DANIELA MARIA RIBEIRO

HAPLÓTIPOS DO ELEMENTO REGULATÓRIO DOS GENES DA GLOBINA α EM DUAS POPULAÇÕES INDÍGENAS BRASILEIRAS

CAMPINAS

2002

DANIELA MARIA RIBEIRO

HAPLÓTIPOS DO ELEMENTO REGULATÓRIO DOS GENES DA GLOBINA α EM DUAS POPULAÇÕES INDÍGENAS BRASILEIRAS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.

ORIENTADORA: *PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI*
CO-ORIENTADORA: *PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO*

CAMPINAS

2002

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Membros:

1.

2.

3.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

EPÍGRAFE

"É dentro do coração que encontramos motivação para realizar mais do que pensávamos conseguir, superando os obstáculos que nos desafiam no dia-a-dia.

A vida é assim mesmo, cheia de incertezas quanto ao momento seguinte. Entretanto, é isso que faz a vida valer a pena e nos estimula a inventar, a criar, a realizar, a tentar melhorar o nosso mundo e buscar os nossos sonhos".

DEDICATÓRIA

À minha mãe, que sempre me

apoiou e é meu exemplo de vida, de amor e de fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha luz e fortaleza na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, por orientar este trabalho com paciência e dedicação, acreditar no meu desempenho e pelo carinho e amizade.

À Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo, pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Francisco Mauro Salzano, por suas precisas observações e sugestões.

À Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, pela pronta disponibilidade em participar de minha banca e incentivo.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e à Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo, pela participação neste projeto.

À Elza, Sirley, Márcia, Dorival, Fernando Krugner, Eliane e Aline, pela amizade.

Às amigas Lau, Tânia e Denise pela alegria.

Às minhas amiguinhas do coração Denise Faustino, Nádia, Simone Bordignon, e Simone Sant'Anna pelo apoio, carinho e por tantos momentos bons que passamos juntas. À Denise, por estar sempre presente nos momentos que precisei e pela sintonia que sempre tivemos. À Nádia, por tantas tardes filosofando e por me fazer rir. À Simone Bordignon, por ser tão meiga e companheira. À Simone Sant'Anna, pela serenidade e bondade.

À Alessandra, Ana Cristina, Margareth, Cláudia, Regina, Marina, Ronaldo, Fernando, Ciça, Gisele e Érika, pela amizade.

À Dona Maria, por cuidar de nossos instrumentos de trabalho.

Aos meus amigos Adriano, Carolina, Cleber, Dariel, Flávio, Guigo, Paulo, Rodrigo, Viviane, Waldemir e toda a minha turma, pela amizade, incentivo e momentos de muita alegria.

Às minhas "irmãzinhas" do coração Ariana, Fabiane, Mariangela e Melissa, por serem minhas irmãs de verdade.

Ao meu namorado Carlos, pelo carinho, compreensão e constante apoio.

Ao Márcio, Célia e sua família, pelo grande carinho e amizade em todos os momentos.

Ao meu pai, que sempre torceu e, tenho certeza, que continua torcendo por mim.

À minha querida família, que soube entender os meus períodos de ausência e sempre me apoiou.

À Rossana Verônica Mendoza López, do Instituto de Estatística da UNICAMP.

À FAPESP e FAEP-UNICAMP, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

PÁG.

RESUMO..... *xi*

ABSTRACT..... *xiii*

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 15

1.1. As Hemoglobinas Humanas.....……..... 16

1.2. Os Genes das Globinas.....…….... 17

1.3. Regulação da Expressão dos Genes das Globinas.....……..... 18

1.4. Polimorfismos do DNA.....……..... 20

1.5. Haplótipos do "α-MRE".....……..... 21

1.6. A Origem dos Povos Nativos Americanos.....……..... 23

1.7. Índios Parakanã e Xikrin...……..... 30

2. CAPÍTULO 1: "HAPLOTYPES OF THE α-GLOBIN GENE REGULATORY ELEMENT IN TWO BRAZILIAN NATIVE POPULATIONS"…….…… 32

3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS..... 46

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 51

ANEXO 1: Relatório estatístico sobre os haplótipos do "α-MRE" nas populações indígenas Parakanã e Xikrin..... 61

ANEXO 2: Determinação dos haplótipos do "α-MRE" em indivíduos com a deleção $-\alpha^{3.7}$..... 101

LISTA DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1: Representação esquemática da molécula de hemoglobina.....16

Figura 2: *Cluster* β, localizado no braço curto do cromossomo 11..... 17

Figura 3: *Cluster* α, localizado no braço curto do cromossomo 16..... 17

Figura 4: Possíveis rotas da chegada do homem ao continente americano..... 29

LISTA DE TABELAS

PÁG.

Tabela 1: Haplótipos do "α-MRE" observados nas populações estudadas por Harteveld (1997)..... 21

Tabela 2: Freqüência dos haplótipos do "α-MRE" nas populações estudadas por Harteveld (1997)..... 22

RESUMO

A expressão dos genes da globina α em humanos é regulada por um elemento denominado "α-MRE" (α-major regulatory element), de 350 pares de base, altamente conservado, localizado no cromossomo 16, há cerca de 40 kb do *cluster* α, em direção ao telômero. Polimorfismos genéticos deste elemento foram recentemente determinados em algumas populações africanas, européias e asiáticas. Seis diferentes haplótipos (de A a F) foram encontrados, em padrões característicos de cada população. Nenhum estudo foi feito ainda em populações brasileiras. O objetivo do presente trabalho foi determinar os polimorfismos presentes no "α-MRE" de representantes de duas populações indígenas brasileiras (Parakanã e Xikrin), e compará-los às populações já estudadas, em particular às asiáticas, face à teoria de ocupação das Américas. Foram analisadas 70 amostras de DNA de Ameríndios da Tribo Parakanã e 95 amostras de Ameríndios da Tribo Xikrin, ambas do Estado do Pará, norte do Brasil. A metodologia envolveu a amplificação do "α-MRE" pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o seqüenciamento direto dos produtos da PCR. Foram identificados apenas os haplótipos A e B. Em 330 cromossomos dos indígenas analisados, observou-se o predomínio do haplótipo A (80%), seguido do haplótipo B (20%), sendo estes os haplótipos mais frequentes nas populações do continente asiático. Nas populações indonesiana, chinesa e indiana, o haplótipo A é o predominante (67% a 78%), seguido do haplótipo B (22% a 32%). A população Parakanã não diferiu de nenhuma população do sudeste asiático e nem da população indonesiana. Já a população Xikrin, que apresentou a freqüência do haplótipo A bastante elevada (87%), diferiu significativamente das populações chinesa e indiana, mas não da população indonesiana, que apresenta a maior freqüência do haplótipo A (78%) entre todas as populações já estudadas. Os resultados acima corroboram as hipóteses de uma origem asiática para os Ameríndios, e sugerem que os índios da América do Sul e as populações das ilhas do Pacífico podem não ser geneticamente independentes. Este é o primeiro estudo do elemento regulatório dos genes α em populações brasileiras.

ABSTRACT

Regulation of expression in the human α-globin genes is dependent on a well conserved 350 bp regulatory element, identified as α-MRE (α-major regulatory element), which is located along the chromosome 16, 40 kb upstream of the α-globin gene cluster forward to telomere. Genetic polymorphisms of this element were studied in some populations from Africa, Europe and Asia. Six different α-MRE haplotypes, named from A to F, were found. The aim of the present study was to determine the sequence heterogeneity of this important regulatory element in Amerindians of two Brazilian populations (Parakanã and Xikrin) and to compare them with the studied populations, specially with the Asian populations, because of the theory of America occupation. No other studies have been performed in Brazilian populations in order to identify these polymorphisms so far. Seventy DNA samples from individuals from Parakanã Indian tribe and 95 samples from individuals from Xikrin tribe were studied. Methodology included PCR amplification of the α-MRE and direct sequencing of the PCR products. Only A and B haplotypes were found among the DNA samples studied. In 330 chromosomes from Parakanã and Xikrin, the A haplotype was the predominant one (80%), folowed by the B haplotype (20%). In the Indonesian, Chinese and Indian populations, the A haplotype is the predominant one (67% - 78%), folowed by the B haplotype (22% - 32%). No difference was observed among the Parakanã and East Indian, Chinese and Indonesian. The Xikrin samples showed a high divergence in genotype frequencies in comparison with East Indian and Chinese; on the other hand, no difference was seen between the Xikrin and Indonesian samples. These findings corroborate the hypothesis of an Asiatic origin of the Amerindians and suggest that South American Indians and Pacific islands populations may not be genetically independent. This study is the first analysis of the α-MRE haplotypes for the Brazilian population.

1.INTRODUÇÃO GERAL

1.1. AS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As hemoglobinas (Hb) humanas são proteínas tetraméricas compostas de duas cadeias globínicas do "tipo α" (α ou ζ) e duas cadeias do "tipo β" (β, δ, γ ou ε). Cada cadeia contém um grupo prostético heme (Fig. 1), que se liga de forma reversível à molécula de O_2, transportando-a dos pulmões aos tecidos (Bunn e Forget, 1986).

Na fase embrionária, são produzidas as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\ \varepsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$). Durante o período fetal, a produção dessas hemoglobinas dá lugar à síntese de Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), que, por sua vez, é substituída pelas Hbs A ($\alpha_2\beta_2$) e A_2 ($\alpha_2\delta_2$) no estádio adulto. Após os seis meses de vida, os indivíduos normais apresentam cerca de 95% de Hb A, 2-3% de Hb A_2 e 0-2% de Hb F (Bunn e Forget, 1986; Stammatoyannopoulos e col., 1994).

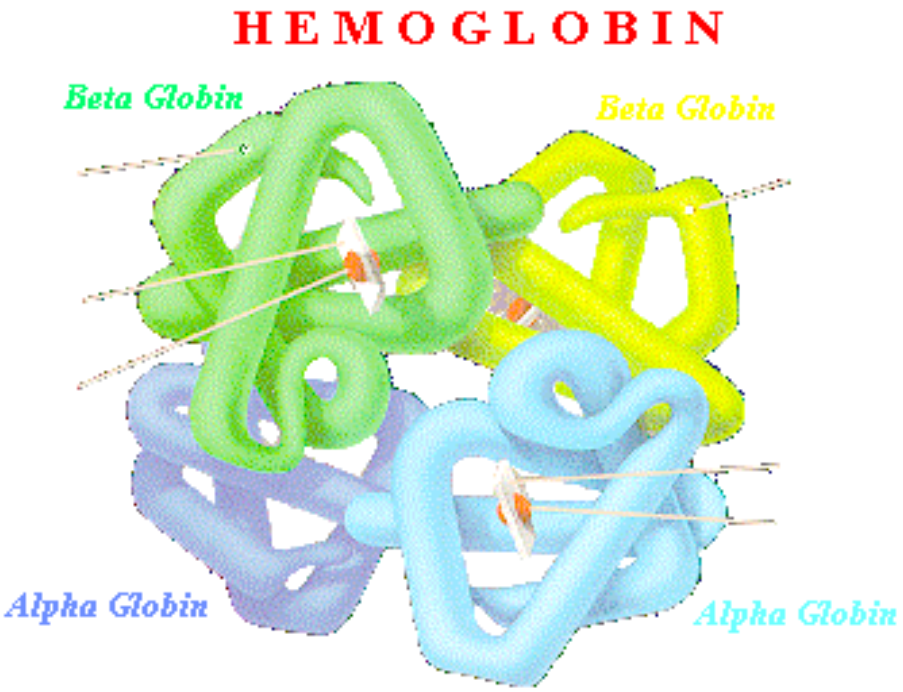

Figura 1: Representação esquemática da molécula de hemoglobina.

1.2. OS GENES DAS GLOBINAS

Os genes responsáveis pela codificação das cadeias globínicas são compactos, com cerca de 1 a 2 Kb de DNA, formados por 3 exons e 2 introns e estão localizados em dois agrupamentos, ou *clusters*, denominados de α e β, onde se encontram dispostos na ordem em que são expressos durante o desenvolvimento do indivíduo (Figs. 2 e 3).

O *cluster* β é composto pelo pseudogene β, pelo gene embrionário ε, pelos genes $^{G}\gamma$ e $^{A}\gamma$ e pelos genes δ e β, e está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) (Fritsch e col., 1980).

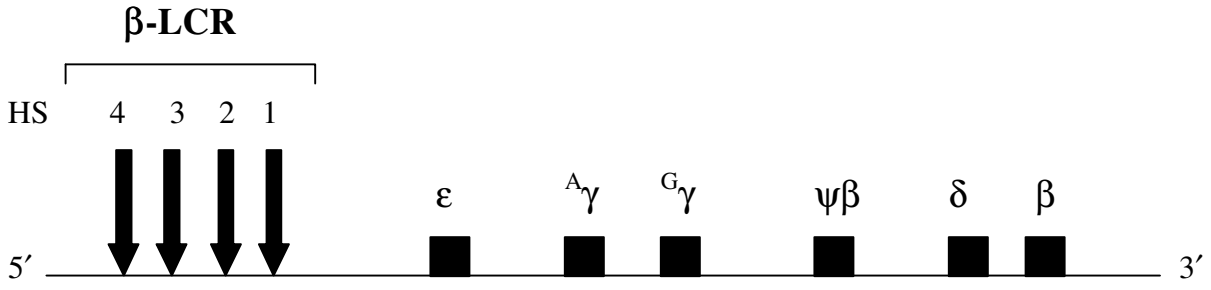

Figura 2: *Cluster* β, localizado no braço curto do cromossomo 11.

O *cluster* α é composto pelo gene embrionário ζ_2, os pseudogenes ψζ, $\psi\alpha_2$ e $\psi\alpha_1$, os genes da globina α duplicados (α_2 e α_1) e o gene θ_1, de função ainda indeterminada, e está localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) (revisado por Higgs, 1993).

