

**SÉRGIO D. J. PENA**  
e **DENISE R. DE**  
**CARVALHO-SILVA:**

Departamento de  
Bioquímica e  
Imunologia da  
Universidade Federal  
de Minas Gerais.

**FABRÍCIO R.**  
**SANTOS:**

Departamento de  
Biologia da mesma  
Universidade.



SURGIMENTO

**Utilização  
de polimorfismos  
de DNA  
do cromossomo Y  
no estudo  
do povoamento  
das Américas**

SÉRGIO D. J. PENA  
DENISE R. DE CARVALHO-SILVA  
FABRÍCIO R. SANTOS



# “History is more or less bunk”

(Henry Ford, *Chicago Tribune*, 25/5/1916).

## INTRODUÇÃO

**S**abemos que as Américas foram povoadas entre 12.000 e 30.000 atrás por imigrantes provenientes da Ásia. Também há consenso de que o povoamento ocorreu predominantemente, se não exclusivamente, por terra através do estreito de Bering. O resto é especulação. A migração foi contínua ou em ondas distintas? Quantas ondas migratórias ocorreram? Quando ocorreram essas migrações? De onde se originaram? Quais migrações produziram quais populações atuais? Houve extinção dos grupos responsáveis por algumas migrações? Essa extinção foi provocada por contingências do processo de povoamento ou causada por outras populações que migraram subsequentemente? As perguntas abundam e provavelmente não serão todas respondidas nunca. Também, como vamos saber se as respostas estão corretas (Cann, 1997)? De qualquer maneira, algumas respostas, parciais, incompletas, estão emergindo a partir de enfoques metodológicos distintos e complementares: paleantropologia, lingüística e, mais recentemente, a genética molecular, que será o foco deste artigo.

Efetivamente há duas estratégias possíveis pelas quais a genética molecular pode contribuir para responder perguntas sobre a história evolucionária humana, como o povoamento das Américas. Primeiro, podemos estudar populações atuais, o que será discutido em grande detalhe mais adiante. Alternativamente, podemos tentar resgatar DNA humano de múmias e ossadas arqueológicas para fazer a reconstituição da

estrutura genética de populações do passado. Essa estratégia tornou-se possível com a recente invenção da técnica da reação em cadeia da polimerase – PCR (Mullis e Faloona, 1987) aliada a avanços na metodologia de extração de DNA livre de inibidores a partir de ossadas antigas (ver, por exemplo, Handt et alii, 1996; Prado et alii, 1997). A maior vantagem da PCR para a arqueologia molecular é a sua extraordinária sensibilidade. Infelizmente esse tem sido também seu maior problema. Assim, “triumfos” da arqueologia molecular como a extração de seqüências de DNA do mioceno e mesmo do cretáceo provaram ser irreproduzíveis ou produzidos por contaminação com outro DNA (Cooper, 1997). Recentemente, Handt et alii (1996) demonstraram que quando a preparação de DNA contém poucas moléculas (< 100), contaminantes e/ou erros de replicação na PCR podem chegar a constituir uma fração substancial, se não a maioria, dos produtos finais de amplificação. De qualquer maneira, é negável que hoje a arqueologia molecular é um campo fértil de atividade científica (revisado em Herrmann e Hummel, 1994), embora muitos dos resultados que estão sendo publicados devam ser tomados *cum grano salis*.

Efetivamente, então, o estudo genético de populações atuais ainda é, cientificamente, o enfoque metodológico mais confiável para tentativas de reconstrução do passado evolucionário humano. Para tal, devemos usar polimorfismos de DNA, que são os mais informativos (revisado em Pena et alii, 1995). Polimorfismos autossômicos são individualizantes e muito úteis, mas têm a desvantagem de que os haplótipos são efêmeros. Por outro lado, o DNA mitocondrial e a porção não-pseudo-autossômica do cromossomo Y são haplóides e não se recombina. Haplótipos desses compartimentos permanecem inalterados em matrinhagens (DNA mitocondrial) ou patrinhagens (cromossomo Y) até que uma mutação ocorra, e constituem, assim, marcadores de linhagem extremamente informativos para reconstruções evolucionárias.

## VANTAGENS E DESVANTAGENS DO USO DE POLIMORFISMOS DO CROMOSSOMO Y EM ESTUDOS EVOLUCIONÁRIOS HUMANOS

O cromossomo Y humano é constituído de três porções distintas. Há duas regiões subtelo méricas, respectivamente nos braços curtos e longos, que possuem homologia com o cromossomo X e sofrem recombinação, sendo assim chamadas de regiões pseudo-autossômicas. A terceira porção, constituindo mais de 90% do cromossomo, é Y-específica e não sofre recombinação. Haplótipos dessa região são transmitidos inalterados de pai para filho até que ocorra uma mutação. Podemos assim traçar patrinhagens que podem alcançar dezenas de gerações no passado, constituindo importantes ferramentas de reconstrução evolucionária (*Figura 1A*). Há entretanto uma limitação importante, de que os haplótipos de Y, embora inalterados, representam a contribuição genética de uma parcela muito pequena dos antepassados de um indivíduo. Nós temos quatro avós, oito bisavós, dezesseis trisavós, etc. (*Figura 1B*). Se voltássemos vinte gerações (meros quinhentos anos) teríamos em teoria um milhão de antepassados e, com trinta gerações (750 anos), um bilhão de antepassados (certamente ordens de magnitude maior que a população da Terra em 1247, donde se conclui que os mesmos indivíduos devem ocorrer simultaneamente em várias de nossas linhagens, ou seja, todos somos produtos de endogamia!).

