

**VARIABILIDADE NA SEQÜÊNCIA DA
PORÇÃO 3'-UTR DO GENE LDLR EM POVOS
NATIVOS SUL-AMERICANOS**

NELSON JURANDI ROSA FAGUNDES

Orientadora: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Co-orientador: Dr. Sandro Luís Bonatto

**Relatório apresentado à Comissão de
Bacharelado do Departamento de Genética para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas, Ênfase em Genética - UFRGS.**

Porto Alegre, Janeiro de 1999.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Loreta, por me ensinar as principais técnicas de biologia molecular e estar sempre disposta a discutir (sobre tudo).

Ao Sandro, por ser muito mais do que um co-orientador, um exemplo, ou um cientista brilhante – um crítico de arte e quase um modelo de organização pessoal.

Ao Salzano, pela oportunidade no laboratório, além de ser um exemplo de cientista e estar sempre disposto a me emprestar bibliografias, checar "referências fantasmas", e conversar sobre vários assuntos no "café de sábado".

À minha namorada, Daisy, por todo o amor, carinho, e por me agüentar nos meus momentos insuportáveis.

A todos os colegas (e amigos) do laboratório 122, pela convivência e pelos vários galhos quebrados.

À minha mãe e ao André, pela leitura crítica minuciosa das primeiras versões deste relatório.

Aos professores Giancarlo Pasquali, Sídia M. Callegari-Jaques e Karen L. Haag, pela disposição em ajudar com técnicas, programas de análise e artigos.

A todas as outras pessoas que contribuíram de alguma forma para este relatório.

Introdução

1. O Povoamento das Américas

O continente americano foi o último a ser povoado pelo homem. Neste período recente, os povos que se espalharam por toda sua extensão exibiam, no momento da "descoberta", uma grande variedade de culturas adaptadas a cada ambiente ocupado por uma tribo. Após a chegada dos colonizadores europeus, cerca de 95% dos nativos americanos morreram (Cavalli-Sforza et al, 1994). Mesmo assim, vários grupos sobreviveram, e outros tiveram seus genes incorporados à sociedade colonial como escravos ou peões (Kern, 1998). Da mesma forma, foi muito significativa sua contribuição cultural, marcante na gênese de uma "cultura colonial", em oposição à metropolitana. Algumas dessas contribuições, que se mantêm entre nós, são o mate, as boleadeiras, diversas plantas medicinais além de um extenso vocabulário Guaraní (Kern, 1998). Portanto, a diversidade cultural e biológica dos povos nativos americanos é um dos temas mais interessantes em evolução humana (Salzano e Callegari-Jaques, 1988).

Os modelos para o povoamento das Américas exibem uma grande diversidade. Um dos únicos pontos em comum é a proposição de uma ancestralidade fundamentalmente asiática, embora alguns autores sugiram a contribuição de populações polinésias (ver Cann, 1994) ou proto-Caucasóides (Brown et al., 1998). Os pontos de maior debate, porém, são o número de ondas migratórias, o tamanho da população fundadora, a data de entrada no continente e qual população representa melhor o ancestral dos nativos americanos.

Entre os modelos mais debatidos sobre o povoamento das Américas está o de Greenberg et al. (1986). Baseado em evidências lingüísticas que separavam os nativos americanos em Ameríndios, Na-Dene e Esquimó-Aleuta, (Greenberg, 1979), estes autores propuseram, adicionando dados genéticos e dentais, que cada grupo corresponderia a uma migração distinta, sendo os Ameríndios os mais antigos (>11.000 anos atrás), seguidos pelos Na-Dene (9.000 anos atrás) e finalmente pelos Esquimós (4.000 anos atrás). Ao longo do

tempo, este modelo sofreu duras críticas e muitas modificações. Diamond (1990) considera absurda a classificação lingüística de Greenberg. Da mesma forma, estudos genéticos mais aprofundados não deram suporte ao modelo das três ondas.

Outra evidência clássica que sugeria um povoamento recente do Novo Mundo é baseado na datação de vários sítios arqueológicos norte americanos (complexo Clovis), de 11.500 anos atrás, que representariam os restos dos primeiros habitantes do novo mundo: indígenas caçadores de grandes animais de pradaria (Steele e Powel, 1993). Esta visão tradicional também foi criticada por vários arqueólogos (ver Meltzer, 1993 e Roosevelt et al., 1996). Alguns autores sugeriam que os primeiros habitantes do continente seriam caçadores-coletores florestais que penetraram no continente ~25.000 anos atrás seguindo uma rota costeira (Rogers et al., 1992 e Prous, 1995). Segundo esses autores, não existem sítios arqueológicos porque estes foram submersos com a elevação do nível do mar. O descrédito do modelo de Clovis veio com a aceitação do sítio de Monte Verde, no sul do Chile, datado de 13.000 anos atrás (Meltzer, 1997).

1.1. O DNA mitocondrial (mtDNA)

Os estudos com DNA mitocondrial (mtDNA) têm proposto cenários muito distintos, baseados, inicialmente, na identificação de 4 haplogrupos principais. Horai et al. (1993) propuseram que cada haplogrupo migrou separadamente, sendo que a primeira migração ocorreu entre 14.000 e 21.000 anos atrás. Torroni et al. (1992) propuseram duas migrações para os Ameríndios e uma outra para os Na-Dene, porém, a idade da primeira migração foi elevada para ~30.000 anos atrás. De uma forma geral, todos estes modelos compartilham a idéia de que a diversidade genética apresentada pelas tribos atuais é extrínseca ao continente, isto é, foi gerada ainda no continente asiático e transferida para o continente americano durante a ocupação.

No outro extremo estão os estudos de Merriwether et al. (1995) e Bonatto e Salzano (1997a, 1997b) que propõem uma única onda migratória para a colonização da Beríngia, a ponte de terra que ligava a Ásia à América. Estes últimos autores se baseiam nos estudos de Szathmary (1984, 1993a,

1993b, 1996) e propõem uma entrada antiga no continente (entre 30.000 e 40.000 anos atrás) com a posterior diferenciação entre os grupos. A diversidade, portanto, passa a ser intrínseca ao continente americano.

Outro ponto controverso é qual população asiática representa melhor os ancestrais dos nativos americanos. Embora essa seja uma pergunta difícil, devido à evolução dos povos asiáticos desde 30.000 anos atrás (Crawford et al., 1997), várias hipóteses foram formuladas. Torroni et al. (1994) sugeriram que as populações ancestrais são mais relacionadas com populações tibetanas. No entanto, outros pesquisadores (Merriwether et al. 1996 e Kolman et al, 1996) sugerem um parentesco maior com populações da Mongólia. Finalmente, ainda há autores que sugerem uma contribuição maciça de populações siberianas adjacentes à Beríngia (Starikovskaya et al., 1998).

1.2. O cromossomo Y

Recentemente, diversos trabalhos envolvendo a variação no cromossomo Y foram desenvolvidos. Em parte, porque o cromossomo Y é a contrapartida ideal para o mtDNA, pois cada um deles, isoladamente, revela uma história uniparental. Até o momento, os trabalhos publicados apontam para um forte efeito fundador no cromossomo Y (Pena et al., 1995; Underhill et al., 1996 e Bianchi et al., 1997), tanto para os Ameríndios da América do Norte quanto para os da América do Sul (Santos et al., 1996). As Américas, portanto, parecem ter sido povoadas por um conjunto bastante limitado de seqüências (Lell et al., 1997).