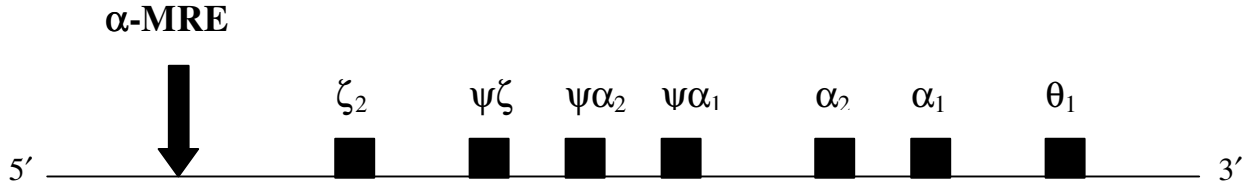

Figura 3: *Cluster* α, localizado no braço curto do cromossomo 16.

1.3. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS GLOBINAS

A expressão dos genes globínicos em ambos os *clusters* é regulada de acordo com o estágio de desenvolvimento humano e de maneira tecido-específico. Esta complexa regulação depende de seqüências localizadas nas regiões promotoras dos genes e seqüências regulatórias localizadas muitas kilobases acima de cada *cluster* gênico (Grosveld e col., 1987; Forrester e col., 1987; Higgs e col., 1990).

O promotor é uma seqüência de DNA onde se associam os fatores de transcrição (TFs) e a RNA polimerase II. A característica mais importante do promotor é o TATA box, uma seqüência curta de bases T-A, que é reconhecida pelo fator geral de transcrição TFIID, responsável pelo posicionamento da RNA polimerase II no sítio de início da transcrição. Este sítio está localizado cerca de 25 pb após o TATA box. As seqüências regulatórias possuem sítios de ligação para proteínas regulatórias. Enquanto os fatores gerais de transcrição são similares para todos os genes transcritos pela RNA polimerase II, as proteínas regulatórias e as seqüências às quais se ligam são específicas para cada gene (Tjian, 1995).

No *cluster* β, seqüências regulatórias estão associadas a quatro sítios hipersensíveis à Dnase I (HS 1-4), específicos de células eritróides e localizados 6 a 18 Kb acima do gene ε (Fig. 2). O segmento de DNA que compreende os sítios é denominado região de controle do lócus β (β-LCR) (Grosveld e col., 1987).

A regulação da expressão do *cluster* α em humanos é similarmente dependente de um elemento regulatório, denominado HS-40, que consiste num sítio hipersensível à Dnase I, específico de eritrócitos e localizado 40 Kb acima do sítio CAP do gene ζ_2, em direção ao telômero (Fig. 3) (Higgs e col., 1990). Sua existência foi primeiramente inferida devido a deleções bem acima dos genes da globina α que resultavam no fenótipo de talassemia α (Higgs, 1993).

Cada seqüência regulatória, associada a um sítio hipersensível à Dnase I, contém um conjunto de sítios de ligação, *in vitro* e *in vivo*, para proteínas regulatórias específicas de células eritróides e não eritróides (Philipsen e col., 1990; Talbot e col., 1990; Jarman e col., 1991; Pruzina e col., 1991; Talbot e Grosveld, 1991; Ikuta e Kan, 1991; Reddy e Shen, 1991; Strauss e col., 1992; Strauss e Orkin, 1992 e Zhang e col., 1993).

Devido à ancestralidade comum entre os *clusters* α e β e à similar organização, assumiu-se durante algum tempo que a regulação da expressão dos genes globínicos pelo β-LCR e HS-40 ocorria de maneira similar. Porém, estudos *in vivo* e *in vitro* sugeriram um papel diferente para o HS-40 e o β-LCR na regulação gênica de seus respectivos *clusters* (Craddock e col., 1995). Ratos transgênicos, portando construtos com o gene da globina β sob controle do β-LCR, mostraram níveis de expressão proporcionais ao número de cópias do gene β, independentemente da posição de integração do gene no genoma murino (Grosveld e col., 1987). Em contraste, nos ratos transgênicos com construtos contendo o gene da globina α sob controle do HS-40, embora o nível de expressão gênica aumente, ele não está relacionado ao número de cópias do gene integrado (Sharpe e col., 1992 e 1993; Gourdon e col., 1994). Essas diferenças na regulação da expressão gênica podem ser explicadas pelos efeitos da cromatina no sítio de integração dos genes.

Além de atuar como um elemento *enhancer*, ativando a expressão dos genes do *cluster* β, o β-LCR tem a função adicional de alterar a estrutura da cromatina em que estes genes estão inseridos, para que eles possam ser transcritos. O *cluster* β está localizado em uma região do genoma rica em A-T, de cromatina altamente condensada, onde se localizam genes ativos em poucos tipos celulares. Em células não eritróides, o domínio cromatínico, onde o *cluster* β está contido, é insensível à Dnase I, replica-se tardiamente (durante a segunda metade da fase S do ciclo celular) e está transcricionalmente inativo. Em células eritróides, este domínio torna-se sensível à Dnase I, replica-se logo no início da fase S e a transcrição gênica é ativada. As mudanças tecido-específicas na estrutura da cromatina são atribuídas ao β-LCR, que provoca sua descondensação, facilitando a interação das proteínas regulatórias ao DNA e ativando a expressão dos genes do *cluster* β (Craddock e col., 1995).

Diferentemente do β-LCR, o HS-40 não altera a estrutura da cromatina onde o *cluster* α está contido. Ele está localizado em uma região do genoma rica em G-C, de cromatina descondensada tanto em células eritróides quanto em não eritróides, e que replica-se logo no início da fase S do ciclo celular; assim sendo, a função principal do HS-40 é atuar como um elemento *enhancer*, ativando a expressão dos genes do *cluster* α (Vyas e col., 1992; Craddock e col., 1995).

A atividade do elemento regulatório HS-40, que foi denominado posteriormente elemento regulatório maior ("α-MRE"), está restrita a um fragmento de DNA de aproximadamente 350 pb, no qual vários sítios de ligação para proteínas regulatórias têm sido identificados. Estes incluem quatro potenciais sítios para o fator de transcrição GATA-1, eritróide-específico, dois para o fator NF-E2 e quatro "boxes" CACC (Jarman e col., 1991). Estes sítios de ligação foram bem conservados durante a evolução, enquanto as seqüências externas aos mesmos mostraram uma menor conservação. Nestas últimas, as mudanças polimórficas são mais freqüentemente encontradas (Kielman e col., 1994; Kielman, 1996).

1.4. POLIMORFISMOS DO DNA

Grande parte das variações genômicas são polimorfismos produzidos pela simples substituição de um nucleotídeo ("SNPs" ou "single nucleotide polymorphisms"), com frequências entre 1 e 99%, responsáveis pela diversidade genética entre os indivíduos. Ao padrão de combinações de sítios polimórficos que ocorrem, simultaneamente, em um mesmo cromossomo, é dado o nome de haplótipo (Orkin e col., 1983).

A análise dos haplótipos pode revelar importantes informações sobre a origem das mutações genéticas. Em estudos familiares, ajuda na distinção entre os padrões de herança das doenças genéticas e na identificação dos indivíduos. Pode contribuir também para a compreensão da evolução humana e sua migração através do globo terrestre (Hill e col., 1985; Ramsay e Jenkins, 1987; Hertzberg e col., 1988; Fodde e col., 1988, 1991; Flint e col., 1993 a, b).

A reconstrução histórica da evolução e das migrações humanas é baseada em dados arqueológicos, estudos de lingüística e de polimorfismos da genética clássica, tais como grupos sangüíneos, proteínas séricas, enzimas eritrocitárias e antígenos de histocompatibilidade (Cavalli-Sforza e col., 1988, 1994; Salzano e col., 1997; Salzano, 1998). No entanto, a utilização de métodos de biologia molecular permitiu grandes avanços nos estudos antropológicos pela possibilidade de análise do DNA mitocondrial e nuclear (Kazazian e col., 1983; Wallace e col., 1985; Wainscoat e col., 1986; Chen e col., 1990; Long e col., 1990; Bonatto e col., 1996; Bonatto e Salzano, 1997 a, b).

Dentre os polimorfismos de DNA possíveis de serem estudados, os complexos dos genes da hemoglobina humana, pela grande variabilidade genômica observada, têm sido usados nos estudos da inter-relação entre as populações (Wainscoat e col., 1986; Chen e col., 1990; Long e col., 1990; Trent e col., 1988, 1990).

Desse modo, os haplótipos do elemento regulatório "αMRE" podem ser utilizados em estudos antropológicos, além de serem marcadores polimórficos para a determinação dos haplótipos do *cluster* α e de sua contribuição em estudos mais precisos sobre a segregação dos genes da talassemia α nas populações (Higgs e col., 1986).

1.5. HAPLÓTIPOS DO "α-MRE"

A heterogeneidade da seqüência de DNA deste importante elemento regulatório foi investigada em 7 diferentes grupos populacionais, entre africanos da língua Bantu, pigmeus africanos, holandeses, italianos, chineses, indianos e indonesianos (Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002). Seis diferentes haplótipos do "α-MRE", denominados de A a F (Tab. 1), foram encontrados, em padrões característicos de cada população.

Tabela 1. Haplótipos do "α-MRE" observados nas populações estudadas por Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002.

	+96[a]	**+130**	**+158**	**+199**	**+209**	**+212**
Haplótipo A	C	G	C	G	G	G
Haplótipo B	C	**A**[b]	C	**A**	G	G
Haplótipo C	C	**A**	C	**A**	**A**	G
Haplótipo D	C	G	**T**	G	G	G
Haplótipo E	C	G	C	G	G	**C**
Haplótipo F	**A**	G	C	G	G	G

[a] Posições dos sítios polimórficos do "α-MRE" em relação ao sítio CAP do gene ζ_2
[b] As letras em negrito indicam as substituições nucleotídicas em comparação ao haplótipo A

O haplótipo A, que deriva da seqüência publicada por Jarman e colaboradores (1991), é o haplótipo predominante em todas as populações estudadas. O haplótipo B difere do A em duas substituições de pares de base, nas posições 130 (G→A) e 199 (G→A). Os demais haplótipos derivaram dos haplótipos A ou B por uma simples substituição de base. O haplótipo C derivou do B por uma única substituição G→A na posição 209, enquanto os haplótipos D, E e F derivaram de A por substituições na posição 158 (C→T), 212 (G→C) e 96 (C→A), respectivamente (Tab. 1) (Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002).

Os haplótipos A e B são freqüentes em holandeses e italianos (43%: 57% e 56%: 43%, respectivamente). Nas populações indiana, africana, chinesa e indonesiana, o haplótipo A é o predominante (67% a 78%), seguido do haplótipo B (11% a 32%). O haplótipo C é relativamente raro em italianos e indianos, com uma freqüência de 1% ou menos, e não foi encontrado nas demais populações estudadas. O haplótipo D foi observado somente entre africanos, com uma freqüência relativamente elevada (4 a 16%). Os haplótipos E e F foram observados exclusivamente em pigmeus africanos, apresentando uma freqüência relativamente baixa (2% cada) ao lado dos haplótipos A, B e D, mais predominantes (Tab. 2) (Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002).

Tabela 2. Freqüência dos haplótipos do "α-MRE" nas populações estudadas por Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002.
(número de indivíduos estudados entre parênteses)

POPULAÇÕES	**HAPLÓTIPOS**					
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
Holandeses (35)	0,43	0,57				
Italianos (53)	0,56	0,43	0,01			
Indianos (39)	0,67	0,32	0,01			
Chineses (23)	0,74	0,26				
Indonesianos (34)	0,78	0,22				
Africanos (32)	0,73	0,11		0,16		
Pigmeus (60)	0,76	0,16		0,04	0,02	0,02

A grande prevalência e conservação do haplótipo A sugerem que os haplótipos D, E e F derivaram de A por uma simples substituição de base, que ocorreu somente na África. O raro haplótipo C derivou de B também por uma única substituição de base e foi encontrado exclusivamente nas populações italiana e indiana com uma freqüência baixa. Uma forma intermediária entre os haplótipos A e B, na qual somente uma substituição na posição 130 ou 199 tivesse ocorrido, não foi encontrada em nenhum dos indivíduos estudados (Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002).

Estes achados sugerem que a divergência entre os haplótipos A e B aconteceu antes da expansão demográfica humana, com A sendo a seqüência ancestral devido a sua conservação durante a evolução. O haplótipo intermediário entre A e B pode ter sido perdido durante a evolução ou deve estar presente na população africana em uma freqüência bastante baixa, impossível de ser observada em uma amostragem pequena da população. Uma alternativa pouco provável seria que o haplótipo B derivou do A através de um evento simples, sem a existência de uma forma intermediária (Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002).

1.6. A ORIGEM DOS POVOS NATIVOS AMERICANOS

O povoamento do Novo Mundo tem sido objeto de um grande número de estudos arqueológicos, lingüísticos e genéticos, porém todos esses estudos concordam que as populações indígenas das Américas descendem de populações que imigraram da Ásia através do Estreito de Bering, especialmente durante os períodos de glaciação, quando o nível do mar estava suficientemente baixo, criando uma ponte entre os continentes Asiático e Americano. O período destas migrações, seu número exato, a maneira pela qual teriam vindo da Ásia até as Américas e a sua composição étnica ainda são pontos controversos (Shields e col., 1992 e 1993; Hoffecker e col., 1993; Zago e Figueiredo, 1993; Cavalli-Sforza e col., 1994; Guerreiro e col., 1994; Bonatto e Salzano, 1997a, b).