Assim, os estudos de variabilidade genética do cromossomo Y têm potencial para contribuir muito para o nosso entendimento da história evolucionária humana. Infelizmente, os primeiros estudos sistemáticos feitos à procura de polimorfismos de seqüência, usando enzimas de restrição, demonstraram uma escassez significativa de variação genética (Jakubiczka et alii, 1989; Malapsina et alii, 1990). Isso foi confirmado por estudos de seqüenciamento de extensas regiões não-

codificadoras de vários indivíduos, que demonstraram um quasi-mono-morfismo (Dorit et alii, 1995; Whitfield et alii, 1995). Entretanto, a procura de polimorfismos envolvendo variação do número de repetições de microssatélites provou ser mais proveitosa.

## MICROSSATÉLITES

Microssatélites – também conhecidos como repetições de seqüências simples ou repetições curtas em tandem (*Short Tandem Repeats* – STR) – são seqüências genômicas formadas por mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos repetidos em múltiplas cópias enfileiradas (em tandem). Apesar de microssatélites contendo todas as combinações de nucleotídeos terem sido identificados, a classe mais abundante no genoma humano contém o dímero  $(CA)_n \cdot (GT)_n$  e é mais freqüentemente chamada de repetição CA. No genoma humano há aproximadamente 50-100 mil cópias de repetições CA, que aparecem a cada 30 Kb no DNA eucromático (Stallings et alii, 1991). Em 1989 três grupos simultaneamente reportaram a detecção por PCR da variabilidade desses microssatélites (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989; Tautz, 1989). Eles se mostraram freqüentemente polimórficos no número de cópias de repetições CA e serviam como marcadores tipáveis por PCR com alelos na faixa de 70 a 200 pares de base. Um outro grupo de microssatélites envolve repetições de tri- e tetranucleotídeos. Em 1990 Peake et alii amplificaram por PCR uma região de repetição GATA no íntron 40 do gene do fator de Von Willebrand e mostraram que ele era polimórfico. Em contraste com as repetições CA, não havia necessidade de resolução dos produtos do PCR em géis de seqüenciamento porque os alelos diferiam em quatro pares de base. Assim, as bandas confusas que complicam as análises de microssatélites de 2 pb (pares de base) não são problema. Resultados semelhantes foram conseguidos em 1989 por Yandell e Dryja, traba-

lhando com outra repetição de tetranucleotídeos (CTTT)<sub>n</sub>, associada ao gene do retinoblastoma, no cromossomo número 13 humano. Foi demonstrado que polimorfismos de repetições triméricas e tetraméricas em tandem ocorrem a cada 300 ou 500 Kb no cromossomo humano X e aparentemente são intercaladas nessa mesma frequência (aproximadamente 10 mil locos) por todo o genoma (Edwards et alii, 1991). Em 1992 a equipe do laboratório de Jörg Epplen em Munique descreveu o primeiro microssatélite polimórfico do cromossomo Y humano, que foi posteriormente denominado *DYS19* (Roewer et alii, 1992). Interessamo-nos por esse polimorfismo e demonstramos a presença de cinco alelos na população brasileira: A (0,21), B (0,46), C (0,24), D (0,08) e E (0,01), com uma diversidade gênica de 0,66 (Santos et alii, 1993a). A utilidade desse polimorfismo no estabelecimento de patrilinhagens foi logo demonstrada pelo seu uso na resolução de casos de determinação de paternidade nos quais o possível pai já era falecido (Santos et alii, 1993b). Na mesma época, Roewer et alii (1992) reportaram os primeiros estudos em ameríndios com uma amostra de apenas 11 yanomamis, dos quais 10 apresentavam o alelo A (186 pb). Esses resultados se mostraram especialmente significativos em vista do fato de que em estudos de populações em todo o mundo nós demonstramos que em europeus o alelo B é o mais prevalente, enquanto em africanos e asiáticos os alelos C e D são os mais frequentes (Santos et alii, 1996a).

### **POLIMORFISMO DO DNA ALFÓIDE (SISTEMA $\alpha$ h)**

Durante um breve estágio no Departamento de Bioquímica da Universidade de Oxford, um de nós (F. R. S.) descobriu um interessante e útil marcador polimórfico no DNA alfóide da região centromérica do cromossomo Y, o qual

foi posteriormente analisado em detalhe no nosso laboratório em Belo Horizonte (Santos et alii, 1995a). A base molecular desse polimorfismo é bastante complexa e seus detalhes extrapolam o âmbito desta revisão. É suficiente dizer que a detecção do polimorfismo é baseada na co-amplificação por PCR de repetições alfóides com pequenas diferenças em seus comprimentos e/ou seqüências de bases. Basicamente, os iniciadores amplificam dois tipos de seqüência simultaneamente: o loco  $\alpha$ hL situado na margem esquerda do conjunto alfóide (proximal a Yp) e um número variável de locos diferentes no lado direito (proximal a Yq). O loco  $\alpha$ hL (281 pb) é aparentemente monomórfico em seqüência e contém uma deleção de quatro pares de bases comparado aos locos de 285 pb do lado direito, os quais entretanto diferem uns dos outros em seqüência (Santos et alii, 1995a). Durante a reação de amplificação por PCR, são formadas heteroduplexes entre as fitas de DNA do loco  $\alpha$ hL com as fitas complementares dos locos do lado direito. Essas heteroduplexes assumem conformações diferentes que refletem as seqüências específicas dos locos do lado direito e podem ser resolvidas e visualizadas por eletroforese em géis de poli(acrilamida). No nosso estudo inicial, nós tipamos 93 indivíduos de todo o mundo e observamos doze diferentes pares de heteroduplex (h1-h12) que resultavam da combinação de  $\alpha$ hL com doze locos diferentes do lado direito chamados  $\alpha$ h1- $\alpha$ h12, respectivamente. Cada indivíduo podia ser tipado de acordo com a presença ou ausência de cada heteroduplex em combinações diferentes. Assim, treze tipos diferentes alfóides foram encontrados nos 93 indivíduos, incluindo um padrão (tipo I) caracterizado pela ausência de heteroduplexes, que mostrou ser causado pela ausência do loco  $\alpha$ hL. Posteriormente, o número de tipos alfóides encontrado aumentou para 22, incluindo alguns indivíduos com tipo I pela ausência de locos do lado direito (ver adiante).