Este marcador já está sendo utilizado para responder questões mais específicas do povoamento. Karafet et al. (1997) afirmam que os dados de cromossomo Y não suportam uma origem tibetana para os nativos americanos.

1.3. Outros marcadores

Embora não falem hipóteses sobre o povoamento das Américas, os trabalhos mais recentes vêm utilizando apenas marcadores moleculares uniparentais. Esses marcadores sempre revelarão apenas a história de uma linhagem, além de representarem um único loco. É desejável que também se utilizem marcadores bi-parentais, que podem revelar outros dados sobre o

problema com o qual estamos trabalhando, como, por exemplo, a dinâmica de miscigenação entre tribos, deixando o entendimento sobre a história evolutiva de nossa espécie mais completo.

No entanto existem poucos trabalhos publicados que utilizam qualquer seqüência nuclear para resolver problemas evolutivos humanos complexos (ver Harding et al., 1997). Isso se deve, em parte, à baixa taxa de evolução do genoma nuclear quando comparado ao mtDNA, que faz com seja necessário o seqüenciamento de muitos pares de base para se encontrar alguma variação, e pela presença possível de recombinações, o que não existe no mtDNA nem no cromossomo Y.

2. Inserções *Alu*

As inserções *Alu* são uma família de retroposons exclusiva de primatas, e representam de 6-13% do genoma humano (Mighell et al., 1997). Estas inserções se distribuem ao longo de todo o genoma diplóide e possuem, em média, 300 pb. (Schmid & Jelinek, 1982), tendo se originado do gene 7SL, com promotor para RNA-pol-III (Mighell et al., 1997). Desde que começaram a ser investigadas, diversos autores apontaram a possível utilidade desses elementos em estudos de evolução humana (ver Perna et al., 1992).

Segundo Shen et al. (1991), houve várias "ondas" de amplificação a partir de alguns poucos genes mestre, isto porque a grande maioria das inserções é inativa. Então subfamílias podem ser formadas quando mutações ocorrem em um gene mestre. A acumulação de mutações diagnósticas em diferentes subfamílias sugere que há uma linhagem seqüencial de genes mestre, e que um elemento inativo pode tornar-se um gene mestre por mutação e retroposição, originando uma nova sub-família.

Outra característica relevante é a função que estas inserções podem possuir no genoma. A visão mais clássica (Maynard-Smith & Szathmary, 1995) sugere que as inserções são "DNA egoísta" e neutras para seu "hospedeiro". Porém, devido ao grande número de inserções no genoma (cerca de 1 a cada 3-5 kb. – Mighell et al., 1997), alguns autores propõem que algumas delas podem ser seletivamente vantajosas. Porém, estas possíveis vantagens podem

não passar de exaptações (Gould, 1997), isto é, estruturas que possuam hoje uma função diferente daquela pela qual evoluiu.

Principalmente devido à neutralidade das inserções e levando em conta que algumas são tão recentes que são polimórficas quanto à presença/ausência em populações humanas (Perna et al., 1992), vários trabalhos têm sido realizados para corroborar a origem africana do *Homo sapiens* moderno e o tamanho da população original (Batzer et al., 1994; Batzer et al., 1996; Stoneking et al., 1997 e Sherry et al., 1997). A importância destes marcadores na questão do povoamento das Américas está sendo investigada em nosso laboratório.

Da mesma forma, a propriedade das inserções *Alu* em acumular mutações poderia transformá-las em candidatas naturais a uma abordagem por seqüenciamento. Infelizmente, parece que, na grande maioria dos casos, a diversidade nucleotídica encontrada é muito baixa (Knight et al., 1996).

Recentemente, porém, foi encontrada (Prescott Deining, com. pess.) uma região de cerca de 1 kb na porção 3' não-traduzida (3'-UTR) do gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR), que possui dois elementos *Alu* completos e um parcial, cuja diversidade nucleotídica é extraordinariamente alta se comparada a outros locos nucleares e comparável àquela apresentada pelo mtDNA. Esta região, portanto, carece de um estudo mais aprofundado que investigue sua utilidade no estudo de problemas evolutivos humanos.

3. O gene LDLR e as porções 3'-UTR

O gene LDLR está localizado no braço curto do cromossomo 19 (p13.1-p13.3) e possui 18 exons distribuídos em 45kb (Goldstein et al., 1995). Este gene é rico em inserções *Alu*, 1 a cada 1,6 kb, o que é duas vezes mais do que a média do genoma (Goldstein et al., 1995). Este grande número de inserções pode ser responsável pela ocorrência de grandes deleções no gene, originadas por recombinação (Toda & Tomita, 1997) que causam hipercolesterolemia.

O mRNA desse gene possui 5,3 kb e possui uma porção 3'-UTR de 2,6 kb, que possui, como já dito, dois elementos *Alu* completos e um parcial. O papel da porção 3'-UTR desse gene não é bem entendido.

De uma forma geral, essas estruturas são muito importantes para o bom funcionamento do mRNA (Kleimann et al., 1998; Hagele et al., 1998 e Chen et al., 1998a). Em alguns genes eucarióticos, elas são importantes para o transporte pelo citoplasma (Alberts et al., 1994). Em outros casos, elas podem conter um *enhancer* traducional (Chung et al., 1998), um motivo controlador da fertilidade (Wirsal et al., 1998), um repressor de tradução (Gallegos et al., 1998) ou mesmo auxiliar na regulação de ritmos circadianos (Chen et al., 1998b).

Levando em conta o que foi apresentado acima, somado ao relato de Fischer et al. (1993) sobre uma forma solúvel do LDLR que atua como um anti-viral, e que, portanto, poderia sofrer uma pressão seletiva para uma alta variabilidade (Alec Knight, com. pess.), pode-se colocar em dúvida a neutralidade da porção 3'-UTR do gene LDLR. Em um estudo evolutivo, é muito importante que saibamos se o marcador que utilizamos é neutro ou possui algum valor seletivo.

Porém, até o momento, não há nenhuma evidência que suporte a idéia de que possa haver influência da porção 3'-UTR do gene LDLR sobre o metabolismo dos lipídeos. Das 127 mutações de ponto conhecidas por causar a hipercolesterolemia familiar nenhuma se localiza na porção 3'-UTR nem em nenhum outro ponto do exon 18, responsável pela codificação dessa porção (Goldstein et al., 1995).

Objetivos

Este trabalho teve por objetivos investigar a diversidade na seqüência da porção hipervariável 3'-UTR do gene LDLR em Nativos Americanos e avaliar sua utilidade no estudo de problemas evolutivos humanos recentes, como o povoamento das Américas, além de contribuir para o melhor entendimento da diversidade genética dos povos nativos americanos e sua origem.

Material e Métodos

1. Amostras

Foram utilizadas amostras de DNA de indivíduos das tribos Ache (n=7), Gavião (n=6), Suruí (n=6), Zoró (n=6), Xavante (n=6) e Wai Wai (n=5) (ver Hill & Hurtado, 1996 para Ache, e Bevilaqua et al., 1995 para as demais tribos); totalizando 36 indígenas sul-americanos. A localização geográfica das tribos está representada na figura 1. Essas tribos compreendem três grandes famílias lingüísticas da América do Sul: Tupi-Guarani (Ache), Tupi-Mondé (Gavião, Suruí e Zoró), Gê (Xavante) e Parukoto-Charumã – Carib (Wai Wai). Os indivíduos foram escolhidos de maneira aleatória. Cabe aqui ressaltar que esta não é uma análise populacional, ao contrário, preferimos fazer uma estimativa, a partir dos haplótipos mais freqüentes, da variabilidade existente nessas tribos.