Na maior parte da sua história, o clima da terra foi consideravelmente mais quente do que é hoje em dia. Períodos mais frios, que incluíam glaciações, parecem ter ocorrido em algumas épocas geológicas. No Pleistoceno, que se iniciou há cerca de 2 milhões de anos atrás, o clima mudou drasticamente; o clima ameno das regiões polares e subpolares

tornou-se muito mais frio, as calotas polares formaram-se e geleiras espalharam-se e retraíram-se repetidamente sobre a porção norte dos continentes boreais. Ocorreram muitos episódios menores de glaciações, e ao menos quatro maiores, dos quais o mais recente é o chamado de glaciação do Wisconsiano, na América do Norte (Futuyma, 1992).

Durante os episódios de glaciação, o nível do mar baixou no mundo todo quase 100 metros e as espécies animais e vegetais deslocaram-se rumo aos trópicos. Homens, saídos da Sibéria, atravessaram a Beríngia - uma vasta extensão de terra que ligava os continentes Asiático e Americano, hoje coberta pela águas oceânicas - em direção ao Alasca em busca de alimento, principalmente atrás dos grandes mamíferos, como os tigres-dente-de-sabre, mamutes, bisões e preguiças gigantes, e se instalaram na América. Dados arqueológicos e de sedimentos marinhos sugerem que as diminuições do nível do mar na região do estreito de Bering ocorreram entre os anos de 60 a 25.000 AC e entre 20 a 18.000 AC, embora alguns estudos proponham que esta comunicação tenha se mantido até 11 ou 10.000 AC (Hoffecker e col., 1993).

Embora os estudos concordem com a origem asiática das populações nativas americanas, o número e o período das migrações para a América ainda são questões polêmicas. Existem várias hipóteses que procuram explicar a chegada do homem à América a partir de material paleoarqueológico. Vestígios arqueológicos da presença humana entre os anos de 12 e 11.500 AC foram encontrados em sítios na Califórnia e México (América do Norte) e no Chile central, Peru e regiões Central e Nordeste do Brasil (América do Sul). Esses sítios contêm instrumentos de pedra lascada, feitos com matéria-prima trazida de fora da região; muitos desses objetos são complexos demais para terem sido produzidos por fenômenos naturais (Prous, 1999).

Em uma outra linha de trabalho, o bioarqueólogo Walter Neves, do Instituto de Biociências da USP, defende a hipótese de que os primeiros ocupantes do Novo Mundo chegaram entre os anos de 14 e 13.000 AC e descendiam de uma população não mongolizada da Ásia Central. Parte dessa população teria migrado para o sul, chegando à Austrália, enquanto outra parte teria viajado para o norte, entrando na América. Pode-se, assim, explicar a semelhança entre esqueletos humanos, encontrados em alguns sítios da América do Sul, entre os quais Luzia, o mais antigo crânio completo de *Homo sapiens* encontrado neste continente (resgatado na região mineira de Lagoa Santa e datado em

11.000 AC) e os atuais aborígenes australianos. Na região de origem, esses primitivos *Homo sapiens* teriam sido substituídos por populações mongolizadas, que, por sua vez, produziram novas ondas migratórias em direção à América. Não seria possível, portanto, estudar o DNA mitocondrial dos descendentes de Luzia porque eles podem não existir. O bioarqueólogo defende que o modelo de ocupação da América proposto por geneticistas, a partir do DNA mitocondrial de grupos indígenas atuais não está de acordo com os fósseis encontrados e afirma que pode ter havido perda de linhagens de DNA com o tempo, tanto na Ásia quanto na América. Os geneticistas, por sua vez, admitem que, se Luzia e seus contemporâneos não deixaram descendentes, não é possível negar ou provar sua existência pela análise das populações atuais (Prous, 1999; Pivetta, 2002).

Há vários sítios, no Brasil inclusive, com indícios de uma ocupação humana possivelmente mais antiga, porém todos apresentam problemas que impedem uma conclusão definitiva. A arqueóloga Niède Guidon defende a tese de que a presença humana na América remonta há 50.000 AC; ela sustenta essa idéia a partir de datações realizadas em restos de fogueira encontrados em São Raimundo Nonato, no Piauí (Prous, 1999).

Até algumas décadas atrás, a visão dominante sobre a colonização era a dos norte-americanos mais tradicionalistas, modelo conhecido como hipótese das "três ondas", ou seja, o continente americano foi povoado por três levas migratórias diferentes da Sibéria, que correspondem exatamente aos três grupos de nativos americanos, relacionados aos três grupos linguísticos: Ameríndio, Na-Dene e Esquimó-Aleut. De acordo com este modelo, os primeiros migrantes foram os Paleo-Índios, representados atualmente pelos Ameríndios, entre os anos de 14 e 12.000 AC; eles foram seguidos pelos Na-Dene, entre 11 e 10.000 AC, e posteriormente pelos Esquimós e Aleútes, em cerca de 4.000 AC. Essa linha de estudiosos relata que a primeira cultura a se estabelecer na América foi a de Clóvis, no Novo México, Estados Unidos, onde nunca foram encontradas ossadas humanas, mas, sim, muitas pontas de lança (Shields e col., 1992, 1993; Hoffecker e col., 1993; Zago e Figueiredo, 1993; Bonatto e Salzano, 1997a).

Um cenário diferente tem sido proposto devido às similaridades entre Na-Dene e Esquimós, sugerindo que a diferenciação dos Ameríndios ocorreu na Beríngia. Provavelmente, algum tempo após a colonização da região americana da Beríngia (Alaska - EUA e Yukon - Canadá), um grupo de migrantes alcançou as planícies da América do

Norte através de um corredor livre de gelo que, acredita-se, tenha existido durante o último período glacial (25 a 14.000 AC), povoando o resto do continente entre os anos de 17 e 14.000 AC e alcançando a América do Sul em torno de 12.000 AC. Com o fechamento deste corredor, os indivíduos que migraram para o sul ficaram isolados dos que permaneceram na Beríngia. Este isolamento pode explicar a maior afinidade genética observada entre os grupos Na-Dene, Esquimó e os siberianos Chukchi que aí permaneceram, quando comparados aos Ameríndios que povoaram o sul (Fig. 4) (Hoffecker e col., 1993; Bonatto e Salzano, 1997a).

Estudos baseados em RFLPs ("Restriction Fragment Length Polymorphisms") e sequências da região controle do DNA mitocondrial têm mostrado que a grande maioria dos DNAs mitocondriais dos nativos americanos podem ser classificados em quatro "clusters" distintos, denominados de haplogrupos A, B, C e D. A distribuição destes quatro haplogrupos entre os Ameríndios, Na-Dene e Esquimós, assim como estimativas da diversidade interna de cada haplogrupo, levaram a muitas hipóteses sobre o período e número de migrações para o Novo Mundo. Por exemplo, o modelo de três migrações propõe que os Ameríndios originaram-se de duas levas migratórias, a primeira portando os haplogrupos A, C e D, entre os anos de 34 e 26.000 AC, e a segunda sequências do haplogrupo B, entre 15 e 12.000 AC. A terceira leva migratória originou a população Na-Dene e ocorreu entre 9 e 7.000 AC, sendo mais recente devido à menor diversidade do haplogrupo A entre os Na-Dene, quando comparados aos Ameríndios. Nada foi dito a respeito da origem dos Esquimós. Alternativamente, foi proposto que cada uma das quatro linhagens de DNA mitocondrial representaria migrações diferentes vindas da Ásia, que ocorreram entre os anos de 21 e 14.000 AC. Estudos atuais baseados no DNA mitocondrial sustentam a idéia de que a entrada do homem no continente americano é mais antiga do que normalmente se pensa (> 20.000 AC) e de que o processo se deu em apenas uma única e reduzida leva migratória (Wallace e col., 1985; Shields e col., 1992; Torroni e col., 1993a, b; Bonatto e Salzano, 1997a, b).

Um estudo recente, feito por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que analisaram o cromossomo Y de grupos de ameríndios, sustenta a hipótese de que houve apenas uma leva migratória, entre 30 e 15.000 AC, uma conclusão na linha do artigo produzido por pesquisadores da USP de Ribeirão Preto com o DNA

mitocondrial de índios nativos do continente americano, a maioria pertencente a etnias presentes no Brasil (Pivetta, 2002). Os pesquisadores da universidade paulista sequenciaram uma região contínua de 8.8 kb do DNA mitocondrial de 30 ameríndios, cujos DNAs mitocondriais pertencem aos quatro haplogrupos que caracterizam os povos nativos das Américas. O alto grau de similaridade na diversidade nucleotídica e o tempo de diferenciação (aproximadamente 21.000 anos AC) dos haplogrupos suportam uma origem comum para estas linhagens de DNA mitocondrial. A idade de diferenciação dos haplogrupos coincide com o processo de colonização do Novo Mundo e reforça a hipótese de que o *Homo sapiens* atingiu o Alasca, vindo da Ásia, há 21.000 anos em apenas uma leva migratória (Silva Jr e col., 2002).

O modelo de "três ondas" e muitos outros modelos para a colonização do continente americano consideram a Beríngia apenas um corredor ou uma ponte terrestre para a migração para a América, localizando a origem das diferentes migrações em algum lugar da Ásia. Os estudos atuais sobre essa temática colocam a Beríngia em um papel de destaque, onde, a partir de poucos indivíduos que aí se estabeleceram, origina-se uma grande população que vai colonizar as Américas (Bonatto e Salzano, 1997a).

Enquanto a arqueologia fornece evidências da presença humana na América entre os anos de 12.500 e 11.000 AC, lingüistas e estudiosos do DNA mitocondrial acreditam que a diversificação biológica e lingüística verificada no continente americano permite supor um período de tempo maior, entre 20 e 30.000 AC (Prous, 1999).

A possibilidade de uma contribuição de imigrantes das ilhas do Pacífico na formação étnica da população americana é ainda questão em aberto. A probabilidade de que alguma leva de imigrantes tenha vindo pelo mar há mais de 10.000 AC, quando as técnicas de navegação eram muito precárias, é remota. A propósito, o povoamento das ilhas do Pacífico é comprovadamente muito mais recente; a colonização da Ilha da Páscoa, por exemplo, só ocorreu há 1.200 - 1.600 anos atrás. O fato da população Oceânica, assim como a Americana, derivar de ancestrais asiáticos, pode explicar a similaridade genética observada entre elas (Zago e Figueiredo, 1993; Bonatto e col., 1996; Prous, 1999).

A partir da década de 90, iniciaram-se, em populações indígenas brasileiras, estudos dos polimorfismos dos genes das globinas α e β humanas com a finalidade de identificar uma possível afinidade genética com outras populações. Até o momento, os resultados das

diferentes abordagens realizadas em nosso meio mostraram uma semelhança genética da população indígena brasileira com as populações do Sudeste Asiático e da ilhas do Pacífico (Guerreiro e col., 1992, 1994; Zago e Figueiredo, 1993; Bevilacqua e col., 1995; Zago e col., 1995).

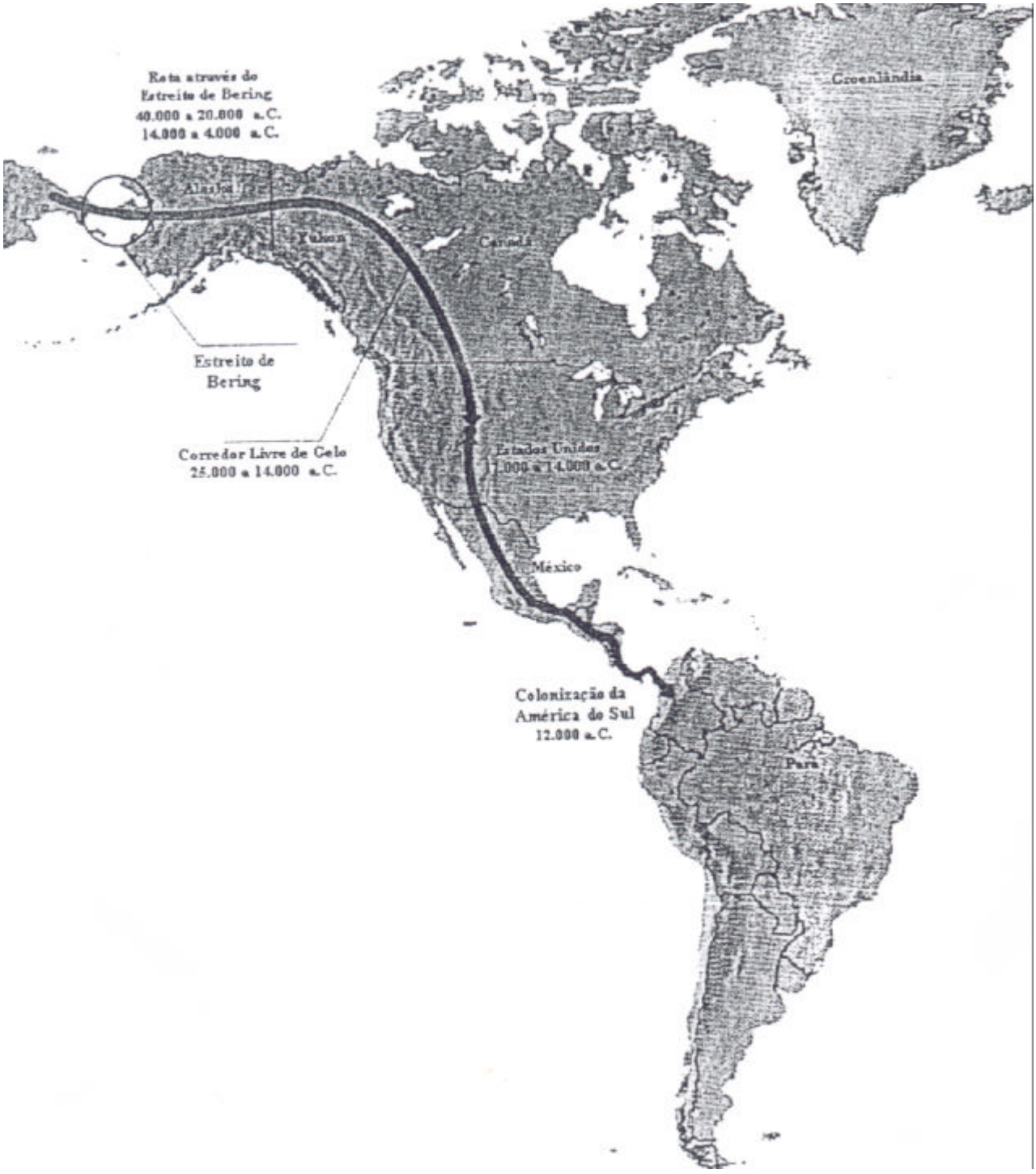

Figura 4: Possíveis rotas da chegada do homem ao continente americano.