## IDENTIFICAÇÃO DE UM HAPLÓTIPO FUNDADOR EM AMERÍNDIOS

Quando estabelecemos haplótipos de cromossomo Y, simultaneamente com o microssatélite *DYS19* e com o sistema alféide, observamos 46 haplótipos distintos em populações de vários continentes (Santos et alii, 1996b), estabelecendo assim uma base molecular sólida para estudos evolucionários humanos. Iniciamos então um estudo colaborativo com Nestor Bianchi (La Plata, Argentina), Francisco Carnese (Buenos Aires, Argentina) e Francisco Rothhammer (Santiago, Chile). Nesse estudo, estabelecemos os haplótipos de 73 ameríndios de doze tribos desde a Argentina até o México (mapuche, wichi, chorote, chulupi, toba, huilliche, atacameño, suruí, caritiana, quechua, auca, maia) e identificamos que um único haplótipo, chamado IIA (combinação do tipo alféide II com o alelo A de *DYS19*), era encontrado em 74% deles (Pena et alii, 1995). Se desconsiderássemos os mapuches, que sabidamente receberam um componente importante de fluxo gênico europeu, a porcentagem de haplótipo IIA aumentaria para 91%! Com base nesse estudo chegamos à conclusão que IIA era o haplótipo fundador maior de ameríndios do sul. Para confirmar esses resultados, nós fizemos uma colaboração com Francisco Salzano e Mara Hutz (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Ricardo Santos e Carlos Coimbra (Fundação Oswaldo Cruz) e pudemos assim estudar mais 37 ameríndios de cinco tribos da bacia do Amazonas e do Brasil Central (waiwai, gavião, zoró, suruí, xavante). Novamente, o haplótipo IIA foi encontrado na grande maioria (87%) dos indivíduos (Santos et alii, 1995b), assim confirmando-se como haplótipo maior fundador em ameríndios do sul. Um achado interessante foi a presença do haplótipo IA em cinco indivíduos da tribo gavião, sugerindo que este pudesse também ser um candidato a haplótipo fundador menor. Entretanto, surpreendentemente, estudos moleculares

posteriores demonstraram heterogeneidade entre os indivíduos IA, sendo três deles I(L)A (deleção de  $\alpha H1$ ) e dois I(1)A (deleção de  $\alpha HL$ ). Esses achados sugerem uma origem mutacional para os haplótipos IA nos gaviões, ao invés de um segundo haplótipo fundador.

Restava estudar ameríndios norte-americanos para averiguar se o haplótipo IIA era também predominante neles. Estabelecemos uma colaboração com o dr. Kenneth Weiss (Universidade do Estado da Pensilvânia) e John Moore (Universidade da Flórida), que nos enviaram amostras de DNA de ameríndios mvskoke (creek), atualmente em Oklahoma, EUA. Quarenta e sete indivíduos foram tipados. O haplótipo mais freqüente foi IIA (38% dos indivíduos testados). Esse achado deve ser avaliado dentro de uma perspectiva histórica da tribo mvskoke que teve seu primeiro contato com o homem branco em 1541 e depois miscigenou-se extensamente com populações européias e escravos negros. Assim, o achado do haplótipo IIA na freqüência de 0,38 é forte evidência de que também para ameríndios norte-americanos o haplótipo IIA é um haplótipo fundador maior. Conjuntamente, os nossos dados confirmavam a noção de que os ameríndios das três Américas eram provenientes de uma única onda migratória de uma população asiática com predominância do haplótipo IIA.

Seria então possível usar o haplótipo de cromossomo Y para tentar identificar a população que originou os ameríndios? Nós abordamos essa questão fazendo estudos genéticos de dois grupos que têm sido apresentados na literatura como fortes candidatos: mongolóides e siberianos. Com a colaboração de T. Gerelsaikhan, B. Munkhtuja e T. Oyunsuren da Mongólia, nós estabelecemos os haplótipos de Y de 46 mongolóides (40 khalkhas, 4 buryads, 1 darigamgas e 1 durved). Os haplótipos predominantes foram XVIIIID (22%), XVIIIIC (20%) e XXB (13%), não havendo nenhum caso identificado de haplótipo IIA. Entretanto, encontramos um caso de haplótipo IA. Com a colaboração de

Michael Crawford (Universidade de Kansas) e Moses Schanfield (Analytical Genetic Testing Center, Denver, CO), estudamos também 56 amostras de siberianos orientais. Os haplótipos predominantes foram o VD (32%) e o IID (27%). Não observamos nenhum caso do haplótipo IIA, mas 20% dos indivíduos apresentaram o haplótipo IA(1), o qual pode, como discutido anteriormente, ser derivado de IIA por uma simples mutação (resultados não publicados). Discutiremos esses achados mais adiante, no contexto da unidade de 4,1 Kb do DNA alféide.

Uma outra questão importante é estabelecer a origem dos haplótipos “não-IIA” em ameríndios. Nós colaboramos com Nestor Bianchi, que estudou especificamente essa questão (Bianchi et alii, 1997). Foram analisados 105 ameríndios (26 mapuches, 32 wichis, 10 lenguas, 12 huilliches, 8 pehuenches, 5 tehuelches, 12 maias) dos quais 85% tinham o haplótipo IIA. Estudos com outros marcadores de Y (YAP, *DYS271*) permitiram estabelecer que todos os ameríndios que não pertenciam ao haplótipo IIA tinham haplótipos tipicamente europeus e africanos, certamente adquiridos por miscigenação com essas populações (Bianchi et alii, 1997).