2. Amplificação por PCR

A região de estudo foi amplificada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Mullis et al. 1986) utilizando *primers* específicos para a porção central da região 3'-UTR do gene LDLR que contém as inserções *Alu*. Toda a porção foi amplificada em dois fragmentos independentes, chamados Alu U (por conter o elemento *Alu* U) e Alu D (por conter este outro elemento). Na figura 2a encontramos a seqüência dos *primers* utilizados. Os sítios de anelamento dos mesmos estão representados na figura 2b.

As reações foram realizadas com 1µl de DNA total 25x diluído, 2µM de cada *primer*, 2µM de dNTP's, tampão 1x (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), e 0,75 U de Taq DNA Polimerase (Cenbiot-Enzimas); em um total de 20µl, submetidas a 40 ciclos idênticos de 94°C 1min, 60°C (Alu U) ou 65°C (Alu D) 2 min e 72°C 2 min, com uma extensão final de 72°C 5 min. O sucesso das amplificações foi checado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) corado com brometo de etídio (EtBr).

Para o seqüenciamento, 5 µl das reações realizadas com sucesso foram purificadas enzimaticamente com 2 U de Fosfatase Alcalina e 10 U de Exonuclease I (37°C 15 min, 80°C 15 min).

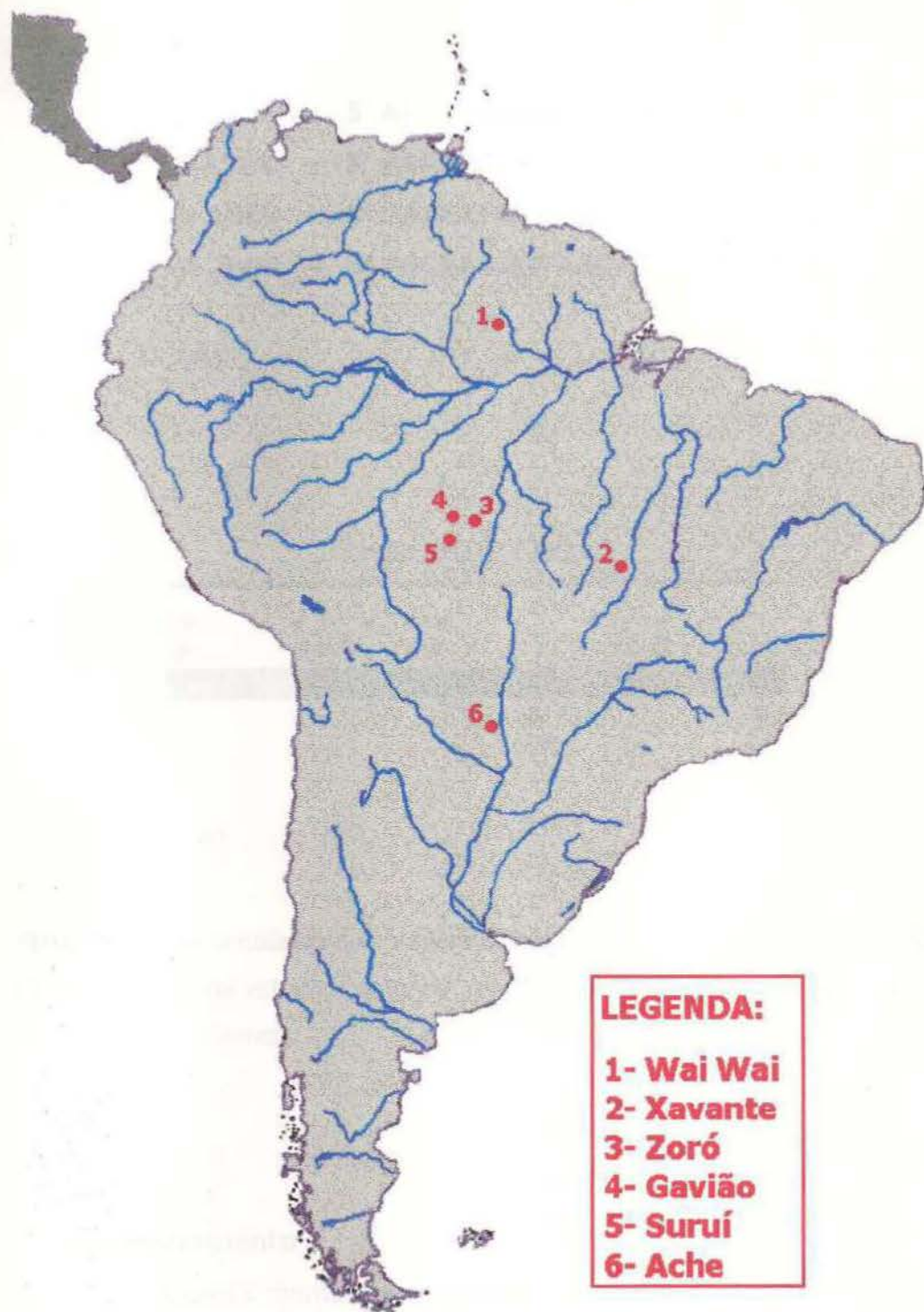
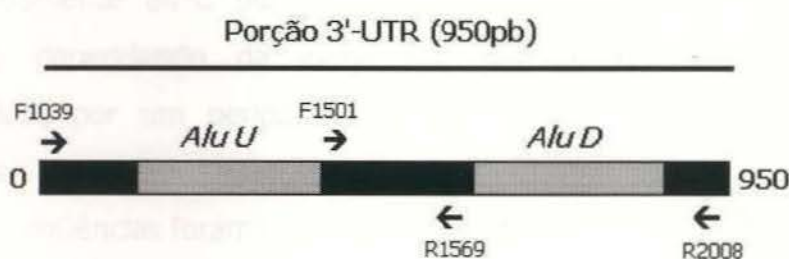


FIGURA 1: Mapa da América do Sul com a localização das tribos estudadas (1- $58^{\circ}00'W$ $00^{\circ}40'S$, 2- $51^{\circ}40'W$ $13^{\circ}20'S$; 3- $60^{\circ}20'W$ $10^{\circ}20'S$; 4- $61^{\circ}08'W$ $10^{\circ}10'S$; 5- $61^{\circ}10'W$ $10^{\circ}50'S$; 6- $58^{\circ}00'W$ $23^{\circ}00'S$)

F 1039	–	5' ACTTCAAAGCCGTGATCGTGA	3'
F 1501	–	5' ACCATGCATGGTGCATCAGCA	3'
R 1569	–	5' CATAATCATAGCTCACGACAGC	3'
R 2008	–	5' TGCAACAGTAACACGGCGATT	3'

(A)



(B)

FIGURA 2: (A) Sequência dos primers utilizados para amplificação e seqüenciamento. (B) Fragmento de estudo, contendo os dois elementos *Alu* completos e o sítio de anelamento dos primers.

3. Seqüenciamento

O seqüenciamento foi feito pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., 1977). Primeiramente, utilizou-se o kit comercial Sequenase 2.0 (USB) com marcação radioativa com S^{35} . No entanto, esse kit não se mostrou eficiente para nenhum dos fragmentos amplificados. Devido a este fato, testamos o kit comercial Thermo Sequenase (Amersham-Life Science) com marcação radioativa terminal com P^{33} . Este kit faz a reação em ciclos, como numa PCR, e, portanto, exige uma quantidade inicial de DNA de boa qualidade

muito menor, mostrou-se muito eficiente para o fragmento Alu D, mas não para o fragmento Alu U (ver discussão).