1.7. ÍNDIOS PARAKANÃ E XIKRIN

Os índios Parakanã pertencem ao tronco lingüístico Tupi e vivem em três aldeamentos (Paranatí, Maradjewara e Bom Jardim), situados ao norte do estado do Pará. Informações sobre este grupo indígena são recentes e somente foram obtidas a partir da década de 70, quando parte deles foi contatada pelas frentes de atuação da FUNAI – Fundação Nacional do Índio. O primeiro contato dos Parakanã com não-índios foi em 1971 (Black e col., 1980).

Os Parakanã possuem hábitos próprios como comportamento menos belicoso que os vizinhos Kayapó e a poligamia, com casamentos preferencialmente constituídos entre tios e sobrinhas (Black e col., 1980). São conhecidos regionalmente como índios brancos devido à característica cor clara de sua pele; muitos homens possuem também barbas espessas, característica incomum entre os povos indígenas. Entretanto, vários marcadores genéticos, como a ceruloplasmina, esterase D, fosfoglucomutase e alguns antígenos eritrocitários como Duffy (a), Diego (a) e MNSs, não mostraram evidências de miscigenação com caucasóides (Race e Sanger, 1976; Black e col., 1980).

Os índios Xikrin pertencem ao grupo Kayapó Setentrional e falam a língua Kayapó, da família lingüística Jê, tronco Macro-Jê. No estado do Pará, os Xikrin vivem em duas regiões indígenas: Cateté e Bacajá. A área dos Xikrin do Cateté é banhada pelos rios Itacaiúnas e Cateté e situa-se em terras firmes de mata tropical. Os Xikrin do Bacajá vivem à margem esquerda do médio rio Bacajá, afluente da margem direita do Xingu (Vidal, 1972).

Os Xikrin costumavam se auto-denominar Put Karôt, tendo o nome Xikrin surgido do modo como outro grupo Kayapó, os Irã-ã-mray-re, já extintos, os chamavam. Os Xikrin que vivem na região do rio Bacajá reconhecem o grupo que vive na região do rio Cateté como Put Karôt, mas não a si mesmos (Vidal, 1972).

O primeiro contato dos Xikrin com não-índios foi na década de 50, quando foram vitimados por epidemias que ocasionaram muitas mortes (Vidal, 1972). Nesta população, não há evidências de miscigenação devido, principalmente, ao difícil acesso ao território ocupado por este grupo indígena e à restrição de entrada imposta pela FUNAI.

A proposta do presente estudo foi identificar os haplótipos do elemento "α-MRE" em representantes das populações indígenas Parakanã e Xikrin e compará-los às populações preliminarmente estudadas (Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002). A comparação com os haplótipos encontrados em nossa população indígena pode contribuir para as teorias que buscam elucidar o processo de povoamento das Américas e da origem da população indígena brasileira.

2. CAPÍTULO 1

Submetido à publicação no **American Journal of Physical Anthropology**

HAPLOTYPES OF THE α-GLOBIN GENE REGULATORY ELEMENT IN TWO BRAZILIAN NATIVE POPULATIONS

DANIELA M. RIBEIRO[1]; MARIA S. FIGUEIREDO[3]; FERNANDO F. COSTA[2] and MARIA F. SONATI[1]

[1]Department of Clinical Pathology and [2]Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas (SP), [3]Department of Medicine, Federal University of São Paulo–UNIFESP, São Paulo (SP), Brazil

Number of Text Pages: 9

Number of Tables: 5

Running Title: α-MRE haplotypes in Brazilian Native Indians

Correspondence: M.F.Sonati - Department of Clinical Pathology - School of Medical Sciences - State University of Campinas – UNICAMP – P.O. Box 6111 – ZIP Code 13083-970 – Campinas – State of São Paulo (SP) – Brazil – Phone (55-19) 3788-9453 – Fax (55-19) 3788-9434 – E-mail: sonati@fcm.unicamp.br

KEY WORDS: α-MRE haplotypes, genetic polymorphisms, Brazilian population, South American Indians

ABSTRACT The α-Major Regulatory Element (α-MRE), located 40 Kb far upstream of the α-globin gene cluster on chromosome 16, is involved in the regulation of the human α-globin genes expression. The activity of this element is restricted to a 350 bp fragment in which several nuclear protein binding sites have been identified. This element is genetically polymorphic and different haplotypes, named from A to F, have been determined in seven populations of Europe, Africa, Asia and Oceania. We describe here the α-MRE haplotypes found in native Indians from 2 non-miscegenated tribes of the north region of Brazil, in Amazonia, the Parakanã and the Xikrin. The A haplotype was predominant in both (70% and 87%, respectively), followed by the B haplotype (30% and 13%, respectively). The haplotype frequency distribution among the Parakanã was similar to those reported for Indonesians and Southeast Asian populations, while the distribution among the Xikrin showed higher similarity to those observed in Indonesians. These results corroborate the existence of genetic affinities between Brazilian Indians and Southeast Asian and Oceanic populations. This was the first investigative work on the α-MRE polymorphism in South American native populations in general or Brazilian native populations in particular.

The human hemoglobin is a globular protein that consists of two α-like and two β-like globin polypeptide chains. Each globin chain is associated with a heme group, which is capable of binding reversibly one molecule of oxygen, transporting it from the lungs to the periferal tissues (Dickerson and Geiss, 1983). The α and β globin gene clusters, on chromosomes 16 and 11 respectively, are responsible for the globin synthesis; both genetic polymorphisms have been used to study the evolutionary relationships of human populations (Higgs et al., 1986; Wainscoat et al., 1986; Chen et al., 1990; Long et al., 1990; Trent et al., 1988, 1990).

Amerindians are widely believed to be the descendants of small groups of hunter-gatherers who crossed the Bering land bridge from northeastern Asia in the late Pleistocene (Spencer et al., 1977; Laughlin and Wolf, 1979; Feidel, 2000). Studies on the distribution of the globin haplotypes in native populations of the New World demonstrate a similarity of Amerindians to populations from Asia and the Pacific Islands (Guerreiro et al., 1992, 1994; Zago et al., 1993, 1995; Bevilaqua et al., 1995; Mattevi et al., 2000).

The expression of the α-globin genes is controlled by an element located 40 Kb far upstream of the respective cluster on chromosome 16; this polymorphic, erythroid specific, DnaseI hypersensitive site is known as HS-40, α-Locus Controlling Region (α-LCR) or Major Regulatory Element (α-MRE). The α-MRE haplotypes can be used as markers for linkage analyses in addition to the common RFLP′s and VNTR′s and, also, be useful for anthropological studies (Higgs et al., 1990; Kielman et al., 1993; Kielman, 1996; Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press).

The polymorphism of this regulatory element was studied by Harteveld (1997) in seven populations from Africa, Europe, Asia and Oceania (i.e. Bantu-speaking Africans, African Pygmies, Dutch, Italians, Chinese, East Indians and Indonesians). Six different α-MRE haplotypes, named from A to F (Table 1), were found. The A haplotype derives from the sequence published by Jarman et al. (1991) and the B haplotype differs from A in two positions: 130 (G→A) and 199 (G→A). All the other haplotypes are derived from these two haplotypes by a single base pair substitution (Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press).

The A and B haplotypes are frequent in Dutch and Italians (43%: 57% and 56%: 43%, respectively). In the Indonesian, Chinese and African populations, the A haplotype is the predominant one (73 – 78%). The C haplotype has only been found in Italians and Indians with a frequency of 1%. The D haplotype has been found among Africans, in a relatively high frequency (4 – 16%); the E and F haplotypes have exclusively been found in Pygmies with a frequency of 2% each (Table 2) (Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press).

Table 1. α-MRE haplotypes (Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press).

	+96[a]	+130	+158	+199	+209	+212
Haplotype A	C	G	C	G	G	G
Haplotype B	C	**A**[b]	C	**A**	G	G
Haplotype C	C	**A**	C	**A**	**A**	G
Haplotype D	C	G	**T**	G	G	G
Haplotype E	C	G	C	G	G	**C**
Haplotype F	**A**	G	C	G	G	G

[a] Positions of the "α-MRE" polymorphic sites in relation to the CAP-site of the ζ-gene

[b] Black letters indicate the nucleotide substitutions in comparison to the A haplotype

Table 2. α-MRE haplotype frequencies and 95% confidence intervals (Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press).

(number of studied individuals is indicated in parenthesis)

Populations	**Haplotype**					
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
Dutch (35)	0.43	0.57				
Italian (53)	0.56	0.43	0.01			
Indian (39)	0.67	0.32	0.01			
Chinese (23)	0.74	0.26				
Indonesian (34)	0.78	0.22				
African (32)	0.73	0.11		0.16		
Pygmy (60)	0.76	0.16		0.04	0.02	0.02

In order to supply additional data on the genetic variability of Brazilian natives and further contribute to the theory of a predominantly Asiatic origin of the American natives, the aim of the present study was to determine the sequence heterogeneity of the α-globin gene regulatory element in Amerindians of two Brazilian populations and to compare them

with the studied populations, especially with the Asian populations. To our knowledge, no other studies have been performed in South American native populations in general or Brazilian native populations in particular in the investigation of this polymorphism.

MATERIALS AND METHODS

The subjects belong to two tribes located in south of the State of Pará, northern part of Brazil: Parakanã and Xikrin.

The Parakanã Indians belong to the Tupi linguistic branch and are called "White Indians" because of their skin color, although there is no evidence of miscegenation with Caucasians. The first contact with non-Indian was in 1971. This group is polygamous and favors marriages of males to their sister's daughters; as a result, the population is very inbred. The Parakanã Indians have a less aggressive history than the neighboring Kayapo and are scattered throughout three villages (Paranati, Marudjewara and Bom Jardim) (Race and Sanger, 1976; Black et al., 1980).

The Xikrin Indians are a Kayapo subgroup and belong to the Macro-Jê linguistic branch. They first had contact with non-Indians in the early 1950s, and were affected by epidemics of infectious diseases. There is no evidence of miscegenation with Caucasians, mainly due to the fact that these Indians live in reservations especially established for them. The Xikrin live in two villages: Bacajá and Cateté (Vidal, 1972).

The α-MRE haplotypes were determined for 165 DNA samples: 70 samples were collected at random among the Parakanã villages and 95 samples are from the Xikrin of Cateté. Methodology included PCR amplification of the α-MRE (Saiki et al., 1988), using primers described elsewhere (Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press).

Direct sequencing was performed on the PCR-amplified product according to Sanger et al. (1977), using the primer 5'- CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT -3' (Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press) and the "Sequenase PCR Product Sequencing Kit - version 2.0" kit (United States Biochemical - USA).

The distribution of α-MRE haplotypes was tested for Hardy-Weinberg equilibrium and the significance of the fit was calculated using the exact test described by Guo and

Thompson (1992). The Fisher exact test, as implemented on the SAS System for Windows 8.02 program, was used for the comparison between the populations.

RESULTS

Among the analyzed DNA samples, only A and B haplotypes were found. The number of different α-MRE genotypes and the haplotype frequencies of the 2 populations are given in tables 3 and 4, respectively.

The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was estimated for each population and a normal chi square test was used to compare observed and expected numbers of each genotype (Guo and Thompson, 1992). The difference between the observed and expected genotype frequencies was not significant, which implies that the genotypes are in HWE in both tested populations (Table 3).

The haplotype A is the predominant one in Parakanã and Xikrin (70% and 87%, respectively), followed by the B haplotype (30% and 13%, respectively) (Table 4).

The genotype frequencies of the populations studied by Harteveld (1997) and of the Parakanã and Xikrin populations, analyzed in the present study, were tested by means of the Fisher exact test on a Row x Column contingency table implemented in the program SAS System for Windows 8.02 (Guo and Thompson, 1992). The calculated p-values, indicating a significant difference ($p<0.05$) or no difference ($p\geq0.05$), are shown in Table 5.

These comparisons of the genotype frequencies revealed some significant differences. Regarding the Parakanã population, differences were observed in comparison with the Dutch, Italian, Bantu-speaking African and Pygmy populations, while no statistical difference was revealed when that tribe was compared with the East Indian, Chinese and Indonesian populations. Concerning the Xikrin tribe, the comparison showed a high divergence in genotype frequencies with Dutch, Italian, East Indian, Bantu-speaking African, Pygmy and Parakanã samples. A less significant difference was observed between Xikrin and Chinese ($0.001<p<0.05$). No difference was seen between Xikrin and Indonesian.

Table 3. Number of α-MRE genotypes in 2 Brazilian native populations: Parakanã and Xikrin.

(expected Hardy-Weinberg numbers are indicated in parenthesis)

Genotype	Population	
	Parakanã	**Xikrin**
AA	37 (34.3)	73 (72.52)
AB	24 (29.4)	20 (20.96)
BB	9 (6.3)	2 (1.52)
n	70	95
HW-Chi	2.36	0.20
p	0.12	0.65

df = 1; α = 5%

Table 4. Human α-MRE haplotype frequencies and 95% confidence intervals.

