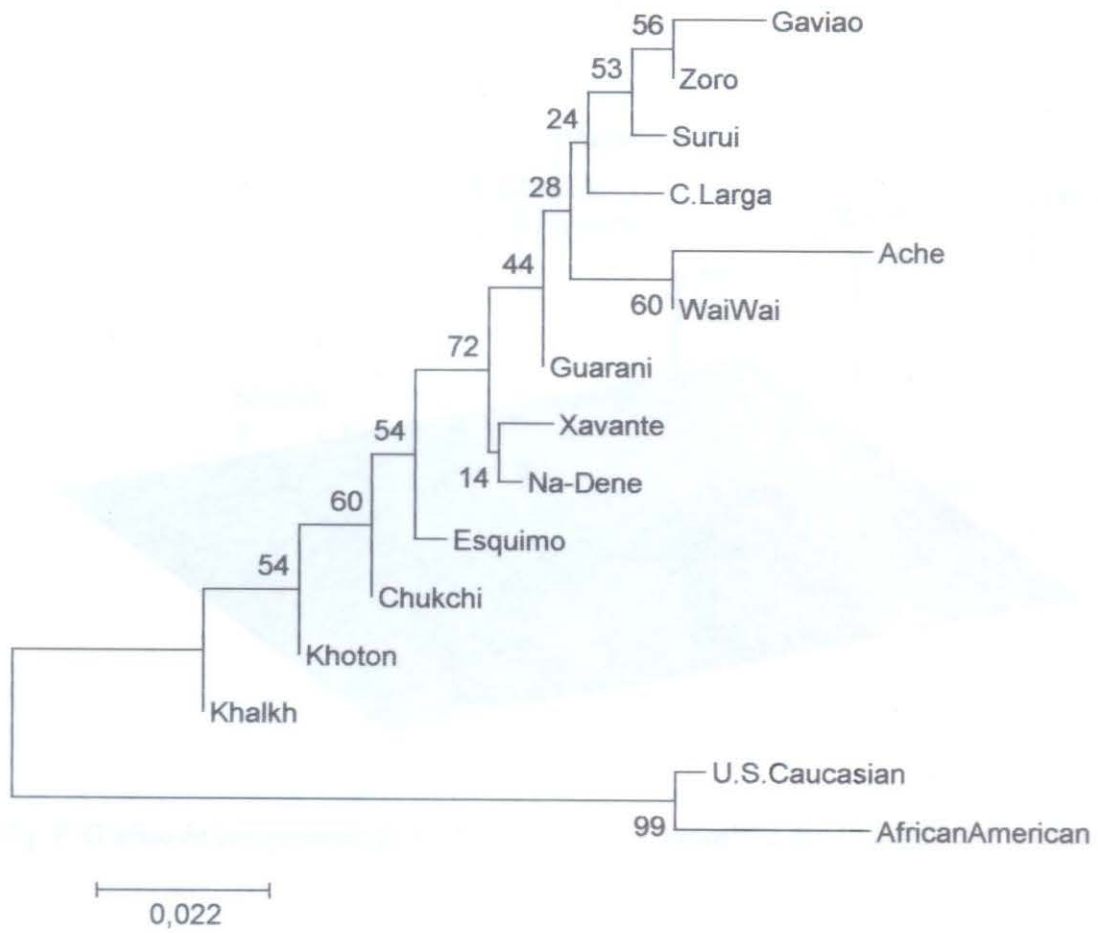


Fig. 8: Dendrograma realizado através do método de "neighbor-joining" utilizando-se matrizes de distância de Nei, mostrando agrupamento das 13 populações analisadas.