Após a reação, as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel desnaturante (uréia 7M) de acrilamida 6% em tampão tolerante ao glicerol (GTB). Para otimizar a leitura das seqüências, adicionamos Acetato de Potásio (KAc) 0,42M no tampão da cuba inferior. Esta técnica cria um gradiente salino de baixo para cima, no gel, que aumenta a compressão das bandas, possibilitando, assim, uma leitura até 50 pb mais longa.

Os géis, então, foram fixados por 1h em uma solução 15% metanol – 15% ácido acético, lavados rapidamente, e secados em estufa a aproximadamente 80°C por 2h. Terminado este processo, os géis foram expostos, dependendo da idade do material radioativo, contra filmes radiográficos por um período de 7 a 14 dias, quando finalmente foram revelados.

As seqüências foram lidas manualmente com o auxílio do programa Gelin (Sherry, 1991).

4. Análise dos Dados

Para a análise das relações entre as seqüências encontradas, construímos manualmente uma rede de expansão mínima (*minimum spanning network* – Bandelt et al., 1995). Esta abordagem permite a representação do esquema filogenético mais parcimonioso e não-enraizado para as seqüências analisadas e é preferível à construção de cladogramas quando há pouca informação disponível e não se pode enraizar o cladograma. Além disso, pode-se representar mais fidedignamente uma situação na qual várias seqüências são derivadas de um mesmo ancestral (Gonzales et al., 1998).

Resultados e Discussão

O insucesso no seqüenciamento do Alu U, com o kit utilizado para o Alu D, não deve estar na reação de seqüenciamento em si, mas sim na própria seqüência, que parece se comportar como "heteroplásmica", isto é, um mesmo indivíduo possui muitas mutações somáticas (principalmente na cauda poli-(A), de modo a apresentar muitas cópias diferentes desta seqüência, impossibilitando o seqüenciamento direto do produto de PCR. Possivelmente, este problema ocorre apenas para o Alu U pois este parece ser mais variável do que o Alu D (Prescott Deininger, com. pess.)

O seqüenciamento de um produto diplóide possibilita encontrar indivíduos heterozigotos, ainda mais sendo essa uma região muito variável. A metodologia empregada permitiu a identificação de indivíduos heterozigotos para os sítios polimórficos sem problemas. Na figura 3 vemos uma fotografia da autorradiografia de um seqüenciamento, onde percebe-se claramente o indivíduo heterozigoto. Dos 36 indivíduos analisados, 23 (84%) se mostraram heterozigotos para a região em estudo.

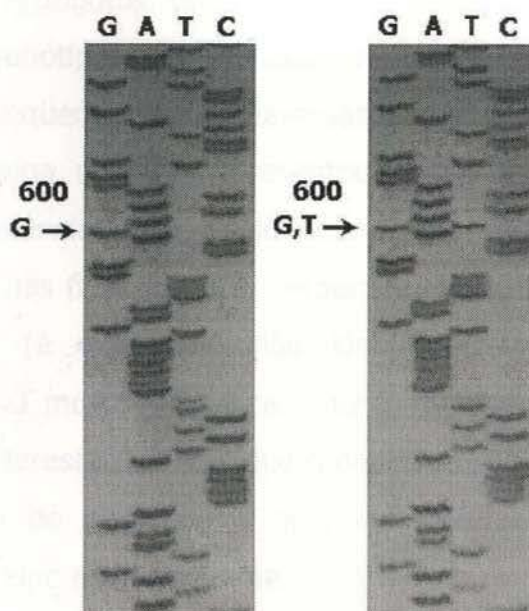


FIGURA 3: Fotografia de autorradiografia de seqüenciamento. Esquerda: indivíduo homocigoto para o sítio 600. Direita: indivíduo heterocigoto para o mesmo sítio.

Foram identificados três sítios polimórficos, sendo duas transições (510 T→C e 743 C→T) e uma transversão (600 G→T). Com base nestes sítios foi possível identificar 4 haplótipos distintos, que estão representados na tabela 1.

TABELA 1: Haplótipos encontrados com base nos três sítios polimórficos identificados

	510	600	743
Haplótipo 1	T	G	C
Haplótipo 2	T	G	T
Haplótipo 3	C	T	C
Haplótipo 4	C	G	C

Porém, justamente por estarmos seqüenciando um produto diplóide, indivíduos heterozigotos para dois ou três sítios não puderam ter seus haplótipos (e genótipos) determinados. Na tabela 2 estão os genótipos de todos os indivíduos seqüenciados. É interessante que mesmo que a amostra de cada tribo seja pequena, nenhuma apresentou fixação de algum haplótipo.

As freqüências dos haplótipos e dos genótipos encontrados estão representadas nas figuras 4 e 5, respectivamente. É notável o grande número de haplótipos (e genótipos) não identificados (~33% da amostra). Os haplótipos 1 e 3 mostraram-se os mais freqüentes. Quanto à distribuição dos genótipos, é interessante notar que o haplótipo 3 só apareceu em homozigose, diferentemente do haplótipo 1 que, em heterozigose com o haplótipo 2, compõe o genótipo mais freqüente.

TABELA 2: Sequências encontradas para todos os indivíduos analisados. Genótipos que não puderam ser definidos foram representados por ?.

Indivíduo	510 (T)	600 (G)	743 (C)	Genótipos
A03	.	.	T	2 / 2
A07	T,C	G,T	C,T	?
A10	T,C	G,T	C,T	?
A16	C	T	.	3 / 3
A19	C	T	.	3 / 3
A24	T,C	G,T	C,T	?
A37	C	T	.	3 / 3
G04	.	.	C,T	1 / 2
G11	.	.	C,T	1 / 2
G17	T,C	G,T	.	?
G24	T,C	G,T	.	?
G30	C	T	.	3 / 3
G58	T,C	.	.	1 / 4
S04	C	T	.	3 / 3
S09	C	T	.	3 / 3
S10	C	.	.	4 / 4
S12	.	.	.	1 / 1
S19	T,C	G,T	.	?
S24	T,C	G,T	.	?
W08	T,C	G,T	.	?
W12	T,C	G,T	.	?
W14	T,C	G,T	C,T	?
W17	C	T	.	3 / 3
W28	C	T	.	3 / 3
X02	.	.	C,T	1 / 2
X06	.	.	C,T	1 / 2
X10	.	.	.	1 / 1
X13	.	.	C,T	1 / 2
X26	.	.	C,T	1 / 2
X31	T,C	G,T	.	?
Z06	.	.	T	2 / 2
Z12	.	.	C,T	1 / 2
Z18	T,C	.	.	1 / 4
Z19	.	.	C,T	1 / 2
Z23	T,C	G,T	.	?
Z28	.	.	C,T	1 / 2