(number of studied individuals is indicated in parenthesis)

Populations	Haplotype	
	A	**B**
Parakanã (70)	0.70 [0.624-0.776]	0.30 [0.224-0.376]
Xikrin (95)	0.87 [0.826-0.921]	0.13 [0.079-0.174]

Table 5. Cross-table for p-values, Fisher Exact-test.

Populations	**Dutch**	**Italian**	**Indian**	**Indonesian**	**Chinese**	**African**	**Pygmy**	**Parakanã**	**Xikrin**
Dutch	0	-	+	+++	++	+++	+++	+++	+++
Italian	0.2224	0	-	+	-	+++	+++	+++	+++
Indian	0.0145	0.4268	0	-	-	+++	-	-	+++
Indonesian	0.0002	0.0197	0.3062	0	-	++	-	-	-
Chinese	0.0052	0.1801	0.7428	0.8931	0	++	-	-	+
African	0.0000	0.0000	0.0002	0.0015	0.0062	0	+	+++	+++
Pygmy	0.0000	0.0002	0.0511	0.4440	0.5411	0.0106	0	++	++
Parakanã	0.0010	0.0001	0.6172	0.3021	0.5419	0.0000	0.0072	0	++
Xikrin	0.0000	0.0000	0.0008	0.0849	0.0348	0.0000	0.0034	0.0013	0

$p \geq 0.05$: -

$p < 0.05$: +

$p < 0.01$: ++

$p < 0.001$: +++

DISCUSSION AND CONCLUSION

In 330 chromosomes from Brazilian Indians here studied, A haplotype was the predominant one (80%), followed by B haplotype (20%). In the Indonesian, Chinese and East Indian populations, A haplotype is the predominant one, with frequencies varying from 67% to 78%, while B haplotype was found in frequencies from 22% to 32% (Harteveld, 1997; Harteveld et al., in press).

These findings are in agreement with the hypothesis of an Asiatic origin of the Amerindians, and suggest that South American Indians and Pacific Islands populations may not be genetically independent. This genetic similarity between Brazilian Indians and

people from the Pacific Islands could be the result of ancient common ancestry rather than the consequence of genetic contribution through immigration (Zago et al., 1993), although it is not possible to be sure about that based on the frequency of a single marker.

The significant difference among Parakanã and Xikrin and Dutch, Italian and African populations are in agreement with the results obtained by Harteveld (1997), indicating a gradual shift to a higher A haplotype distribution from west to east, the lowest frequency occurring in Dutch and Italian and the highest in Chinese and Indonesian.

Analyses of polymorphisms for several genetic markers, including blood groups, HLA system, hemoglobin, red cell enzymes and serum protein phenotypes in the Parakanã Indians show that they are more distant from the South American Indian founders and from Europeans than other tribes, including the Xikrin (Black et al., 1980; Salzano et al., 1997; Bassères et al., 1998). However, our results indicate that the α-MRE haplotypes frequencies among the Parakanã Indians were not significantly different from those estimated for the other ethnic groups. It is possible that the frequencies of these haplotypes remained unchanged at the moment of the foundation of the Parakanã Indian population by a restricted pool of ancestral haplotypes, which was brought to the continent by migrants over the Bering Bridge. The genetic drift has not altered these frequencies significantly, probably because there has not been enough time for its action to be effective at this locus. However, there is also the possibility that our samples were not large enough to detect more significant differences.

Regarding the difference observed between Xikrin and 7 out of the 9 compared populations, we think that this fact is due to the relatively higher frequency of the A haplotype in comparison with other populations studied and could be an effect of genetic drift in small isolated population groups. Native populations of South America, settled in the Amazonian region, in the Central Brazilian Plateau and in the Chaco region from Brazil, Paraguay and Argentina, have exhibited higher rates of genetic drift and lower levels of gene flow, with a resulting trend toward genetic differentiation. The tropical forests are barriers to intensive gene flow, allowing isolation and genetic differentiation among Brazilian Indian populations (Tarazona-Santos et al., 2001).

This study represents the first analysis of the α-MRE haplotypes in South American native populations in general or Brazilian native populations in particular and suggests a

similarity between Brazilian Indians and Southeast Asian and Oceanic populations, supporting the thought of a predominant Asian origin of American natives. A higher number of native tribes should be investigated in different regions of the country for more extensive conclusions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms. Denise F. Duarte and Ms. Tania Zacariotto, from the Clinical Pathology Department, for their technical assistance; Ms. Rossana Verónica Mendoza López, from UNICAMP Statistics Institute, for the statistical analyses; and Dr. Monica B. Melo, from Santa Casa Medical School (São Paulo, Brazil), for helping us with the attempts to standardize a screening technique for the polymorphisms. We specially thank Dr. Cornelis L. Harteveld, from the Department of Human and Clinical Genetics of the Leiden University Medical Center (Leiden, The Netherlands), for the significant contribution to this manuscript. Fundings from FAPESP, FAEP – UNICAMP and CNPQ / Brazil.

LITERATURE CITED

Bassères DS, Salles TSI, Costa FF, and Saad STO. 1998. Presence of allele α^{LELY} in an Amazonian Indian population. Am J Hematol 57: 212-214.

Bevilaqua LRM, Mattevi VS, Ewald GM, Salzano FM, Coimbra Jr CEA, Santos RV, and Hutz MH. 1995. Beta-globin gene cluster haplotype distribution in five Brazilian indian tribes. Am J Phys Anthropol 98: 395-401.

Black FL, Salzano FM, Layrisse Z, Franco MHLP, Harris NS, and Weimer TA. 1980. Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in the Parakanã Indians of Brazil. Am J Phys Anthropol 52: 119-132.

Chen LZ, Easteal S, Board PG, and Kirk RL. 1990. Evolution of β-globin haplotypes in human populations. Mol Biol Evol 7 (5): 423-437.

Dickerson RE, and Geiss I. 1983. Hemoglobin. London: Benjamin Cummings Publishers.

Feidel SJ. 2000. The peopling of the New World: Present evidence, new theories, and future directions. J Archaeol Theory 8: 39-103.

Guerreiro JF, Figueiredo MS, Santos SEB, and Zago MA. 1992. β-globin gene cluster haplotypes in Yanomama Indians from the Amazon region of Brazil. Hum. Genet 89: 629-631.

Guerreiro JF, Figueiredo MS, and Zago MA. 1994. β-globin gene cluster haplotypes of Amerindian populations from the Brazilian Amazon region. Hum. Hered 44: 142-149.

Guo SW, and Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48: 361-372.

Harteveld CL. 1997. The Molecular Genetics of α-Thalassemia: Structure and Expression of the α-Globin Gene Cluster. Rijksuniversiteit te Leiden: PhD Thesis.

Harteveld CL, Muglia M, Passarino G, Kielman MF, and Bernini LF. 2002. Genetic Polymorphism of the Major Regulatory Element HS-40, upstream of the Human α-Globin Gene Cluster. Br. J. Haematol. (in press).

Higgs DR, Wainscoat JS, Flint J, Hill AVS, Thein SL, Nicholls RD, and Teal H. 1986. Analysis of the human α-globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. Proc Natl Acad Sci USA 83: 5165-5169.

Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, Sharpe J, Lida J, Pretorius IM, and Ayyub H. 1990. A major positive regulatory region located far upstream of the human α-globin gene locus**.** Genes and Dev 4: 1588-1601.

Jarman AP, Wood WG, Sharpe JA, Gourdon G, Ayyub H, and Higgs DR. 1991. Characterization of the major regulatory element upstream of the human α-globin gene cluster. Mol Cell Biol 11: 4679-4689.

Kielman MF, Smits R, Devi TS, Fodde R, and Bernini LF. 1993. Homology of a 130 kb region enclosing the α-globin gene cluster, the α-locus controlling region, and two non-globin genes in human and mouse. Mamm Genome 4: 314-323.

Kielman MF. 1996. The α-Globin Domain of Man and Mouse: Integration of Erythroid Regulatory Elements with a Conserved Cluster of Upstream Flanking Genes. Rijksuniversiteit Leiden: PhD Thesis.

Laughlin WS, and Wolf SI. 1979. The first Americans: Origins, affinities and adaptations. In Laughlin WS, Harper AB, editors. The First Americans: Origins, Affinities and Adaptations. New York: Gustav Fischer. p 1-11.

Long JC, Chakravarti A, Boehm CD, Antonarakis S, and Kazazian HH. 1990. Phylogeny of Human β-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. Am J Phys Anthropol 81: 113-130.

Mattevi VS, Fiegenbaum M, Salzano FM, Weiss KM, Moore J, Mons MV, Devine DV, and Hutz MH. 2000. Beta-globin gene cluster haplotypes in two North American indigenous populations. Am J Phys Anthropol 112 (3): 311-317.

Race RR, and Sanger R. 1976. Blood group polymorphism. Transfusion and Imunology (monograph). Aug, 2: 1-12.

Saiki RK, Geelfond DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Salzano FM, Franco MHLP, Weimer TA, Callegari-Jacques SM, Mestriner MA, Hutz MH, Flowers NM, Santos RV, and Coimbra JR CEA. 1997. The Brazilian Xavante Indians Revisited: New Protein Genetic Studies. Am J Phys Anthropol 104: 23-34.

Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463

Spencer RF, Jennings JD, Johnson E, King AR, Stern T, Stewart KM, and Wallace WJ. 1977. The Native Americans. New York: Harper and Row Publ.

Tarazona-Santos E, Carvalho-Silva DR, Pettener D, Luiselli D, De Stefano GF, Labarga CM, Rickards O, Tyler-Smith C, Pena SDJ, and Santos FR. 2001. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. Am J Hum Genet 68: 1485-1496.

Trent RJ, Buchanan JG, Webb A, Goundar RPS, Seruvatu LM, and Mickleson KNP. 1988. Globin genes are useful markers to indentify genetic similarities between Fijians and Pacific Islanders from Polynesia and Melanesia. Am J Hum Genet 42: 601-607.

Trent RJ, Fergunson V, Hertzberg MS, Rutherford J, and Mickleson KNP. 1990. β-Globin gene haplotypes in Polynesians are predominantly Southern Chinese in type. Hum Hered 40: 285-289.

Vidal LB. 1972. Put-Karôt, Grupo Indígena do Brasil Central. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo: Tese de doutoramento.

Wainscoat JS, Hill AVS, Boyce AL, Flint J, Hernandez M, Thein SL, Old JM, Lynch JR, Faluse AG, Weatherall DJ, and Clegg JB. 1986. Evolutionary relationships of human populations from analysis of nuclear DNA polymorphisms. Nature 319: 491-493.

Zago MA, and Figueiredo MS. 1993. Molecular genetics and anthropology: Genes, races and diseases. Ciênc. Cult. 45: 249-257.

Zago MA, Santos EJM, Clegg JB, Guerreiro JF, Martinson JJ, Norwich J, and Figueiredo MS. 1995. α-globin gene haplotypes in South American Indians. Human Biology 67 (4): 535-546.

3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O elemento "α-MRE" é geneticamente polimórfico e seus polimorfismos foram muito pouco investigados a nível mundial e, de nosso conhecimento, nunca estudados em populações sul-americanas.

Com o objetivo de determinar os haplótipos do "α-MRE" em indígenas de duas tribos brasileiras (Parakanã e Xikrin), e compará-los às populações preliminarmente estudadas, 165 amostras de DNA foram analisadas, 70 de indivíduos da tribo Parakanã e 95 da tribo Xikrin. Nestas amostras, foram observados apenas os haplótipos A e B.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi testado em cada população indígena estudada e um teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar os valores *observados* e *esperados* para cada genótipo encontrado (Guo e Thompson, 1992).

A diferença entre os valores *observados* e *esperados (o - e)*, isto é, o desvio entre cada freqüência genotípica *observada* e *esperada*, pode ser expressa por *d*. Assim, quando uma população encontra-se em eqüilíbrio, espera-se que *d* seja igual a zero, levando às seguintes hipóteses:

$$H_o: d = 0 \text{ (eqüilíbrio)} \qquad vs. \qquad H_a: d \neq 0 \text{ (deseqüilíbrio)}$$

Estatisticamente:

$$\textit{Qui-quadrado} = \chi^2 = \Sigma \frac{d^2}{e}$$

Onde:

d = diferença entre as freqüências genotípicas *observada* e *esperada*

e = frequência genotípica *esperada*

Na população Parakanã, o valor de χ^2 foi igual a 2,36, sendo o *p* igual a 0,12. Com um nível de significância de 5%, as evidências amostrais são suficientes para não rejeitar a hipótese nula, existindo, portanto, equilíbrio entre os alelos encontrados na população Parakanã.

Já na população Xikrin, o valor de χ^2 foi igual a 0,20, sendo o *p* igual a 0,65. Com

um nível de significância de 5%, as evidências amostrais não rejeitam a hipótese nula, existindo também equilíbrio entre os alelos nesta população.

Pode-se, então, dizer que as duas populações estudadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de $p > 0,05$).

Os valores *observados* e *esperados* para os genótipos do "α-MRE" nas populações Parakanã e Xikrin estão apresentados na tabela 1 (anexo 1), assim como os valores do teste χ^2 para o equilíbrio de HW. Quando os valores *esperados* são menores que 5, considera-se o teste exato de Fisher o mais adequado para comparação entre populações. Dos valores apresentados na tabela 1, somente um foi menor que 5, não sendo então necessária a utilização deste teste para as duas populações indígenas.

Na tabela 2 (anexo 1), são apresentadas as freqüências dos haplótipos do "α-MRE" nas duas populações estudadas, assim como os correspondentes intervalos de confiança. O haplótipo A foi o mais freqüente entre os índios Parakanã e Xikrin (70% e 87%, respectivamente), seguido do haplótipo B (30% e 13%, respectivamente).