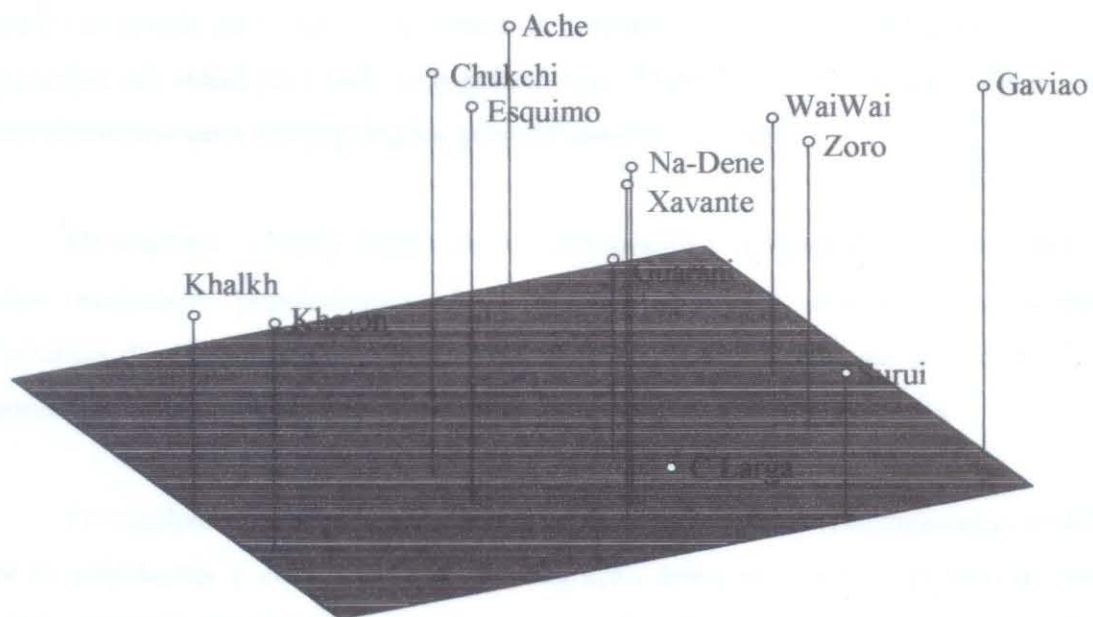


Fig. 9: Gráfico de componentes principais mostrando a disposição das 13 populações analisadas.

---

## CONCLUSÃO

Os elementos *Alu* têm se mostrado úteis para estudos de genética de populações por várias razões. Entre elas, a baixa probabilidade de perda da inserção, ausência do elemento no estado ancestral e a existência de uma técnica simples (PCR) para a avaliação do genótipo individual para cada loco polimórfico. Além disso, sabe-se que a distribuição desses elementos varia em populações geograficamente distintas.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a utilidade desses marcadores em estudos evolutivos populacionais. Além disso, as nossas análises demonstram a importância do estudo envolvendo o maior número de locos possível, pois desta forma dispomos de um maior potencial de informação genética sobre as populações.

Os resultados encontrados concordam com dados sobre o relacionamento genético entre as populações e com a hipótese de migração única para o povoamento do Novo Mundo, conforme foi sugerido por Bonatto e Salzano (1997a). Devido ao baixo número de populações asiáticas estudadas até o momento, a hipótese das três ondas também não pode ser refutada. Pelo mesmo motivo, não se pôde testar a hipótese de que a Mongólia seria a população fundadora das populações das Américas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCOT, S.S.; ADAMSON, A.W.; LAMERDIN, J.E.; KANAGY, B.; DEININGER, P.L.; CARRANO, A.; BATZER, M.A. 1996. Alu fossil – distribution and polymorphism. *Genome Research* **6**:1084-1092.
- BATZER, M.A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HATMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D.H.; SHAIKH, T.H.; NOVICK, G.E.; IOANNOU, P.A.; SCHEER, W.D.; HERRERA, R.J.; DEININGER, P. 1994. African origin of human-specific polyorphic *Alu* insertions. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12288-12292.
- BATZER, M.A.; ARCOT, S.S.; PHINNEY, J.W.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; KASS, D.H.; MILLIGA, S.M.; KIMPTON, C.; GILL, P.; HOCHMEISTER, M.; IOANNOU, P.A.; HERRERA, R.J.; BOUDREAU, D.A.; SCHEER, W.D.; KEATS, B.J.B.; DEININGER, P.L.; STONEKING, M. 1996. Genetic variation of recent *Alu* insertions in human populations. *J. Mol. Evol.* **42**:22-29.
- BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M. 1997(a). A single and early migrations for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1866-1871.
- BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M. 1997(b). Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups and their implications for the peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* **61**:1413-1423.
- BRITTEN, R.J. 1994. Evidence that most human *Alu* sequences were inserted in a process that ceased about 30 million years ago. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6148-6150.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. 1994. The history and geography of human genes. Princeton, NJ: Princeton University Press.