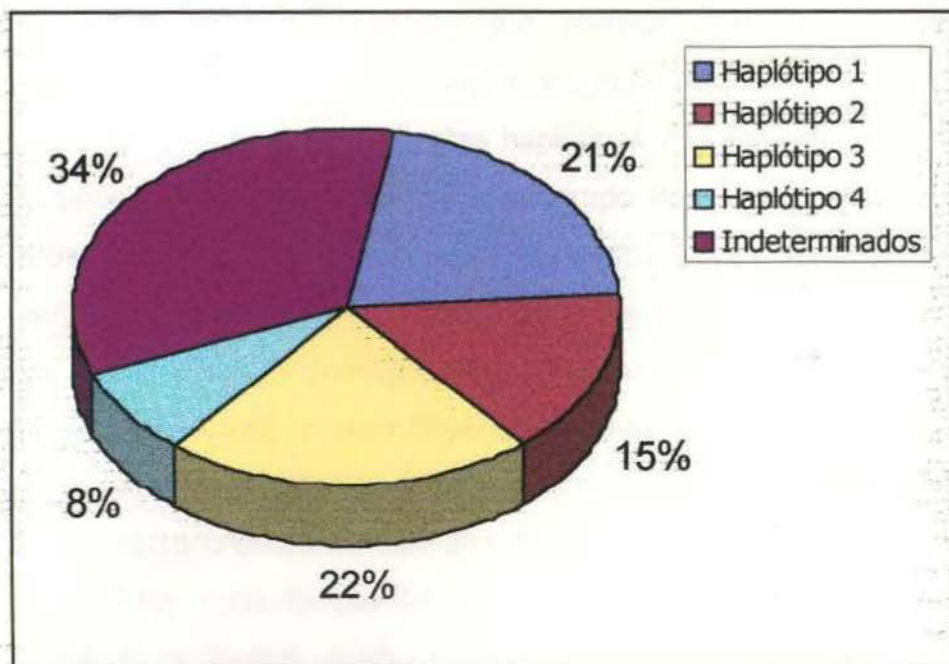


FIGURA 4: Frequências dos haplótipos encontrados

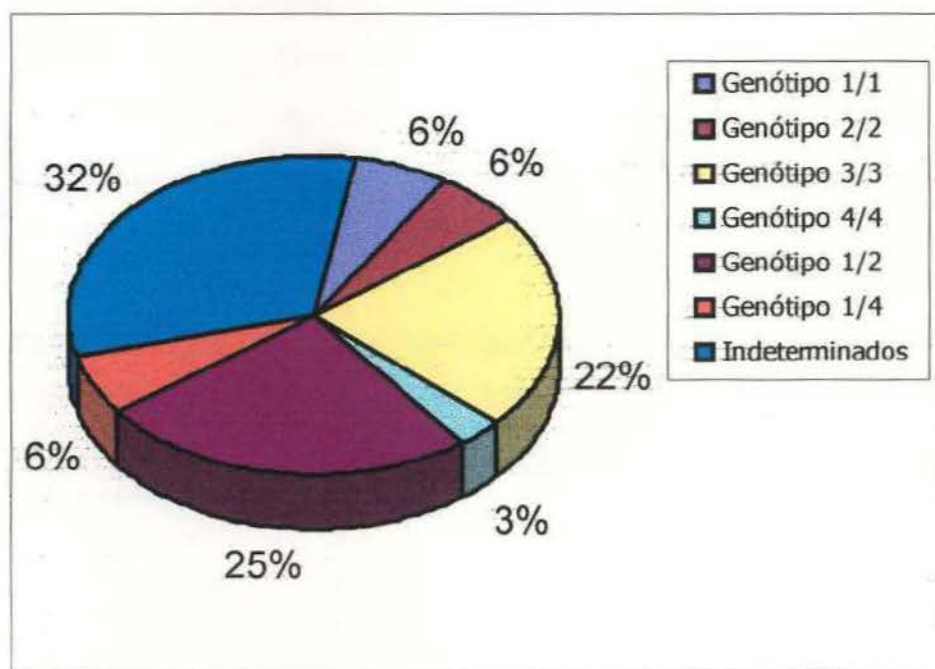


FIGURA 5: Frequências dos genótipos encontrados

Um fato interessante, que merece destaque, é a ausência de heterozigotos entre os dois haplótipos mais freqüentes (1/3). Isso pode ser explicado pelo fato de que estes haplótipos diferem entre si por 2 pb. Assim, qualquer heterozigoto 1/3 cairia no grupo dos não identificados. É bastante provável, então, que grande parte desse grupo seja formado por heterozigotos para esses haplótipos. Da mesma forma, heterozigotos 2/3 e 2/4 não puderam ser identificados. O genótipo 3/4 foi o único que não foi encontrado, embora a técnica empregada o permitisse. Levando-se em conta que o haplótipo 4 é o menos freqüente, esse genótipo (3/4) deve ser raro o suficiente para não ter sido detectado com o número amostral utilizado.

Para a construção da rede de expansão mínima (*minimum spanning network*) utilizamos, além dos quatro haplótipos descritos acima, os outros encontrados pelo grupo do Dr. Prescott Deiningner (com. pess.). Em um trabalho bastante preliminar, eles seqüenciaram toda a porção de interesse, utilizando a técnica de clonagem. Foram seqüenciados 7 indivíduos de diferentes etnias e um indivíduo de etnia desconhecida cuja seqüência já havia sido publicada. Porém, apenas 1 clone de cada indivíduo foi seqüenciado, o que eliminou a possibilidade de detecção de heterozigotos. Para comparação, alinhemos apenas as seqüências do Alu D. Os sítios polimórficos resultantes deste alinhamento podem ser vistos na tabela 3.

TABELA 3: Comparação dos haplótipos encontrados no presente trabalho com outros já descritos (Dr. Prescott Deiningner, com. pes.).

	499	510	600	603	743	781	917	920	928
1-ameríndio	G	T	G	A	C	T	A	-	A
2-ameríndio	T
3-ameríndio	.	C	T
4-ameríndio	.	C
5-publicado	.	C	.	.	T	.	.	A	.
6-afro-americano	C	.	.	.
7-indiano	T	.	G	.	-
8-inuit	T
9-nova-guiné	A	.	.	.	T
10- pigmeu	.	C	T
11- esquimó	.	C	T	G
12- indonésio	.	C	T

Analisando a tabela, nota-se que os três sítios polimórficos presentes nos Nativos americanos já haviam sido encontrados em outros indivíduos de diferentes etnias. Portanto, os Nativos americanos estudados apresentam, para este marcador, apenas uma parte da variação global (3 sítios polimórficos dos 9 sabidos). Em segundo lugar, podemos observar que os haplótipos 1 e 4 ainda não haviam sido encontrados em nenhum indivíduo. Por outro lado, os haplótipos 2 e 3 sim. Obviamente, só quando dispusermos de toda a seqüência de interesse é que poderemos ter certeza da igualdade entre dois haplótipos. Por hora, esses haplótipos serão tratados como se fossem realmente idênticos.

A constatação de que os nativos americanos exibem apenas uma parte da variação global permite supor, primeiramente, que as demais tribos da América do Sul, como um todo, sejam compostas majoritariamente por estes quatro haplótipos (não necessariamente todos eles), principalmente se admitirmos a existência de um efeito gargalo de garrafa durante a colonização das Américas ou da América do Sul, conforme indicam resultados obtidos com mtDNA (Bonatto e Salzano, 1997b) e cromossomo Y (Santos et al., 1996). Apesar de terem sido analisados poucos indivíduos por tribo, todas apresentaram mais de um haplótipo, e nenhum haplótipo é restrito a uma tribo.

Outro ponto interessante é saber quais haplótipos foram trazidos com os primeiros habitantes e quais surgiram já nas Américas. Os haplótipos 2 e 3, que são compartilhados com outras populações devem representar o primeiro tipo. Porém, os haplótipos 1 e 4 podem ser exclusivos dos nativos americanos.