Na população Parakanã, verificou-se, com 95% de confiança, que o intervalo (0,624 - 0,776) contém a frequência do haplótipo A e o intervalo (0,224 - 0,376) contém a frequência do haplótipo B. Para a tribo Xikrin, o intervalo (0,826 - 0,921) contém, com 95% de confiança, a frequência do haplótipo A, e o intervalo (0,0791 - 0,1736) contém a frequência do haplótipo B.

Com o objetivo de comparar as freqüências genotípicas entre as populações Parakanã e Xikrin e as populações estudadas por Harteveld (1997), uma tabela cruzada dos valores de *p* do teste χ^2 foi desenvolvida (Tab. 3 - anexo 1). Os valores de *p* indicados com um (*) não foram válidos como testes χ^2, pois os valores *esperados* eram menores que 5. Neste caso, o teste exato de Fisher foi empregado.

O teste exato de Fisher (Guo e Thompson, 1992) é o teste da homogeneidade entre as populações. A hipótese nula, neste caso, é a de que as freqüências genotípicas da população 1 são iguais às freqüências genotípicas da população 2. Os valores de *p* calculados indicam a existência de diferença significativa ($0,001<p<0,05$) ou não ($p\geq0,05$), e estão apresentados na tabela 4 (anexo 1).

Considerando-se o estudo de Harteveld (1997) e Harteveld e col. (2002), uma revisão completa dos cálculos foi feita para possibilitar uma correta comparação entre as populações. Estes cálculos podem ser observados a partir da tabela 5 (anexo 1).

Os dados apresentados permitem observar que as populações indígenas estudadas neste trabalho diferem significativamente de algumas das populações estudadas por Harteveld (1997) e Harteveld e col. (2002). A população Parakanã difere significativamente das populações de holandeses, italianos, africanos e pigmeus africanos, mas não apresenta diferenças significativas das populações de indianos, indonesianos e chineses. A tribo Xikrin apresenta diferenças altamente significativas das populações de holandeses, italianos, indianos, africanos, pigmeus africanos e da tribo Parakanã; difere da população chinesa, mas a diferença não é tão significativa ($0{,}001<p<0{,}05$), e não difere significativamente da população indonesiana. Estes resultados sugerem uma semelhança genética entre as populações indígenas aqui estudadas e as populações do Sudeste da Ásia e ilhas do Pacífico, embora isso não possa ser afirmado baseando-se apenas no estudo de um único marcador genético. Segundo alguns autores, a similaridade genética entre algumas populações nativas americanas e as populações oceânicas pode ser devida a uma ancestralidade asiática comum, mais do que pela contribuição genética através da imigração (Zago e Figueiredo, 1993).

A diferença significativa observada entre os índios Parakanã e Xikrin e as populações holandesa, italiana e africana reforça os resultados apresentados por Harteveld (1997) e Harteveld e col. (2002) de uma distribuição crescente da freqüência do haplótipo A no sentido oeste para leste no globo terrestre, sendo a menor freqüência observada entre os holandeses e italianos, e a maior entre os chineses e indonesianos (Harteveld, 1997; Harteveld e col, 2002).

Análises dos polirmorfismos para muitos marcadores genéticos, incluindo grupos sanguíneos, sistema HLA, hemoglobina, enzimas eritrocitárias e proteínas séricas, entre os índios Parakanã revelam que estes indígenas são mais distantes dos ancestrais dos nativos sul-americanos e dos europeus que outras tribos indígenas, incluindo a Xikrin (Black e col., 1980; Salzano e col., 1997; Bassères e col., 1998). Nossos resultados, porém, indicam que as freqüências dos haplótipos do "α-MRE" entre os índios Parakanã não diferem significativamente daquelas estimadas para outros grupos étnicos. É possível que as

freqüências destes haplótipos tenham permanecido inalteradas desde a fundação da população Parakanã por um restrito conjunto de haplótipos ancestrais, que foram trazidos ao continente americano por migrantes que atravessaram o Estreito de Bering. A deriva genética não tem alterado estas freqüências significativamente, provavelmente por não ter havido tempo suficiente para que sua ação seja efetiva neste lócus. Existe, porém, a possibilidade de que nossa amostragem não seja suficientemente grande para detectar diferenças mais significativas.

Em relação à diferença observada entre a população indígena Xikrin e 7 das 9 populações comparadas neste trabalho, nós achamos que este fato deve-se à freqüência relativamente elevada do haplótipo A (87%) entre os índios Xikrin, quando comparados às demais populações estudadas e pode ser um efeito de deriva genética em grupos populacionais pequenos e isolados. Populações nativas da América do Sul, assentadas na região Amazônica, no Planalto Central Brasileiro e nas regiões de chaco do Brasil, Paraguai e Argentina, têm exibido taxas elevadas de deriva genética e níveis baixos de fluxo gênico, resultando em diferenciação genética. As florestas tropicais funcionam como barreiras para o fluxo gênico, levando ao isolamento e à diferenciação genética entre as populações indígenas brasileiras (Tarazona-Santos e col., 2001).

Assim, em 330 cromossomos dos indígenas aqui analisados, observou-se o predomínio do haplótipo A (80%), seguido do haplótipo B (20%), sendo estes os haplótipos mais freqüentes nas populações do continente asiático. Nas populações indonesiana, chinesa e indiana, o haplótipo A é o predominante (67% a 78%), seguido do haplótipo B (22% a 32%) (Harteveld, 1997; Harteveld e col, 2002).

As similaridades dos haplótipos do "α-MRE" entre indígenas brasileiros e populações do Sudeste da Ásia e ilhas do Pacífico sugerem uma possível afinidade genética entre estas populações, reforçando as teorias de uma predominante origem asiática dos nativos americanos.

Este é o primeiro estudo do elemento regulatório dos genes α em populações nativas sul-americanas e, apesar de os resultados estarem em acordo com achados prévios, é importante ressaltar que um número muito pequeno de populações, com poucos indivíduos cada uma, foi até o momento investigado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bassères, D.S., Salles, T.S.I., Costa, F.F. and Saad, S.T.O. (1998). Presence of allele α^{LELY} in an Amazonian Indian population. **Am. J. Hematol. 57:** 212-214.

Bevilaqua, L.R.M., Mattevi, V.S., Ewald, G.M., Salzano, F.M., Coimbra Jr, C.E.A., Santos, R.V. and Hutz, M.H. (1995). Beta-globin gene cluster haplotype distribution in five Brazilian indian tribes. **Am. J. Phys. Anthropol. 98:** 395-401.

Black, F.L., Salzano, F.M., Layrisse, Z., Franco, M.H.L.P., Harris, N.S. and Weimer, T.A. (1980). Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in the Parakanã Indians of Brazil. **Am. J. Phys. Anthropol. 52:** 119-132.

Bonatto, S.L., Redd, A.J., Salzano, F.M. and Stoneking, M. (1996). Lack of ancient Polynesian-Amerindian contact. **Am. J. Hum. Genet. 59:** 253-256.

Bonatto, S.L. and Salzano, F.M. (1997a). 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.

Bonatto, S.L. and Salzano, F.M. (1997b). 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.

Bunn, H.F. and Forget, B.G. (1986). **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.** Philadelphia, W. B. Saunders Company.

Cavalli-Sforza, L.L., Piazza, A., Menozzi, P. and Mountain, J.L. (1988). Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:** 6002-6006**.**

Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P. and Piazza, A. (1994). **The Hystory and Geography of Human Genes.** Princeton, Princeton University Press.

Chen, L.Z., Easteal, S., Board, P.G. and Kirk, R.L. (1990). Evolution of β-globin haplotypes in human populations. **Mol. Biol. Evol. 7 (5):** 423-437.

Craddock, C.F., Vyas, P., Sharpe, J.A., Ayyub, H., Wood, W.G. and Higgs, D.R. (1995). Contrasting effects of α and β globin regulatory elements on chromatin structure may be related to their different chromosomal environments. **EMBO J. 14:** 1718-1726.

Flint, J., Harding, R.M., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. (1993a). The population genetics of the haemoglobinopathies. **Baillières Clin. Haematol. 6:** 215-262.

Flint, J., Harding, R.M., Clegg, J.B. and Boyce, A.J. (1993b). Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from the other processes by molecular analysis of globin gene variants. **Hum. Genet. 91:** 91-117.

Fodde, R., Losekoot, M., van den Broek, M.H., Oldenburg, M., Rashida, N., Wijnen, J.T., Giordano, P.C., Nayudu, N.V., Khan, P.M. and Bernini, L.F. (1988). Prevalence and molecular heterogeneity of alfa (+) thalassemia in two tribal populations from Andhra Pradesh, India. **Hum. Genet. 80:** 157-160.

Fodde, R., Harteveld, C.L., Losekoot, M., Giordano, P.C., Khan, P.M., Nayudu, N.V. and Bernini, L.F. (1991). Multiple recombination events are responsible for the heterogeneity of alfa (+) thalassemia haplotypes among the forest tribes of Andhra Pradesh, India. **Ann. Hum. Genet. 55:** 43-50.

Forrester, W.C., Takegawa, S., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. and Groudine, M. (1987). Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids. **Nucleic Acids Res. 15:** 10159-10177.

Fritsch, E.F., Lawn, R.M. and Maniats, T. (1980). Molecular cloning and characterization of the human β-like globin gene cluster. **Cell 19:** 959-972.

Futuyma, D.J. (1992). **Biologia Evolutiva.** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

Gourdon, G., Sharpe, J.A., Wells, D., Wood, W.G. and Higgs, D.R. (1994). Analysis of a 70 kb segment of DNA containing the human ζ and α-globin genes linked to their regulatory element (HS-40) in transgenic mice. **Nucleic Acids Res. 22:** 4139-4147.

Grosveld, F., Blom van Assendelft, G., Greaves, D.R. and Kollias, G. (1987). Position-independent, high-level expression of the human β-globin gene in transgenic mice. **Cell 51:** 975-985.

Guerreiro, J.F., Figueiredo, M.S., Santos, S.E.B. and Zago, M. A. (1992). β-globin gene cluster haplotypes in Yanomama Indians from the Amazon region of Brazil. **Hum. Genet. 89:** 629-631.

Guerreiro, J.F., Figueiredo, M.S. and Zago, M.A. (1994). β-globin gene cluster haplotypes of Amerindian populations from the Brazilian Amazon region. **Hum. Hered. 44:** 142-149.

Guo, S. W. and Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics 48:** 361-372.

Harteveld, C.L. (1997). **The Molecular Genetics of α-Thalassemia: Structure and Expression of the α-Globin Gene Cluster.** Rijksuniversiteit te Leiden. PhD Thesis.

Harteveld, C.L., Muglia, M., Passarino, G., Kielman, M.F. and Bernini, L.F. (2002). Genetic Polymorphism of the Major Regulatory Element HS-40, upstream of the Human α-Globin Gene Cluster. **Br. J. Haematol.** (in press).

Hertzberg, M.S., Mickleson, K.N. and Trent, R.J. (1988). α-globin gene haplotypes in Polynesians: their relationships to population groups and gene rearrangements. **Am. J. Hum. Genet. 43:** 971-977.

Higgs, D.R., Wainscoat, J.S., Flint, J., Hill, A.V.S., Thein, S.L., Nicholls, R.D. and Teal, H. (1986). Analysis of the human α-globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:** 5165-5169.

Higgs, D.R., Wood, W.G., Jarman, A.P., Sharpe, J., Lida, J., Pretorius, I.M. and Ayyub, H. (1990). A major positive regulatory region located far upstream of the human α-globin gene locus**. Genes and Dev. 4:** 1588-1601.

Higgs, D.R. (1993). α-Thalassemia. In: Higgs, D.R. and Weatherall, D.J. (eds). **Baillières Clin. Haematol. 6 (1).** London, Baillière Tindall, pp 117-150.

Hill, A.V., Nicholls R.D., Thein, S.L. and Higgs D.R. (1985). Recombination within the human embryonic ζ-globin locus: a common ζ- ζ chromosome produced by gene conversion of the ψζ- gene. **Cell 42:** 809-819.

Hoffecker, J.F., Powers, W.R. and Goebel, T. (1993). The colonization of Beringia and the peopling of the New World. **Science 259:** 46-53.

Ikuta, T. and Kan, Y. W. (1991). In vivo protein-DNA interactions at the β-globin gene locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:** 10188-10192.

Jarman, A.P., Wood, W.G., Sharpe, J.A., Gourdon, G., Ayyub, H. and Higgs, D.R. (1991). Characterization of the major regulatory element upstream of the human α-globin gene cluster. **Mol. Cell. Biol. 11:** 4679-4689.

Kazazian Jr, H.H., Antonarakis, S.E., Cheng, T., Boehm, C.D. and Waber, P.G. (1983). Use of Haplotype Analysis in the Beta Globin Gene Cluster to discover Beta Thalassemia Mutations. **Prog. Clin. Biol. Res. 134:** 91-98.

Kielman, M.F., Smits, R. and Bernini, L.F. (1994). Localization and characterization of the mouse α-globin locus control region. **Genomics 21:** 431-433.

Kielman, M.F. (1996). **The α-Globin Domain of Man and Mouse: Integration of Erythroid Regulatory Elements with a Conserved Cluster of Upstream flanking Genes.** Rijksuniversiteit te Leiden. PhD Thesis.

Long, J.C., Chakravarti, A., Boehm, C.D., Antonarakis, S. and Kazazian, H.H. (1990). Phylogeny of Human β-globin haplotypes and its implications for recent human evolution. **Am. J. Phys. Anthropol. 81:** 113-130.

Orkin, S.H., Antonarakis, S.E. and Kazazian Jr, H.H. (1983). Polymorphism and molecular pathology of the human beta globin gene. **Prog. Hematol. 13:** 49-73.