Zago et alii (1996) estudaram *DYS19* em 46 ameríndios brasileiros de cinco tribos distintas (arara, wayana-apalai, wayampi, yanomami, caiapó), encontrando o alelo A em 35 (76%) deles. Um achado interessante nesse estudo foi a presença do alelo de 182 pb em três indivíduos (2 caiapós e 1 wayana-apalai) e do alelo de 178 pb em um yanomami. Esses alelos são muito raros e até agora só tinham sido vistos em algumas populações africanas (Santos et alii, 1996a)

### **DYS199 T - UMA MUTAÇÃO ESPECÍFICA DE AMERÍNDIOS**

Poucos meses após a nossa publicação da existência de um haplótipo fundador em ameríndios (Pena et alii, 1995), os nossos achados foram confirmados por

Underhill et alii (1996) usando *DYS19* e um novo polimorfismo de sequência chamado *DYS199*. O alelo C de *DYS199* foi encontrado em todos os europeus, asiáticos, africanos e primatas superiores estudados (n = 123), enquanto em populações indígenas da América do Norte (54 indivíduos: 15 caritianas, 17 suruífs, 8 maias, 2 colombianos, 6 esquimós e 6 navajos), o alelo T foi encontrado em 91% dos casos. Em 36 indivíduos *DYS199* T, foi feita a tipagem de *DYS19*, mostrando que 30 deles tinham o alelo A (186 pb). Esses resultados confirmaram os nossos, indicando a presença em ameríndios de um haplótipo fundador maior. Posteriormente, fizemos a tipagem do *DYS199* em nossas amostras ameríndias e confirmamos que todos os indivíduos IIA eram também *DYS199* T (dados não publicados). Em contraste, não encontramos o alelo *DYS199* T em nossas amostras da Mongólia nem da Sibéria (dados não publicados). A ausência de *DYS199* em populações não-ameríndias sugere que a mutação C/T tenha ocorrido durante ou imediatamente antes da migração dos asiáticos que povoaram a América. Um achado de extrema relevância de Underhill et alii (1996) foi a presença do haplótipo *DYS19* A- *DYS199* T em 4/6 esquimós e 2/6 navajos. Esquimós e navajos pertencem a grupos lingüísticos diferentes dos ameríndios e uma das hipóteses mais aceitas é que os três grupos lingüísticos são provenientes de três ondas migratórias distintas (Greenberg et alii, 1986). Resultados recentes têm confirmado a presença do alelo T em na-denes e esquimós norte-americanos (Karafet et alii, 1997). Ainda não está claro se a presença desses haplótipos é devida à mistura com ameríndios, ou se realmente todos os três grupos lingüísticos vieram em uma única onda migratória (ver adiante). Um achado intrigante foi a presença do alelo T em baixas frequências em populações siberianas (esquimós siberianos, chukchis e evens). Não pode ser descartada a possibilidade de migração reversa da América para a Ásia.

## 92R7 T E 4,1 Kb - MUTAÇÕES ENCONTRADAS NOS PRECURSORES DE AMERÍNDIOS

Em 1994 Mathias et alii utilizaram como sonda, para estudar fragmentos de restrição do cromossomo Y humano, o clone 92R7, um fragmento *EcoRI-EcoRI* de ~2.1 Kb subclonado a partir de cY92. Sete bandas foram vistas após digestão com *HindIII*, sendo que uma delas era polimórfica, tendo tamanho de 4,6 Kb ou 6,7 Kb. Também, quando produtos de digestão de *HindIII* foram estudados com a sonda pY $\alpha$ I, um clone da região alféide do cromossomo Y humano, um outro polimorfismo foi descoberto, com bandas principais (unidades alféides) de 6,0 Kb ou 4,1 Kb. Em 93 amostras originárias de várias regiões geográficas do mundo, o fragmento de 4,6 Kb de 92R7 foi visto apenas em alguns europeus, orientais e nos dois únicos indivíduos ameríndios estudados (Mathias et alii, 1994). O fragmento alféide de 4,1 Kb foi visto apenas nos dois ameríndios.

Os polimorfismos 92R7 e pY $\alpha$ I são baseados em *Southern blots*, o que dificulta metodologicamente a análise, principalmente o pY $\alpha$ I que depende de eletroforese de campo pulsátil. Assim, poucos indivíduos haviam sido estudados até muito recentemente, quando foi desenvolvido um método de tipagem de 92R7 baseado na PCR. Apesar do número pequeno de amostras já estudadas, um padrão muito interessante tem emergido dos estudos com esses polimorfismos. Todos os ameríndios estudados até agora, assim como um único indivíduo na-dene analisado, apresentam o alelo de 4,6 Kb em 92R7 e o fragmento de 4,1 Kb em pY $\alpha$ I. Além de ameríndios, o fragmento de 4,1 Kb foi encontrado apenas em algumas populações da Sibéria, especialmente na região do Altai, e em menor proporção na Mongólia. Essas populações são as melhores candidatas a ancestrais dos ameríndios. Grupos mais ao sul, na China e Japão, apresentam o alelo de 6,7 Kb em 92R7 e o fragmento de 6,0 Kb em pY $\alpha$ I. Assim, é muito improvável que essas populações sejam precursoras dos ameríndios.