Sem dúvida, outros haplótipos para esta região podem surgir quando houver uma maior amostragem. O que temos de verificar é a abundância desses outros haplótipos e qual a sua posição filogenética em relação aos demais, para que saibamos se é um haplótipo originário das Américas ou de outra parte do globo.

Outra estratégia importante para estimarmos com mais exatidão o conjunto de seqüências fundadoras é analisar populações americanas pré-colombianas. Estudos desse tipo com o mtDNA (Monsalve et al., 1996; Ribeiros-dos-Santos et al., 1996 e Stone & Stoneking, 1998) revelam um outro

haplogrupo, mais raro, que provavelmente foi perdido ou reduzido a frequências mínimas em tribos contemporâneas.

A idéia de que o Continente Americano foi fundado por um número limitado de linhagens está de acordo com os dados para o cromossomo Y (Pena, et al., 1995; Santos et al., 1996; Underhill et al, 1996; Bianchi et al., 1997; Lell et al., 1997 e Bianchi et al., 1998) e com os de mtDNA (Forster et al, 1996 e Bonatto e Salzano, 1997b), embora alguns autores discordem para este último marcador (Baillet et al., 1994 e Merriwheter et al., 1995). Esse número limitado de haplótipos poderia ser devido a uma população fundadora pequena ou geneticamente bastante homogênea.

Com base no alinhamento apresentado na tabela 3, foi construída a rede de expansão mínima (figura 6). O compartilhamento de haplótipos por indivíduos de etnias tão distintas quanto ameríndios (3) e pigmeus (10) pode ser resultado da retenção, por parte dos primeiros, de um haplótipo mais ancestral. A retenção de haplótipos ancestrais ocorre também com o mtDNA. Em filogenias geradas com este tipo de dado, é comum encontrar dois indivíduos não aparentados que são mais próximos entre si do que eles em relação a outros de seu conjunto étnico (ver Vigilant et al., 1991; Horai et al., 1993 e Stoneking, 1993).

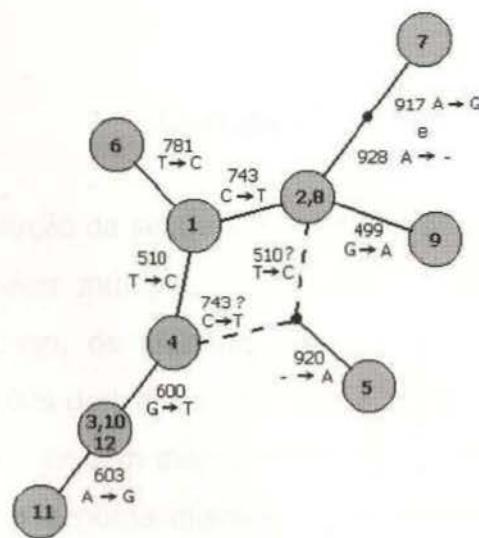


FIGURA 6: Rede de expansão mínima (*minimum spanning network*) envolvendo os haplótipos encontrados neste trabalho e pelo Dr. Prescott Deiningger (com. pess.). Os números no esquema correspondem aos da TABELA 3.

Uma outra característica das populações humanas detectada com o mtDNA que pode ser inferida aqui para os Ameríndios, é que todas as populações não-africanas foram fundadas por seqüências de origens múltiplas, sendo, portanto, polifiléticas (Cann et al., 1987). Conforme vemos na rede, isso parece ser verdadeiro também para os ameríndios.

Uma outra propriedade de seqüências muito variáveis, como o mtDNA, é a existência de sítios hipervariáveis, isto é, que mutaram mais de uma vez na mesma direção, representando homoplasias. No marcador estudado, esse parece ser o caso dos sítios 510 ou 743 (figura 6).

De uma maneira geral, as homoplasias complicam bastante a reconstrução filogenética de um grupo (Avise, 1994). Logo, é necessário que possamos separar quais as mutações são homoplásicas e quais ocorreram uma única vez. Isso pode ser feito se compararmos várias populações diferentes, sabendo a relação filogenética entre elas. Através deste tipo de abordagem podemos estimar quando uma mutação paralela ocorreu e podemos perceber em que grupos ela é única. Sabendo isso, podemos propor a existência de sub-grupos dentro de uma linhagem, como já foi feito para o mtDNA (Baillet et al., 1994 e Forster et al., 1996).

Conclusão

O modo de evolução da seqüência estudada se assemelha, em parte, ao do mtDNA. Parece haver múltiplas seqüências fundadoras para povos não-africanos como, no caso, os ameríndios, além da retenção de seqüências ancestrais em populações derivadas. Também é notável que a variabilidade da região estudada pareça ser bem menor do que a do mtDNA, mas maior do que a de outras regiões do genoma diplóide. Cabe ressaltar que a parte que se estima ser a mais variável não pôde ser seqüenciada. Outro ponto relevante é a existência de sítios hipervariáveis, que devem ser analisados com cuidado. A identificação desses sítios, bem como o conhecimento de sua distribuição nas

diferentes populações é necessária para que eles possam ser úteis em uma abordagem evolutiva.

Uma vez que apenas 3 dos 9 sítios polimórficos foram encontrados, os dados obtidos até o momento parecem suportar o fato que as Américas foram colonizadas por um conjunto genético limitado. Cabe ressaltar que apenas a região menos variável do marcador pôde ser utilizada. O seqüenciamento do Alu U poderá nos dar muito mais informação sobre os haplótipos presentes nos nativos americanos.

A partir dos dados apresentados, podemos concluir que o marcador em estudo é útil como uma nova ferramenta para o entendimento dos processos evolutivos recentes de nossa espécie, como é o caso do povoamento das Américas. Novos estudos, incluindo mais populações americanas, bem como populações de outras partes do globo (principalmente centro-asiáticas) e a porção Alu U certamente trarão uma grande contribuição ao nosso entendimento sobre evolução humana.

Referências Bibliográficas

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K & WATSON, J. D. 1994. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing: New York. p. 459.
- AVISE, J. C. 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman & Hall: London. 511p.
- BAILLET, G.; ROTHHAMMER, F.; CARNESE, F. R.; BRAVI, C. M. & BIANCHI, N. O. 1994. Founder mitochondrial haplotypes in amerindian populations. **Am. J. Hum. Genet.** **54**: 27-33.
- BANDELT, H-J.; FORSTER, P.; SYRES, B. C. & RICHARDS, M. B. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. **Genetics** **141**: 743-753.
- BATZER, M. A.; ARCOT, S. S.; PHINNEY, J. W.; ALEGRIA-HARTMANN, M.; KASS, D. H.; MILLIGAN, 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.
- BATZER M. A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMANN, M.; BAZAN, H.; KASS, D. H.; SHAIKH, T. H.; NOVIK, G. E.; IOANNOU, P. A.; SCHEER, W. D.; HERRERA, R. J. & DEININGER, P. L. 1994. African origin of human-specific polymorphic *Alu* insertions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**: 12288-12292.
- BEVILAQUA, L. R. M.; MATTEVI, V. S.; EWALD, G. M.; SALZANO, F. M.; COIMBRA, C. E. A.; SANTOS, R. V. & HUTZ, M. H. 1995. Beta-globin gene cluster haplotype distribution in five brazilian indian tribes. **Am. J. Phys. Anthropol.** **98**: 395-401.
- BIANCHI, N. O.; CATANESI, C. I.; BAILLET, G.; MARTINEZ-MARIGNAC, V. L.; BRAVI, C. M.; VIDAL-RIOJA, L. B.; HERRERA, R. J. & LOPEZ-CAMELO, J. S. 1998. Characterization of ancestral and derived Y-chromosome haplotypes of New World native populations. **Am. J. Hum. Genet.** **63**: 1862-1871.