Philipsen, S., Talbot, D., Fraser, P. and Grosveld, F. (1990). The β-globin dominant control region: hypersensitive site 2. **EMBO J. 9:** 2159-2167.

Pivetta, M. (2002). A descoberta da América – Bastou uma viagem. **Pesquisa FAPESP 77:** 34-38.

Prous, A. (1999). Povoamento das Américas: Um debate sem fim. **Ciência Hoje 25 (149):** 40-45.

Pruzina, S., Hanscombe, O., Whyatt, D., Grosveld, F. and Philipsen, S. (1991). Hypersensitive site 4 of the human β-globin locus control region. **Nucleic Acids Res. 19:** 1413-1419.

Race, R.R. and Sanger, R. (1976). Blood group polymorphism. **Transfusion and Imunology (monograph). Aug, 2:** 1-12.

Ramsay, M. and Jenkins, T. (1987). Globin gene associated restriction-fragment-length polymorphims in southern African peoples. **Am. J. Hum. Genet. 41:** 1132-1144.

Reddy, P.M. and Shen, C.K. (1991). Protein-DNA interactions in vivo of an erythroid-specific, human β-globin locus enhancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:** 8676-8680.

Salzano, F.M., Callegari-Jacques, S.M., Weimer, T.A., Franco, M.H.L.P., Hutz, M.H. and Petzl-Erler, M.L. (1997). Electrophoretic Protein Polymorphisms in Kaingang and Guarani Indians of the Southern Brazil. **Am. J. Human Biol. 9:** 505-512.

Salzano, F.M., Franco, M.H.L.P., Weimer, T.A., Callegari-Jacques, S.M., Mestriner, M.A., Hutz, M.H., Flowers, N.M., Santos, R.V. and Coimbra JR, C.E.A. (1997). The Brazilian Xavante Indians Revisited: New Protein Genetic Studies. **Am. J. Phys. Anthropol. 104:** 23-34.

Salzano, F.M. (1998). Variabilidade genética em populações Sul Americanas e seu significado evolutivo. **Medicina, Revista do Conselho Federal de Medicina Julho:** 15.

Sharpe, J.A., Chan Thomas, P.S., Lida, J., Ayyub, H., Wood, W.G. and Higgs, D.R. (1992). Analysis of the human α-globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. **EMBO J. 11:** 4565-4572.

Sharpe, J.A., Wells, D.J., Whitelaw, E., Vyas, P., Higgs, D.R. and Wood, W.G. (1993). Analysis of the human α-globin gene cluster in transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:** 11262-11266.

Shields, G.F., Hecker, K., Voevoda, M.I. and Reed, J.K. (1992). Absence of the Asian specific region V mitochondrial marker in native Beringians. **Am. J. Hum. Genet. 50:** 758-765.

Shields, G.F., Schmiechen, A.M., Frazier, B.L., Redd, A., Voevoda, M.I., Reed, J.K. and Ward, R.H. (1993). mtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and Northern North American populations. **Am. J. Hum. Genet. 53:** 549-562.

Silva Jr, W.A., Bonatto, S.L., Holanda, A.J., Ribeiro-dos-Santos, A.K., Paixão, B.M., Goldman, G.H., Abe-Sandes, K., Rodriguez-Delfin, L., Barbosa, M., Paçó-Larson, M.L., Petzl-Erler, M.L., Valente, V., Santos, S.E.B. and Zago, M.A. (2002). Mitochondrial genome diversity of native Americans supports a single-early entry of founder populations into America. **Am. J. Hum. Genet. 71:** 187-192.

Stammatoyannopoulos, G., Nienhuis, A. W., Majerus, P. W. and Varnus, H. (1994). **The molecular bases of blood diseases.** Philadelphia, Sounders Company.

Strauss, E. C., Andrews, N.C., Higgs, D.R. and Orkin, S.H. (1992). In vivo footprinting of the human α-globin locus upstream regulatory element by guanine and adenine ligation-mediated polymerase chain reaction. **Mol. Cell. Biol. 12:** 2135-2142.

Strauss, E.C. and Orkin, S.H. (1992). In vivo protein-DNA interactions at hypersensitive site 3 of the human β-globin locus control region. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:** 5809-5813.

Talbot, D., Philipsen, S., Fraser, P. and Grosveld, F. (1990). Detailed analysis of the site 3 region of the human β-globin dominant control region. **EMBO J. 9:** 2169-2177.

Talbot, D. and Grosveld, F. (1991). The 5' HS-2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. **EMBO J. 10:** 1391-1398.

Tarazona-Santos, E., Carvalho-Silva, D.R., Pettener, D., Luiselli, D., De Stefano, G.F., Labarga, C.M., Rickards, O., Tyler-Smith, C., Pena, S.D.J. and Santos, F.R. (2001). Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. **Am. J. Hum. Genet. 68:** 1485-1496.

Tjian, R. (1995). Molecular machines that control genes. **Scientific American February:** 38-45.

Torroni, A., Schurr, T.G., Cabell, M.F., Brown, M.D., Neel, J.V., Larsen, M., Smith, D.G., Vullo, C.M. and Wallace, D.C. (1993a). Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. **Am. J. Hum. Genet. 53:** 563-590.

Torroni, A., Sukernik, R.I., Schurr, T.G., Starikovskaya, Y.B., Cabell, M.F., Crawford, M.H., Comuzzie, A.G. and Wallace, D.C. (1993b). mtDNA variation of Aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. **Am. J. Hum. Genet. 53:** 591-608.

Trent, R.J., Buchanan, J.G., Webb, A., Goundar, R.P.S., Seruvatu, L.M. and Mickleson, K.N.P. (1988). Globin genes are useful markers to indentify genetic similarities between Fijians and Pacific Islanders from Polynesia and Melanesia. **Am. J. Hum. Genet. 42:** 601-607.

Trent, R.J., Fergunson, V., Hertzberg, M.S., Rutherford, J. and Mickleson, K.N.P. (1990). β-Globin gene haplotypes in Polynesians are predominantly Southern Chinese in type. **Hum. Hered. 40:** 285-289.

Vidal, L.B. (1972). **"Put-Karôt", grupo indígena do Brasil Central".** Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo. Tese de doutoramento.

Vyas, P., Vickers, M.A., Simmons, D.L., Ayyub, H., Craddock, C.F. and Higgs, D.R. (1992). Cis-acting sequences regulating expression of the human α-globin cluster lie within constitutively open chromatin. **Cell 69:** 781-793.

Wainscoat, J.S., Hill, A.V.S., Boyce, A.L., Flint, J., Hernandez, M., Thein, S.L., Old, J.M., Lynch, J.R., Faluse, A.G., Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (1986). Evolutionary relationships of human populations from analysis of nuclear DNA polymorphisms. **Nature 319:** 491-493.

Wallace, D.C., Garrison, K. and Knowler, W.C. (1985). Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs. **Am. J. Phys. Anthropol. 68:** 149-155.

Zago, M.A. and Figueiredo, M.S. (1993). Molecular genetics and anthropology: Genes, races and diseases. **Ciênc. Cult. 45:** 249-257.

Zago, M.A., Santos, E.J.M., Clegg, J.B., Guerreiro, J.F., Martinson, J.J., Norwich, J. and Figueiredo, M.S. (1995). α-globin gene haplotypes in South American Indians. **Human Biology 67 (4):** 535-546.

Zhang, Q., Reddy, P.M., Yu, C. Y., Bastiani, C., Higgs, D., Stamatoyannopoulos, G., Papayannopoulou, T. and Shen, C.K. (1993). Transcriptional activation of human ζ_2 globin promoter by the α globin regulatory element (HS-40): functional role of specific nuclear factor-DNA complexes. **Mol. Cell. Biol. 13:** 2298-2308.

ANEXO 1

Relatório estatístico sobre os haplótipos do "α-MRE" nas populações indígenas Parakanã e Xikrin.

Rossana Verônica Mendoza López

Instituto de Estatística - UNICAMP

Tabela 1. Número de genótipos do "α-MRE" em duas populações indígenas brasileiras: Parakanã e Xikrin.

(valores esperados de Hardy-Weinberg entre parênteses)

Genótipo	**População**	
	Parakanã	**Xikrin**
AA	37 (34,3)	73 (72,52)
AB	24 (29,4)	20 (20,96)
BB	9 (6,3)	2 (1,52)
n	70	95
HW-χ^2	2,36	0,20
p	0,12	0,65

g.l. = 1; $\alpha = 5\%$

Tabela 2. Frequências humanas dos haplótipos do "α-MRE" e intervalos de confiança de 95%.

(número de indivíduos estudados entre parênteses)

População	**Haplótipo**	
	A	**B**
Parakanã (70)	0,70 [0,624-0,776]	0,30 [0,224-0,376]
Xikrin (95)	0,87 [0,826-0,921]	0,13 [0,079-0,174]

Tabela 3. Tabela cruzada dos valores de *p* do teste χ^2

Populações	Holandeses	Italianos	Indianos	Indonesianos	Chineses	Africanos	Pigmeus	Parakanã	Xikrin
Holandeses	0	-	+	+++	++	+++	+++	++	+++
Italianos	0,2509*	0	-	+	-	+++	++	+++	+++
Indianos	0,0252*	0,4205*	0	-	-	++	-	-	++
Indonesianos	0,0002	0,0372*	0,3094*	0	-	++	-	-	-
Chineses	0,0050	0,2109*	0,6016	0,8698*	0	+	-	-	-
Africanos	<0,0001*	<0,0001*	0,0016	0,0074*	0,0224*	0	+	+++	+++
Pigmeus	<0,0001*	0,0014*	0,0746*	0,3408*	0,4297*	0,0157*	0	+	+
Parakanã	0,0014	0,0004*	0,5439*	0,2740	0,4567	<0,0001*	0,0169*	0	++
Xikrin	<0,0001*	<0,0001*	0,0014	0,1292*	0,0610*	<0,0001*	0,0119*	0,0014	0

$p \geq 0,05$: -

$p < 0,05$: +

$p < 0,01$: ++

$p < 0,001$: +++

Tabela 4. Tabela cruzada dos valores de *p* do teste exato de Fisher.

Populações	**Holandeses**	**Italianos**	**Indianos**	**Indonesianos**	**Chineses**	**Africanos**	**Pigmeus**	**Parakanã**	**Xikrin**
Holandeses	0	-	+	+++	++	+++	+++	+++	+++
Italianos	0,2224	0	-	+	-	+++	+++	+++	+++
Indianos	0,0145	0,4268	0	-	-	+++	-	-	+++
Indonesianos	0,0002	0,0197	0,3062	0	-	++	-	-	-
Chineses	0,0052	0,1801	0,7428	0,8931	0	++	-	-	+
Africanos	0,0000	0,0000	0,0002	0,0015	0,0062	0	+	+++	+++
Pigmeus	0,0000	0,0002	0,0511	0,4440	0,5411	0,0106	0	++	++
Parakanã	0,0010	0,0001	0,6172	0,3021	0,5419	0,0000	0,0072	0	++
Xikrin	0,0000	0,0000	0,0008	0,0849	0,0348	0,0000	0,0034	0,0013	0

$p \geq 0{,}05$: -

$p < 0{,}05$: +

$p < 0{,}01$: ++

$p < 0{,}001$: +++

Tabela 5. Comparação entre as populações de Holandeses e Italianos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genotipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	BC	Total
holandes	6	18	11	0	35
	6.82	20.45	12.50	0.00	39.77
	17.14	51.43	31.43	0.00	
	25.00	43.90	50.00	0.00	
italiano	18	23	11	1	53
	20.45	26.14	12.50	1.14	60.23
	33.96	43.40	20.75	1.89	
	75.00	56.10	50.00	100.00	
Total	24	41	22	1	88
	27.27	46.59	25.00	1.14	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	4.0995	0.2509
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	4.5686	0.2063
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	2.0636	0.1509
Phi Coefficient		0.2158	
Contingency Coefficient		0.2110	
Cramer's V		0.2158	

ADVERTENCIA: 25% das celas tem esperado menor que 5. O teste de Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade(P)	0.0046
Pr <= P (p-valor)	0.2224

Tamanho da amostra = 88

Tabela 6. Comparação entre as populações de Holandeses e Indianos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genotipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AC	BB	Total
holandes	6	18	0	11	35
	8.11	24.32	0.00	14.86	47.30
	17.14	51.43	0.00	31.43	
	25.00	54.55	0.00	68.75	
indiano	18	15	1	5	39
	24.32	20.27	1.35	6.76	52.70
	46.15	38.46	2.56	12.82	
	75.00	45.45	100.00	31.25	
Total	24	33	1	16	74
	32.43	44.59	1.35	21.62	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	9.3338	0.0252
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	10.0280	0.0183
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	6.2084	0.0127
Phi Coefficient		0.3552	
Contingency Coefficient		0.3347	
Cramer's V		0.3552	

ADVERTENCIA: 25% das celas tem esperado menor que 5. O teste de Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade(P)	3.885E-04
Pr <= P (p-valor)	0.0145

Tamanho da amostra = 74

Tabela 7. Comparação entre as populações de Holandeses e Indonesios

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
holandes	6 8.70 17.14 23.08	18 26.09 51.43 58.06	11 15.94 31.43 91.67	35 50.72
indonesi	20 28.99 58.82 76.92	13 18.84 38.24 41.94	1 1.45 2.94 8.33	34 49.28
Total	26 37.68	31 44.93	12 17.39	69 100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	16.6673	0.0002
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	18.5000	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	16.4227	<.0001
Phi Coefficient		0.4915	
Contingency Coefficient		0.4411	
Cramer's V		0.4915	

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade(P)	1.016E-05
Pr <= P (p-valor)	1.669E-04