## OUTROS MICROSSATÉLITES

Linares et alii (1996) usaram três microssatélites de dinucleotídeos (YCAI, YCAII e YCAIII) e *DYS19* no cromossomo Y humano, previamente descobertos por Mathias et alii (1994), para estudar, entre outros, 28 ameríndios (11 caritianas, 8 suruíis e 9 maiias). YCAI provou ser monomórfico em todas as populações estudadas, enquanto os iniciadores de YCAII e YCAIII aparentemente amplificaram cada um dos microssatélites diferentes, chamados respectivamente YCAIIa, YCAIIb, YCAIIIa e YCAIIIb. Apenas vinte dos ameríndios (71%) mostraram o alelo A em *DYS19*, sendo que todos eles apresentaram o mesmo alelo (151 pb) em YCAIIa, 18 (90%) o alelo 159 pb em YCAIIb, 14 (70%) o alelo 199 pb em YCAIIIa e 17 o alelo 201 pb em YCAIIIb. Uma classificação em haplótipos dependerá de um melhor entendimento molecular desse polimorfismo, principalmente da relação entre as duplicações de microssatélites postuladas pelos autores.

O grupo do Cooperative Human Linkage Center (CHLC) da Universidade de Iowa nos Estados Unidos tem realizado um programa sistemático de descoberta de polimorfismos hipervariáveis de microssatélites no genoma humano. Como parte desse programa, um número de novos microssatélites de trinucleotídeos e tetranucleotídeos foi descoberto no cromossomo Y humano, a saber: trinucleotídeos *DYS388*, *DYS392*; tetranucleotídeos *DYS385*, *DYS389* (2 locos), *DYS390*, *DYS391*, *DYS393* (Jobling e Tyler-Smith, 1995). O primeiro trabalho usando alguns desses novos microssatélites (especificamente *DYS388*, *DYS390*, *DYS391* e *DYS395*, o qual é idêntico a *DYS393*) para o estudo de ameríndios foi publicado por Deka et alii (1996). Estes autores analisaram 31 ameríndios, sendo 17 da Costa Rica (8 guamys, 7 bribribis) e 16 pehuenches da Argentina, encontrando o alelo A de *DYS19* (chamado por eles de *DYS394*) em 28 deles (90%). Interessantemente, nenhum dos outros

microssatélites apresentou uma variabilidade tão baixa. Em *DYS391*, o alelo 283 era o mais freqüente em bribris e pehuenches.

Recentemente, completamos no nosso laboratório um estudo de seis microssatélites de tetranucleotídeos (*DYS19*, *DYS389A*, *DYS389B*, *DYS390*, *DYS391*, *DYS393*) em 97 ameríndios, distribuídos como se segue: gavião (17), *caritiana* (7), suruí (5), *surui* (10), *ticuna*(32), xavante (5), waiwai (5), zoró (5), *maia* (11). As amostras em itálico (60) nos foram gentilmente cedidas pela dra. Judith Kidd da Universidade de Yale, enquanto as outras 37 são as mesmas do estudo publicado por Santos et alii (1995b). Como esperado pelos nossos achados anteriores, das 103 amostras, apenas 5 não apresentaram o alelo A no microssatélite *DYS19*. Entretanto, quando estudamos os outros microssatélites, evidenciou-se considerável heterogeneidade, como demonstrado na *Tabela 1*, onde os alelos mais freqüentes para cada sistema estão mostrados em negrito. Com a única exceção do microssatélite *DYS389A*, em todos os outros o alelo mais freqüente em ameríndios do Sul também era o mais freqüente em maias, apesar do pequeno número dos últimos.

## CONCLUSÕES

1) Os nossos estudos definem claramente um haplótipo fundador principal (IIA) para ameríndios das três Américas (Pena et alii, 1995; Santos et alii, 1995b, 1996a). Há, assim, forte evidência de que uma única onda migratória tenha originado todas as populações ameríndias atuais.

2) O cromossomo Y fundador das Américas contendo o haplótipo IIA (Pena et alii, 1995; Santos et alii, 1995a) é derivado de um cromossomo Y humano contendo outra mutação, a ausência do sítio para *HindIII* no loco 92R7 (Mathias et alii, 1994). Como a mutação do loco 92R7 está ausente no continente africano, a

mesma provavelmente ocorreu após migração da África, mas é antiga bastante para estar presente nos cromossomos Y de grande parte dos europeus, ameríndios e alguns asiáticos, principalmente do norte (Jobling e Tyler-Smith, 1995). Portanto, a mutação 92R7 está presente no ancestral imediato do principal cromossomo fundador das Américas e a associação de outros marcadores informativos deve permitir traçar este precursor americano na linhagem cromossômica definida pela mutação 92R7. Um desses marcadores, a mutação no loco *DYS199* (Underhill et alii, 1996), parece ter ocorrido durante a entrada nas Américas. Os poucos cromossomos com esta mutação ocorrendo na Sibéria têm sido explicados como resultado de uma migração reversa das Américas para Ásia (Karafet et alii, 1997). A origem nas Américas torna o loco *DYS199* não informativo para a busca dos ancestrais asiáticos. Outros marcadores presentes no principal haplótipo fundador das Américas são mais informativos e representados pelo tipo II do sistema  $\alpha$ h (Santos et alii, 1995b; Pena et alii, 1995), o alelo A no loco de microssatélite *DYS19* (Pena et alii, 1995) e a presença da unidade alféide de 4,1 Kb (Mathias et alii, 1994; Jobling e Tyler-Smith, 1995). Essas mutações são todas anteriores à mutação *DYS199*, assim como a mutação no loco 92R7 que parece ser a mutação mais antiga definindo esta linhagem de cromossomos Y. Numa análise de populações siberianas recentemente realizada (Santos, Pandya, Tyler-Smith, Pena, Schanfield, Crawford e Mitchell, dados não publicados), a presença de um haplótipo muito similar ao suposto ancestral, nesse caso contendo os marcadores 92R7-4,6/4,1Kb/ $\alpha$ hI/*DYS19-A*, foi encontrado em alta freqüência em duas populações na região dos montes Altai, uma combinação que não foi encontrada em nenhuma outra população (Mathias et alii, 1994; Santos et alii, 1996; Santos, Pandya, Tyler-Smith, Pena, Schanfield, Crawford e Mitchell, dados não publicados). A única diferença para