- BIANCHI, N. O.; BAILLET, G.; BRAVI, C. M.; CARNESE, R. F.; ROTHHAMMER, F.; MARTINEZ-MARIGNAC, V. I. & PENA, S. D. J. 1997. Origin of amerindian Y-chromosomes as inferred by the analysis of six polymorphic markers. **Am. J. Phys. Anthrop.** **102**: 79-89.
- BONATTO, S. L. & SALZANO, F. M. 1997a. 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.
- BONATTO, S. L. & SALZANO, F. M. 1997b. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **94**: 1866-1871.
- BROWN, M. D.; HOSSEINI, S. H.; TORRONI, A.; BANDELT, H-J.; ALLEN, J. C.; SCHURR, T. G.; SCOZZARI, R.; CRUCIANI, F. & WALLACE, D. C. 1998. mtDNA haplogroup X: an ancient link between Europe/western Asia and North America? **Am. J. Hum Genet.** **63**: 1852-1861.
- CANN, R. L. 1994. mtDNA and native americans: a southern perspective. **Am. J. Hum. Genet.** **55**: 7-11
- CANN, R. L.; STONEKING, M. & WILSON, A. C. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature** **325**: 31-36.
- CAVALLI-SFORZA, L. L.; PIAZZA, A. & MENOTTI, P. 1994. **History and Geography of Human Genes**. Princeton Univ. Press: Princeton. pp 302-342.
- CHEN, R.; SILVER, D. L. & DE BRUIJN, F. J. 1998a. Nodule parenchyma-specific expression of the sesbania rostrata early nodulin gene SrEnod2 is mediated by its 3' untranslated region. **Plant Cell** **10**: 1585-1602.
- CHEN, Y.; HUNTER-ENSOR, M.; SCHOTLAND, P. & SEHGAL, A. 1998b. Alterations of per RNA in noncoding regions affect periodicity of circadian behavioral rhythms. **J. Biol. Rhythms.** **13**: 364-379.

- CHUNG, D. J.; WRIGHT, A. E. & CLERCH, L. B. 1998. The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. **Biochemistry** **37**: 16298-16306.
- CRAWFORD, M. H.; WILLIAMS, J. T. & DUGGIRALA, R. 1997. Genetic structure of the indigenous populations of Siberia. **Am. J. Phys. Anthropol.** **104**: 177-192.
- DIAMOND, J. M. 1990. The speak of the Americas. **Nature** **344**: 589-590.
- FISCHER, D. G.; TAL, N.; NOVICK, D.; BARAK, S. & RUBINSTEIN, M. 1993. An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon. **Science** **262**: 250-253.
- FORSTER, P.; HARDING, R.; TORRONI, A. & BANDELT, H.-J. 1996. Origin and evolution of native american mtDNA variation: a reappraisal. **Am. J. Hum. Genet.** **59**: 935-945.
- GALLEGOS, M.; AHRINGER, J.; CRITTENDEN, S. & KIMBLE, J. 1998. Repression by the 3'UTR of *fem-3*, a sex-determining gene, relies on a ubiquitous *mog*-dependent control in *Caenorhabditis elegans*. **EMBO J.** **17**: 6337-6347.
- GOLDSTEIN, J.; HOBBS, H. & BROWN, M. 1995. Familial hypercholesterolemia. IN: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, N. S. & VALLE, D. **The Metabolic Basis of Inherited Diseases**. McGraw-Hill: New York. pp. 1981-2030.
- GONZALES, S.; MALDONADO, J. A.; LEONARD, J. E.; VILA, C.; BARBANTI-DUARTE, J. M.; MERINO, M.; BRUM-ZORRILLA, N. & WAYNE, R. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Mol. Ecol.** **7**: 47-56.
- GOULD, S. J. 1997. The exaptive excellence of spandrels as a term and prototype. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94**: 10750-10755.
- GREENBERG, J. H.; TURNER II, 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. 1979. The classification of american indian languages. IN: COOLEY, R. E.; BARNES, M. R. & DUNN, J. A. (eds.) **Papers of the 1978 Mid-America Linguistics Conference at Oklahoma**. University of Oklahoma: Norman. pp 7-22.
- HAGELE, R. A.; HARRIS, S. B.; ZINMAN, B.; WANG, J.; CAO, H.; HANLEY, A. J.; TSUI, L. C. & SCHERER, S. W. 1998. Variation in the AU(AT)-rich element within the 3'-untranslated region of PPP1R3 is associated with variation in plasma glucose in aboriginal Canadians. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.** **83**: 3980-3983.
- HARDING, R. M.; FULLERTON, S. M.; GRIFFITHS, R. C.; BOND, J.; COX, M. J.; SCHNEIDER, J. A.; MOULIN, D. S. & CLEGG, J. B. 1997. Archaic african and asian lineages in the genetic ancestry of modern humans. **Am. J. Hum. Genet.** **60**: 772-789.
- HILL, K. & HURTADO, A. M. 1996. **Ache Life History**. Aldine de Gruyter: New York. 581p.
- HORAI, S.; KONDO, R.; NAKAGAWA-HATTORI, Y.; HAYASHI, S.; SONODA, S. & TAJIMA, K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. **Mol Biol. Evol.** **10**: 23-47.
- KARAFET, T.; ZEGURA, S. L.; VUTURO-BRADY, J.; POSUKH, O.; OSIPOVA, L.; WIEBE, V.; ROMERO, F.; CONG, J. L.; HARIHARA, S.; JIN, F.; DASHNYAM, B.; GERELSAIKHAN, T.; OMOTO, K. & HAMMER, M. F. 1997. Y chromosome markers and trans-bering dispersals. **Am. J. Phys. Anthropol.** **102**: 301-314.
- KERN, A. 1998. **Antecedentes Indígenas**. Editora da Universidade: Porto Alegre. 139p.
- KLEIMAN, F. E.; RAMIREZ, A. O.; DODELSON DE KREMER, R.; GRAVEL, R. A. & ARAGANA, C. E. 1998. A frequent TG deletion near the polyadenylation signal of the human HEXB gene: occurrence of an irregular DNA structure and conserved nucleotide sequence motif in the 3' untranslated region. **Hum. Mutat.** **12**: 320-329.