- DILLEHAY, T.D. 1997. Onde estão os remanescentes ósseos humanos do final do Pleistoceno? Problemas e perspectivas na procura dos primeiros americanos. *Revista USP*. São Paulo **34**:22-33.
- GREENBERG, J.H.; TURNER, C.G.; ZEGURA, S.L. 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr. Anthropol.* **27**:477-497.
- GREENBERG, J. H. 1987. Language in the Americas. Stanford University Press: Stanford.
- HORAI, S.; KONDO, R.; NAKAGAWA-HATTORE, Y.; HAYASHI, S.; SONODA, S.; TAJIMA, K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **10**(1): 23-47.
- HILL, K. and HURTADO, A M. 1996. Ache life history. New York: Aldine de Gruyter.
- JORDE, L.B.; WATKINS, W.S.; BAMSHAD, M.J.; DIXON, M.E.; RICKER, C.E.; SEIELSTAD, M.T.; BATZER, M.A. 2000. The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal and y-chromosome data. *Am. J. Hum. Genet.* **66**:979-988.
- KOLMAN, C.J.; SAMBUUGHIN, N.; BERMINGHAN, E. 1996. *Genetics* **142**:1321-1334.
- LAUGHLIN, W.S. 1986. Comments on the settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr. Anthropol.* **27**:489-490.
- LEWIS, R. 1998. Principles of human evolution. A core textbook. Blackwell, Oxford, 526p.
- MERRIWETHER, D.A.; HALL, W.W.; VAHLNE, A.; FERRELL, R. 1996. mtDNA variation indicates Mongolia may have been the source for the founding population for the New World. *Am. J. Hum. Genet.* **59**:204-212.



- MIGHELL, A.L.; MARKHAN, A.F.; ROBINSON, P.A. 1997. *Alu* sequences (mini-review). *FEBS Letters* **417**:1-5.
- NEI, M. 1972. Genetic distances between populations. *Am. Natl.* **106**:283-292.
- NETTLE, D. 1999. Linguistic diversity of the Americas can be reconciled with a recent colonization. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:3325-3329.
- NICHOLS, J. 1990. Linguistic diversity and the first settlement of the New World. *Language* **66**:475-521.
- NOVICK, G.E.; NOVICK, C.C.; YUNIS, J.; YUNIS, E.; MARTINEZ, K.; DUNCAN, G.; TROUP, G.; DEININGER, P.L.; STONEKING, M.; BATZER, M.; HERRERA, R. 1995. Polymorphic human specific *Alu* insertions as markers for human identification. *Electrophoresis* **16**:1596-1601.
- NOVICK, G.E.; BATZER, M.A.; DEININGER, P.L.; HERRERA, R.L. 1996. The mobile genetic element *Alu* in the human genome. *BioScience* **46**:32-41
- NOVICK, G.E.; NOVICK, C.C.; YUNIS, J.; YUNIS, E.; MAYOLO, P.A.; SCHEER, W.D.; DEININGER, P.L.; STONEKING, M.; YORK, D.S.; BATZER, M.A.; HERRERA, R.J. 1998. Polymorphic *Alu* insertions and the Asian origin of native american populations. *Human Biology* **70**:23-39.
- ORGEL, L.E.; CRICK, F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* **284**:604-607.
- ROGERS, R.A.; ROGERS, L.A.; MARTIN, L.D. 1992. How the opened: the peopling of the New World. *Hum. Biol.* **64**:281-302.
- ROGERS, J. 1983. Retroposons defined. *Nature* **301**:460.
- ROHLF, F. J. 1998. NTSYSpc Exeter Software.

- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- SCHMITT, R.; MUSCHNER, V.; FAGUNDES, N. J.R.; FREITAS, L.B.; BONATTO, S.L. and SALZANO, F.M.2000. O DNA mitocondrial e os índios Ache do paraguai. *Genetics and Molecular Biology* **23**:631.
- SMULEWICZ, M.N.; NOVICK, G.H.; HERRERA, R.J. 1998. Effects of *Alu* insertions on genes function. *Electrophoresis* **19**:1260-1264.
- STARIKOVSKAYA, Y.B.; SUKERNIK, R.I.; SCHURR, T.G.; KOGELNIK, A.M.; WALLACE, D.C. 1998. mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of ancient Beringia and the peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:1473-1491.
- SZATHMARY, E.J. 1979. Blood groups of Siberians, Eskimos and subartic and northwest coast Indians: the problem of origins and genetic relationships. In: *The first Americans: origins, affinities and adaptations*. W.S. Laughlin and A.B. Harper (eds.). Gustav Fischer, NewYork, pp 185-210.
- TORRONI, A.; SUKERNIK, R.I.; SCHURR, T.G.; STARIKOVSKAYA, Y.B.; CABELL, M.F.; CRAWFORD, M.H.; COMUZZIE, A.G.; WALLACE, D.C. 1993. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am. J. Hum. Genet.* **53**:591-608.
- VON STERNBERG, R.M.; NOVICK, G.E.; GAO, G.P.; HERRERA, R.J. 1992. Genome canalization: the coevolution of transposable and interspersed repetitive elements with single copy DNA. *Genetica* **86**:215-246.
- WALLACE, D.C. 1995. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging. *Am. J. Hum. Genet.* **57**:201-223.