o suposto ancestral seria a presença do tipo  $\alpha hI$  ao invés do  $\alpha hII$ . No entanto foi demonstrado anteriormente (Santos et alii, 1995a; Santos et alii, 1996) que o tipo  $\alpha hI$  pode ser originado do tipo  $\alpha hII$  por um único evento de deleção relativamente comum. O acúmulo de mutações nestes indivíduos é esperado, visto que as amostras siberianas estudadas são populações modernas que divergiram dos ancestrais dos ameríndios há 15-30.000 anos.

3) Alguns dos estudos de polimorfismos de cromossomo Y, especialmente aqueles baseados em *DYS199*, sugerem que populações americanas pré-colombianas dos três grupos lingüísticos maiores (ameríndios, na-denes e aleuta-esquimós) possam ser originárias de uma mesma onda migratória. Entretanto os mesmos dados poderiam ser explicados por fluxo gênico entre esses grupos. Destaque-se que estudos recentes baseados em DNA mitocondrial também sugerem uma migração única para os três grupos (Bonatto e Salzano, 1997).

4) O estudo de novos microssatélites do cromossomo Y humano tem demonstrado uma considerável variabilidade, que contrasta com o quasi-monomorfismo de *DYS19* em ameríndios. Ainda não temos uma explicação molecular para esse fenômeno. Entretanto, a variabilidade dos novos microssatélites poderá tornar-se muito útil na datação de alguns eventos-chave no processo de povoamento das Américas, desde que a velocidade de evolução destes polimorfismos seja estabelecida com confiabilidade.

5) Todas as conclusões obtidas até agora a partir de polimorfismos do cromossomo Y foram baseadas em estudos de populações atuais das Américas. Obviamente esses estudos não podem contribuir nada a respeito de grupos populacionais que tenham sido extintos desde as primeiras migrações. Esclarecimentos a esse respeito vão depender de avanços em arqueologia molecular (\*).



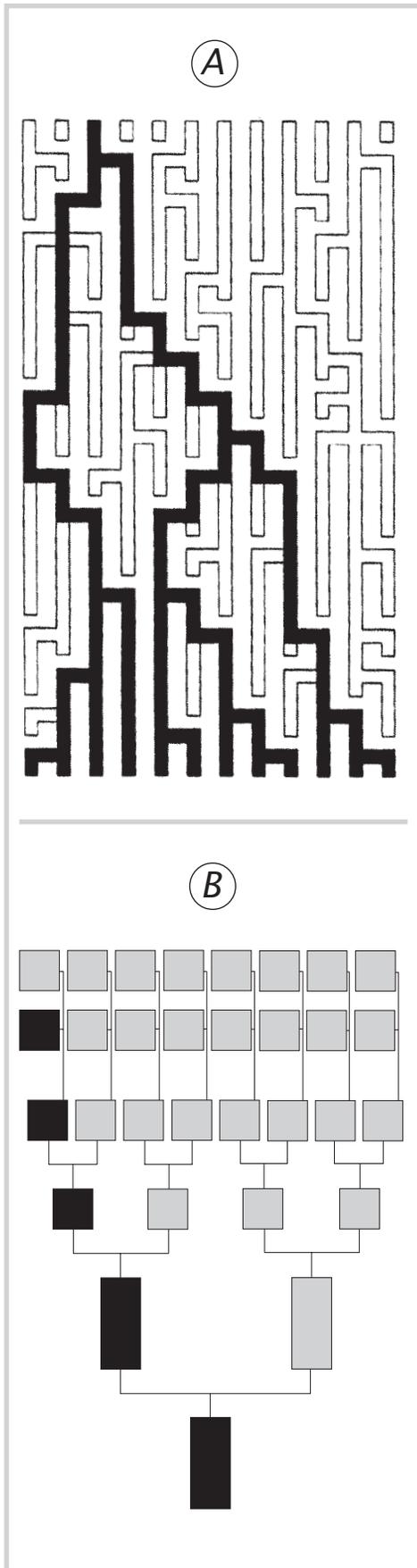
\* Agradecemos a Chris Tyler-Smith, Arpita Pandya, Moses Schanfield, Michael Crawford e Robert J. Mitchell por permissão para incluir nesta revisão dados ainda não publicados.

## DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE 6 MICROSSATÉLITES DO CROMOSSOMO Y EM 97 AMERÍNDIOS

<b>Loco/Alelo</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>América do Sul (86)</b>	<b>Maias (11)</b>
<b>DYS19</b>			
A	186	<b>0,97</b>	<b>0,64</b>
B	190	0,01	0,18
C	194		0,18
D	198		
E	202		
?		0,02	
<b>DYS389A</b>			
0	110		0,09
1	114	<b>0,42</b>	0,09
2	118	0,38	<b>0,64</b>
3	122	0,09	0,18
4	126	0,07	
?		0,04	
<b>DYS389B</b>			
1	247	0,04	0,18
2	251	<b>0,74</b>	<b>0,55</b>
3	255	0,19	0,27
?		0,03	
<b>DYS390</b>			
1	203		0,09
2	207		
3	211	0,11	0,18
4	215	<b>0,58</b>	<b>0,46</b>
5	219	0,29	0,27
6	223	0,02	
<b>DYS391</b>			
1	275		
2	279	0,03	
3	283	<b>0,83</b>	<b>0,73</b>
4	287	0,13	0,18
5	291		0,09
?		0,01	
<b>DYS393</b>			
1	120	0,05	
2	124	<b>0,67</b>	<b>0,82</b>
3	128	0,05	0,18
4	132	0,21	
?		0,02	