- KNIGHT, A.; BATZER, M. A.; STONEKING, M.; TIWARI, H. K.; SCHEER, W. D.; HERRERA, R. & DEININGER, P. L. 1996. DNA sequences of *Alu* elements indicate a recent replacement of the human autosomal genetic complement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**: 4360-4364.
- KOLMAN, C. J.; SAMBUUGHIN, N. & BERMINGHAM, E. 1996. Mitochondrial DNA analysis of mongolian populations and implications for the origin of new world founders. **Genetics** **142**: 1321-1334.
- LELL, J. T.; BROWN, M. D.; SCHURR, T. G.; SUKERNIK, R. I.; STARIKOVSKAYA, Y. B.; TORRONI, A.; MOORE, L. G.; TROUP, G. M. & WALLACE, D. C. 1997. Y chromosome polymorphisms in native americans and siberian populations: identification of native american Y chromosome haplotypes. **Hum. Genet.** **100**: 536-543.
- MAYNARD-SMITH, J. & SZATHMARY, E. 1995. **Major Transitions in Evolution**. W. H. Freeman: Oxford. pp. 176-181.
- MELTZER, D. J. 1997. Monte Verde and the pleistocene peopling of the Americas. **Science** **276**: 754-755.
- MELTZER, D. J. 1993. Pleistocene peopling of the Americas. **Evol. Anthropol.** **1**: 157-169.
- MERRIWETHER, D. A.; HALL, W. W.; VAHLINE, A. & FERREL, R. E. 1996. mtDNA variation indicates Mongolia may have been the source for the founding populations for the new world. **Am. J. Hum. Genet.** **59**: 204-212.
- MERRIWETHER, D. A.; ROTHHAMMER, F. & FERREL, R. E. 1995. Distributions of the four founding lineage haplotypes in native americans suggest a single wave of migration for the new world. **Am. J. Phys. Anthropol.** **98**: 411-430.
- MIGHELL, A. J.; MARKHAM, A. F. & ROBINSON, P. A. 1997. *Alu* sequences. **FEBS Letters** **417**: 1-5.

MONSALVE, M. V.; CARDENAS, F.; GUHL, F.; DELANEY, A. D. & DEVINE, D. V. 1996. Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. **Ann. Hum. Genet.** **60**: 293-303

MULLIS, K.; FALCONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb. Symp-Quant. Biol.** **51**: 263-273.

PENA, S. D. J.; SANTOS, F. R.; BIANCHI, N. O.; BRAVI, C. M.; CARNESE, F. R.; ROTHHAMMER, F.; GERELSAIKHAN, T.; MUNKHTUJA, B. & OYUNSUREN, T. 1995. A major founder Y-chromosome haplotype in amerindians. **Nat. Genet.** **11**: 15-16.

PERNA, N. T.; BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. & STONEKING, M. 1992. Alu insertion polymorphism: a new type of marker for human population studies. **Hum. Biol.** **64**: 641-648.

PROUS, A. 1995. Archeological analysis of the oldest settlements on the Americas. **Braz. J. Genet.** **18**: 689-699.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C.; SANTOS, S. E. B.; MACHADO, A. L.; GUAPINDAIA, V. & ZAGO, M. A. 1996. Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-columbian natives of the Amazon region. **Am. J. Phys. Anthrop.** **101**: 29-37.

ROGERS, C. A.; ROGERS, L. A. & MARTIN, C. P. 1992. How the door opened: the peopling of the new world. **Hum. Biol.** **64**:281-302.

ROOSVELT, A. C.; LIMA DA COSTA, M.; LOPES MACHADO, C.; MICHAB, M.; MERCIEK, N.; VALLADAS, H.; FEATHERS, J.; BARNETT, W.; INAZIO DA SILVEIRA, M.; HENDERSON, A.; SILVA, J.; CHERNOFF, B.; REESE, D. S.; HOLMAN, J. A.; TOTH, N. & SCHICK, K. 1996. Paleoindian cave dwellers in the Amazon: the peopling of the Americas. **Science** **272**: 373-384.

SALZANO, F. M. & CALLEGARI-JAQUES, S. M. 1998. **South American Indians: a case study in evolution.** Claredon Press: Oxford. 259 p.

- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**: 5463-5467.
- SANTOS, F. R.; RODRIGUEZ-DELFIN, L.; PENA, S. D. J.; MOORE, J. & WEISS, K. M. 1996. North and south amerindians may have the same major founder Y chromosome haplotype. **Am. J. Hum. Genet.** **58**: 1369-1370.
- SCHMID, C. W. & JELINEK, W. R. 1982. The Alu family of dispersed repetitive sequences. **Science** **216**: 1065-1070.
- SHEN, M. R.; BATZER, M. A. & DEININGER, P. L. 1991. Evolution of the master Alu gene(s). **J. Mol. Evol.** **33**: 311-320.
- SHERRY, S. T. 1991. **Gelin**: na ASCII-based DNA sequence management program. Version 1.0. Penn State University.
- SHERRY, S. T.; HARPENDING, H. C.; BATZER, M. A. & STONEKING, M. 1997. *Alu* evolution in human populations: using the coalescent to estimate effective population size. **Genetics** **147**: 1977-1982.
- STARIKOVSKAYA, Y.; SUKERNIK, R. I.; SCHURR, T. G.; KOGELNICK, 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.
- STEELE, D. G. & POWELL, J. F. 1993. Paleobiology of the first americans. **Evol. Anthropol.** **1**: 138-146.
- STONE, A. C. & STONEKING, M. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. **Am. J. Hum. Genet.** **62**: 1153-1170.
- STONEKING, M. 1993. DNA and recent human evolution. **Evol. Anthropol.** **2**: 60-73.

- STONEKING, M.; FONTIUS, J. J.; CLIFFORD, S. L.; SOODYALL, H.; ARCOT, S. S.; SAHA, N.; JENKINS, T.; TAHIR, M.; DEININGER, P. L. & BATZER, M. A. 1997. *Alu* insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa. **Genome Research** 7: 1061-1071.
- SZATHMARY, E. J. E. 1984. Peopling of North America: clues from genetic studies. **Acta Anthropogenetica** 8: 79-194.
- SZATHMARY, E. J. E. 1993a. mtDNA and the peopling of the Americas. **Am. J. Hum. Genet.** 53: 793-799.
- SZATHMARY, E. J. E. 1993b. Genetics of arboriginal north americans. **Evol. Anthropol.** 1: 202-220.
- SZATHMARY, E. J. E. 1996. Ancient migrations from Asia to north America. IN: AKAZAWA, T. & SZATHMARY, E. J. E. (eds). **Pleistocene Mongoloid Dispersals**. Oxford University Press: Oxford. pp. 149-164.
- TODA, Y. & TOMITA, M. 1997. *Alu* elements as an aid in deciphering genome rearrangements. **Gene** 205: 173-176.
- TORRONI, A.; MILLER, J. A.; MOORE, L. G.; ZAMUDIO, S.; ZHUANG, J.; DROMA, T. & WALLACE, D. C. 1994. Mitochondrial DNA analysis in Tibet: implications for the origin of the tibetan population and its adaptation to high altitude. **Am. J. Phys. Anthropol.** 93: 189-199.
- TORRONI, A.; SCHURR, T. G.; YANG, C.; SZATHMARY, E. J. E.; WILLIAMS, R. C.; SCHANFIELD, M. S.; TROUP, G. A.; KNOWLER, W. C.; LAWRENCE, D. N.; WEISS, K. M. & WALLACE, D. C. 1992. Native mitochondrial DNA analysis indicates that the amerind and the na-dene populations were founded by two independent migrations. **Genetics** 130:153-162.
- UNDERHILL, P. A.; JIN, L.; ZEMANS, R.; DEFNER, P. J. & CAVALLI-SFORZA, L. L. 1996. Pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 120-200.

VIGILANT, L.; STONEKING, M.; HARPENDING, H.; HAWKES, K. & WILSON, A. C. 1991.
African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. **Science** **253**:
1503-1507.

WIRSEL, S.; HORWITZ, B.; YAMAGUCHI, K.; YODER, O. C. & TURGEON, B. G. 1998.
Single mating type-specific genes and their 3' UTRs control mating and fertility in
Cochliobolus heterostrophus. **Mol. Gen. Genet.** **259**: 272-281.