**TABELA 1**

? = Alelo não determinado (não houve amplificação)



**FIGURA 1**

*Comportamento de haplótipos de cromossomo Y nas populações. (A) “De cima para baixo” – Patrinhagens podem alcançar dezenas de gerações no passado, constituindo importantes ferramentas de reconstrução evolucionária. Em cada geração alguns cromossomos Y são transmitidos para a geração seguinte enquanto outros são perdidos. Após um número grande de gerações, probabilisticamente, todos os cromossomos Y sobreviventes serão progenia de um único ancestral. Esta figura foi originalmente publicada por Jobling e Tyler-Smith (1995) e está sendo reproduzida aqui com permissão de C. Tyler-Smith. (B) “De baixo para cima” – Os haplótipos de Y representam a contribuição genética de uma parcela muito pequena dos antepassados de um indivíduo. Nós temos quatro avós, oito bisavós, dezesseis trisavós, etc. Se voltássemos vinte gerações (meros quinhentos anos) teríamos em teoria um milhão de antepassados e, com trinta gerações (750 anos), um bilhão de antepassados.*

## BIBLIOGRAFIA

- BIANCHI, N. O.; BAILLET, G.; BRAVI, C. M.; CARNESE, R. F.; ROTHHAMMER, F.; MARTINEZ-MARIGNAC, V. L.; PENA, S. D. J. "Origin of Amerindian Y-Chromosomes as Inferred by the Analysis of Six Polymorphic Markers", in *Am. J. Phys. Anthropol.*, 102, 1997, pp. 79-89.
- BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M. "A Single and Early Migration for the Peopling of the Americas Supported by Mitochondrial DNA Sequence Data", in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1997, pp. 1.866-71.
- CANN, R. L. "Phylogenetic Estimation and Neck Riddles", in *Am. J. Hum. Genet.*, 60, 1997, pp. 755-7.
- COOPER. "Reply to Stoneking: Ancient DNA — how do you really know when you have it?", in *Am. J. Hum. Genet.*, 60, 1997, pp. 1.001-2.
- DEKA, R.; JIN, L.; SHRIVER, M. D.; YU, L. M.; SAHA, N.; BARRATES, R.; CHAKRABORTY, R.; FERREL, R. E. "Dispersion of Human Y Chromosome Haplotypes Based on Five Microsatellites in Global Populations", in *Genome Research*, 6, 1996, pp. 1.177-84.
- DORIT, R. L.; AKASHI, H.; GILBERT, W. "Absence of Polymorphism at the ZFY Locus on the Human Y Chromosome", in *Science*, 268, 1995, pp. 1.183-5.
- EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A., CASKEY, C. T. "DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats", in *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 1991, pp. 746-56.
- GREENBERG, J. H.; TURNER, C. G.; ZEGURA, S. L. "The Settlement of the Americas: a Comparison of the Linguistic, Dental and Genetic Evidence", in *Curr. Anthropol.*, 27, 1986, pp. 477-98.
- HAMMER, M. F. "Recent Insertion of an Alu Element on the Y Chromosome is a Useful Marker for Human Population Studies", in *Mol. Biol. Evo.*, 11, 1994, pp. 749-61.
- HANDT, O.; KRINGS, M.; WARD, R. H.; PAABO, S. "The Retrieval of Ancient Human DNA Sequences", in *Am. J. Hum. Genet.*, 59, 1996, pp. 368-76.
- HERRMANN, B.; HUMMEL, S. *Ancient DNA*. New York, Springer Verlag, 1994.
- JAKUBICZKA, S.; ARNEMANN, J.; COOKE, H. J.; KRAWCZAK, M.; SCHMIDTKE, J. "A Search for Restriction Fragment Length Polymorphisms on the Human Y Chromosome", in *Hum. Genet.*, 84, 1989, pp. 86-8.
- JOBLING, M. A.; TYLER-SMITH, C. "Fathers and Sons — the Y Chromosome and Human Evolution", in *Trends in Genetics*, 11, 1995, pp. 449-56.
- KARAFET, T.; ZEGURA, S. L.; VUTURO-BRADY, J.; POSUKH, O.; OSIPOVA, L.; WIEBE, V.; ROMERO, F.; LONG, J. C.; HARIHARA, S.; JIN, F.; DASHNYAM, B.; GERELSAIKHAN, T.; OMOTO, K.; HAMMER, M. F. "Y Chromosome Markers and Trans-Bering Strait Dispersals", in *Am. J. Phys. Anthropol.*, 102, 1997, pp. 301-14.
- LINARES, A. R.; NAYAR, K.; GOLDSTEIN, D. B.; HEBERT, J. M.; SEIELSTAD, M. T.; UNDERHILL, P. A.; LIN, A. A.; FELDMAN, M. W.; CAVALLI-SFORZA, L. L. "Geographic Clustering of Human Y-Chromosome Haplotypes", in *Ann. Hum. Genet.*, 60, 1996, pp. 401-8.
- LITT, M.; LUTY, J. A. "A Hypervariable Microsatellite Revealed by in Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene", in *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 1989, pp. 397-401.
- MALAPSINA, P.; PERSICHETTI, F.; NOVELLETTO, A.; JODICE, C.; TERRENATO, L.; WOLFE, J.; FERRARO, M. PRANTERA, G. "The Human Y Chromosome Shows a Low Level of DNA Polymorphism", in *Ann. Hum. Genet.*, 3, 1990, pp. 297-305.
- MATHIAS, N.; BAYES, M.; TYLER-SMITH, C. "Highly Informative Compound Haplotypes for the Human Y-Chromosome", in *Hum. Mol. Genet.*, 3, 1994, pp. 115-23.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. A. "Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction", in *Meth. Enzymol.*, 155, 1987, pp. 335-50.
- PEAKE, I. R. R.; BOWEN, D.; BIGNELL, P.; LIDDELL, M. B.; SADLER, J. E.; STANDEN, G.; BLOOM, A. L. "Family Studies and Prenatal Diagnosis in Severe Von Willebrand Disease by Polymerase Chain Reaction Amplification of a Variable Number Tandem Repeat Region of the Von Willebrand Factor Gene", in *Blood*, 76, 1990, pp. 555-61.

PENA, S. D. J.; PRADO, V. F.; EPPLIN, J. T. "Diagnosis of Human Genetic Individuality", in *Journal of Molecular Medicine*, 73, 1995, pp. 555-64.

PENA, S. D. J.; SANTOS, F. R.; BIANCHI, N. O.; BRAVI, C. M.; CARNESE, F. R.; ROTHHAMMER, F.; GERELSAIKHAN, T.; MUNKHTUJA, B.; OYUNSUREN, T. "A Major Founder Y-Chromosome Haplotype in Amerindians", in *Nature Genetics*, 11, 1995b, pp. 15-6.

PRADO, V. F.; CASTRO, A. K. F.; OLIVEIRA, C. L.; SOUZA, K. T.; PENA, S. D. J. "Extraction of DNA from Human Skeletal Remains: Practical Applications in Forensic Sciences", in *Genet. Anal. Biomol. Engineer.*, 1997, in press.

ROEWER, L.; NAGY, M.; SCHMIDT, P.; EPPLIN, J. T.; HERZOG-SCHRODER, G. "Microsatellite and HLA Class II Oligonucleotide Repeat Polymorphism", in S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen, A. J. Jeffreys (eds.), *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhauser Verlag, Basel, 1993, pp. 221-30.

SANTOS, F. R.; EPPLIN, J. T.; PENA, S. D. J. "Testing Deficiency Paternity Cases with a Y-Linked Tetranucleotide Repeat Polymorphism", in S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen, A. J. Jeffreys (eds.), *DNA Fingerprinting: State of Science*. Birkhauser, Basel, 1993b, pp. 261-5.

SANTOS, F. R.; GERESDAIKHAN, T.; MUNKHTUJA, B.; OYUNSUREN, T.; EPPLIN, J. T.; PENA, S. D. J. "Geographic Differences in the Allele Frequencies of the Human Y-Linked Tetranucleotide Polymorphism *DYS19*", in *Hum. Genet.*, 97, 1996b, pp. 309-13.

SANTOS, F. R.; HUTZ, M. H.; COIMBRA, C. E. A.; SANTOS, R. V.; SALZANO, F. M.; PENA, S. D. J. "Further Evidence for the Existence of a Major Founder Y Chromosome Haplotype in Amerindians", in *Braz. J. Genet.*, 18, 1995a, pp. 669-72.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLIN, J. T. "Genetic and Population Study of a Y-Linked Tetranucleotide Repeat DNA Polymorphism with a Simple Non-Isotopic Technique", in *Hum. Genet.*, 90, 1993a, pp. 655-6.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; TYLER-SMITH, C. "PCR Haplotypes for the Human Y Chromosome Based on Aliphoid Satellite DNA Variants and Heteroduplex Analysis", in *Gene*, 165, 1995b, pp. 191-8.

SANTOS, F. R.; RODRIGUEZ-DELFIN, L.; PENA, S. D. J.; MOORE, J.; WEISS, K. M. "North and South Amerindians May Have the Same Major Founder Y Chromosome Haplotype", in *Am. J. Hum. Genet.*, 58, 1996a, pp. 1.369-70.

SANTOS, F. R.; BIANCHI, N. O.; PENA, S. D. J. "Worldwide Distribution of Human Y Chromosome Haplotypes", in *Genome Research*, 6, 1996, pp. 601-11.

STALLINGS, R. L.; FORD, A. F.; NELSON, D.; TORNEY, D. C.; HILDEBRAND, C. E.; MOYZIS, R. K. "Evolution and Distribution of (GT)<sub>n</sub> Repetitive Sequences in Mammalian Genomes", in *Genomics*, 10, 1991, pp. 807-15.

TAUTZ, D. "Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers", in *Nucleic Acids Res.*, 17, 1989, pp. 6.463-71.

UNDERHILL, P. A.; JIN, L.; ZEMANS, R.; OEFNER, P. J.; CAVALLI-SFORZA, L. L. "A pre-Columbian Y Chromosome-specific Transition and its Implications for Human Evolutionary History", in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1995, pp. 196-200.

WEBER J. L.; MAY P. E. "Abundant Class of Human DNA Polymorphisms which can be Typed Using the Polymerase Chain Reaction", in *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 1989, pp. 388-96.

WHITFIELD, L. S.; SULSTON, J. E.; GOODFELLOW, P. N. "Sequence Variation of the Human Y Chromosome", in *Nature*, 378, 1995, pp. 379-80.

YANDELL, D. W.; DRYJA, T. P. "Detection of DNA Sequence Polymorphisms by Enzymatic Amplification and Direct Genomic Sequencing", in *Am. J. Hum. Genet.*, 45, 1989, pp. 547-55.

ZAGO, M. A.; SILVA, W. A.; TAVELLA, M. H.; SANTOS, S. E. B.; GUERREIRO, J. F.; FIGUEIREDO, M. S. "Interpopulational and Intrapopulational Genetic Diversity of Amerindians as Revealed by Six Variable Number of Tandem Repeats", in *Hum. Hered.*, 46, 1996, pp. 274-89.