Tamanho da amostra = 69

Tabela 8. Comparação entre as populações de Holandeses e Chineses

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
chines	12 20.69 52.17 66.67	10 17.24 43.48 35.71	1 1.72 4.35 8.33	23 39.66
holandes	6 10.34 17.14 33.33	18 31.03 51.43 64.29	11 18.97 31.43 91.67	35 60.34
Total	18 31.03	28 48.28	12 20.69	58 100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	10.5896	0.0050
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	11.6073	0.0030
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	10.3884	0.0013
Phi Coefficient		0.4273	
Contingency Coefficient		0.3929	
Cramer's V		0.4273	

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade(P)	3.322E-04
Pr <= P (p-valor)	0.0052

Tamanho da amostra = 58

Tabela 9. Comparação entre as populações de Holandeses e Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo					
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	BB	BD	Total
africano	16	6	9	0	1	32
	23.88	8.96	13.43	0.00	1.49	47.76
	50.00	18.75	28.13	0.00	3.13	
	72.73	25.00	100.00	0.00	100.00	
holandes	6	18	0	11	0	35
	8.96	26.87	0.00	16.42	0.00	52.24
	17.14	51.43	0.00	31.43	0.00	
	27.27	75.00	0.00	100.00	0.00	
Total	22	24	9	11	1	67
	32.84	35.82	13.43	16.42	1.49	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	4	31.4742	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Quad	4	39.9733	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	4.5680	0.0326
Phi Coefficient		0.6854	
Contingency Coefficient		0.5653	
Cramer's V		0.6854	

ADVERTENCIA: 40% das celas têm esperado menor que 5. O teste de Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade(P)	7.487E-10
Pr <= P (p-valor)	1.067E-07

Tamanho da amostra = 67

Tabela 10. Comparação entre as populações de Holandeses e Pigmeos Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	Genótipo AA	AB	AD	AE	AF	BB	BD	Total
holandes	6	18	0	0	0	11	0	35
	6.32	18.95	0.00	0.00	0.00	11.58	0.00	36.84
	17.14	51.43	0.00	0.00	0.00	31.43	0.00	
	14.63	56.25	0.00	0.00	0.00	84.62	0.00	
pigmeo	35	14	2	2	4	2	1	60
	36.84	14.74	2.11	2.11	4.21	2.11	1.05	63.16
	58.33	23.33	3.33	3.33	6.67	3.33	1.67	
	85.37	43.75	100.00	100.00	100.00	15.38	100.00	
Total	41	32	2	2	4	13	1	95
	43.16	33.68	2.11	2.11	4.21	13.68	1.05	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	6	31.8712	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Quad	6	35.8810	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	8.9640	0.0028
Phi Coefficient		0.5792	
Contingency Coefficient		0.5012	
Cramer's V		0.5792	

ADVERTENCIA: 64% das celas têm esperado menor do que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	1.376E-09
Pr <= P (p-valor)	1.552E-06

Tamanho da amostra = 95

Tabela 11. Comparação entre as populações de Holandeses e Parakanã

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
holandes	6	18	11	35
	5.71	17.14	10.48	33.33
	17.14	51.43	31.43	
	13.95	42.86	55.00	
parakana	37	24	9	70
	35.24	22.86	8.57	66.67
	52.86	34.29	12.86	
	86.05	57.14	45.00	
Total	43	42	20	105
	40.95	40.00	19.05	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	13.2067	0.0014
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	14.0240	0.0009
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	12.3378	0.0004
Phi Coefficient		0.3547	
Contingency Coefficient		0.3343	
Cramer's V		0.3547	

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	4.145E-05
Pr <= P (p-valor)	9.965E-04

Tamanho de amostra = 105

Tabela 12. Comparação entre as populações de Holandeses e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
holandes	6	18	11	35
	4.62	13.85	8.46	26.92
	17.14	51.43	31.43	
	7.59	47.37	84.62	
xikrin	73	20	2	95
	56.15	15.38	1.54	73.08
	76.84	21.05	2.11	
	92.41	52.63	15.38	
Total	79	38	13	130
	60.77	29.23	10.00	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	45.0665	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	45.2471	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	44.7033	<.0001
Phi Coefficient		0.5888	
Contingency Coefficient		0.5074	
Cramer's V		0.5888	

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	1.202E-11
Pr <= P (p-valor)	1.033E-10

Tamanho da amostra = 130

Tabela 13. Comparação entre as populações de Italianos e Indianos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo					
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AC	BB	BC	Total
indiano	18	15	1	5	0	39
	19.57	16.30	1.09	5.43	0.00	42.39
	46.15	38.46	2.56	12.82	0.00	
	50.00	39.47	100.00	31.25	0.00	
italiano	18	23	0	11	1	53
	19.57	25.00	0.00	11.96	1.09	57.61
	33.96	43.40	0.00	20.75	1.89	
	50.00	60.53	0.00	68.75	100.00	
Total	36	38	1	16	1	92
	39.13	41.30	1.09	17.39	1.09	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	4	3.8939	0.4205
Likelihood Ratio Chi-Quad	4	4.6367	0.3266
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	1.8042	0.1792
Phi Coefficient		0.2057	
Contingency Coefficient		0.2015	
Cramer's V		0.2057	

ADVERTENCIA: 40% das celas têm esperado menor que 5. O teste de Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0043
Pr <= P (p-valor)	0.4268

Tamanho da amostra = 92

Tabela 14. Comparação entre as populações de Italianos e Indonesios

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	BC	Total
indonesi	20	13	1	0	34
	22.99	14.94	1.15	0.00	39.08
	58.82	38.24	2.94	0.00	
	52.63	36.11	8.33	0.00	
italiano	18	23	11	1	53
	20.69	26.44	12.64	1.15	60.92
	33.96	43.40	20.75	1.89	
	47.37	63.89	91.67	100.00	
Total	38	36	12	1	87
	43.68	41.38	13.79	1.15	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	8.4710	0.0372
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	9.8747	0.0197
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	8.1112	0.0044
Phi Coefficient		0.3120	
Contingency Coefficient		0.2979	
Cramer's V		0.3120	

ADVERTENCIA: 38% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	5.575E-04
Pr <= P (p-valor)	0.0197

Tamanho da amostra = 87

Tabela 15. Comparação entre as populações de Italianos e Chineses

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	BC	Total
chines	12	10	1	0	23
	15.79	13.16	1.32	0.00	30.26
	52.17	43.48	4.35	0.00	
	40.00	30.30	8.33	0.00	
italiano	18	23	11	1	53
	23.68	30.26	14.47	1.32	69.74
	33.96	43.40	20.75	1.89	
	60.00	69.70	91.67	100.00	
Total	30	33	12	1	76
	39.47	43.42	15.79	1.32	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	4.5161	0.2109
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	5.4380	0.1424
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	4.1591	0.0414
Phi Coefficient		0.2438	
Contingency Coefficient		0.2368	
Cramer's V		0.2438	

ADVERTENCIA: 38% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0056
Pr <= P (p-valor)	0.1801

Tamanho da amostra = 76

Tabela 16. Comparação entre as populações de Italianos e Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	Genótipo AA	AB	AD	BB	BC	BD	Total
africano	16	6	9	0	0	1	32
	18.82	7.06	10.59	0.00	0.00	1.18	37.65
	50.00	18.75	28.13	0.00	0.00	3.13	
	47.06	20.69	100.00	0.00	0.00	100.00	
italiano	18	23	0	11	1	0	53
	21.18	27.06	0.00	12.94	1.18	0.00	62.35
	33.96	43.40	0.00	20.75	1.89	0.00	
	52.94	79.31	0.00	100.00	100.00	0.00	
Total	34	29	9	11	1	1	85
	40.00	34.12	10.59	12.94	1.18	1.18	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	5	28.6433	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Quad	5	36.0071	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.7644	0.3819
Phi Coefficient		0.5805	
Contingency Coefficient		0.5020	
Cramer's V		0.5805	

ADVERTENCIA: 50% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	4.180E-09
Pr <= P (p-valor)	1.652E-06

Tamanho da amostra = 85

Tabela 17. Comparação entre as populações de Italianos e Pigmeos Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo								
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	AE	AF	BB	BC	BD	Total
italiano	18	23	0	0	0	11	1	0	53
	15.93	20.35	0.00	0.00	0.00	9.73	0.88	0.00	46.90
	33.96	43.40	0.00	0.00	0.00	20.75	1.89	0.00	
	33.96	62.16	0.00	0.00	0.00	84.62	100.00	0.00	
pigmeo	35	14	2	2	4	2	0	1	60
	30.97	12.39	1.77	1.77	3.54	1.77	0.00	0.88	53.10
	58.33	23.33	3.33	3.33	6.67	3.33	0.00	1.67	
	66.04	37.84	100.00	100.00	100.00	15.38	0.00	100.00	
Total	53	37	2	2	4	13	1	1	13
	46.90	32.74	1.77	1.77	3.54	11.50	0.88	0.88	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	7	23.5295	0.0014
Likelihood Ratio Chi-Quad	7	28.0502	0.0002
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	3.5189	0.0607
Phi Coefficient		0.4563	
Contingency Coefficient		0.4151	
Cramer's V		0.4563	

ADVERTENCIA: 63% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	4.907E-08
Pr <= P (p-valor)	1.813E-04

Tamanho da amostra = 113

Tabela 18. Comparação entre as populações de Italianos e Parakanã

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	BC	Total
italiano	18	23	11	1	53
	14.63	18.70	8.94	0.81	43.09
	33.96	43.40	20.75	1.89	
	32.73	41.07	100.00	100.00	
parakana	37	33	0	0	70
	30.08	26.83	0.00	0.00	56.91
	52.86	47.14	0.00	0.00	
	67.27	58.93	0.00	0.00	
Total	55	56	11	1	123
	44.72	45.53	8.94	0.81	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	18.3503	0.0004
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	22.7746	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	12.4664	0.0004
Phi Coefficient		0.3863	
Contingency Coefficient		0.3603	
Cramer's V		0.3863	

ADVERTENCIA: 38% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	1.924E-06
Pr <= P (p-valor)	7.016E-05

Tamanho da amostra = 123

Tabela 19. Comparação entre as populações de Italianos e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	BC	Total
italiano	18	23	11	1	53
	12.16	15.54	7.43	0.68	35.81
	33.96	43.40	20.75	1.89	
	19.78	51.11	100.00	100.00	
xikrin	73	22	0	0	95
	49.32	14.86	0.00	0.00	64.19
	76.84	23.16	0.00	0.00	
	80.22	48.89	0.00	0.00	
Total	91	45	11	1	148
	61.49	30.41	7.43	0.68	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	36.2657	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	40.2103	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	35.0178	<.0001
Phi Coefficient		0.4950	
Contingency Coefficient		0.4436	
Cramer's V		0.4950	

ADVERTENCIA: 38% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	3.360E-10
Pr <= P (p-valor)	6.124E-09

Tamanho da amostra = 148

Tabela 20. Comparação entre as populações de Indianos e Indonesios

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AC	BB	Total
indiano	18	15	1	5	39
	24.66	20.55	1.37	6.85	53.42
	46.15	38.46	2.56	12.82	
	47.37	53.57	100.00	83.33	
indonesi	20	13	0	1	34
	27.40	17.81	0.00	1.37	46.58
	58.82	38.24	0.00	2.94	
	52.63	46.43	0.00	16.67	
Total	38	28	1	6	73
	52.05	38.36	1.37	8.22	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	3.5892	0.3094
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	4.2029	0.2404
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	2.9417	0.0863
Phi Coefficient		0.2217	
Contingency Coefficient		0.2165	
Cramer's V		0.2217	

ADVERTENCIA: 50% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0102
Pr <= P (p-valor)	0.3062

Tamanho da amostra = 73

Tabela 21. Comparação entre as populações de Indianos e Chinés

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AC	BB	Total
chines	12	10	0	1	23
	19.35	16.13	0.00	1.61	37.10
	52.17	43.48	0.00	4.35	
	40.00	40.00	0.00	16.67	
indiano	18	15	1	5	39
	29.03	24.19	1.61	8.06	62.90
	46.15	38.46	2.56	12.82	
	60.00	60.00	100.00	83.33	
Total	30	25	1	6	62
	48.39	40.32	1.61	9.68	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	1.8616	0.6016
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	2.3361	0.5056
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	1.1427	0.2851
Phi Coefficient		0.1733	
Contingency Coefficient		0.1707	
Cramer's V		0.1733	

ADVERTENCIA: 50% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0284
Pr <= P (p-valor)	0.7428

Tamanho da amostra = 62

Tabela 22. Comparação entre as populações de Indianos e Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo						
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AC	AD	BB	BD	Total
africano	16	6	0	9	0	1	32
	22.54	8.45	0.00	12.68	0.00	1.41	45.07
	50.00	18.75	0.00	28.13	0.00	3.13	
	47.06	28.57	0.00	100.00	0.00	100.00	
indiano	18	15	1	0	5	0	39
	25.35	21.13	1.41	0.00	7.04	0.00	54.93
	46.15	38.46	2.56	0.00	12.82	0.00	
	52.94	71.43	100.00	0.00	100.00	0.00	
Total	34	21	1	9	5	1	71
	47.89	29.58	1.41	12.68	7.04	1.41	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	5	19.4739	0.0016
Likelihood Ratio Chi-Quad	5	25.5920	0.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.5324	0.4656
Phi Coefficient		0.5237	
Contingency Coefficient		0.4639	
Cramer's V		0.5237	

ADVERTENCIA: 67% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	7.548E-07
Pr <= P (p-valor)	1.795E-04

Tamanho da amostra = 71

Tabela 23. Comparação entre as populações de Indianos e Pigmeos Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo								
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AC	AD	AE	AF	BB	BD	Total
indiano	18	15	1	0	0	0	5	0	39
	18.18	15.15	1.01	0.00	0.00	0.00	5.05	0.00	39.39
	46.15	38.46	2.56	0.00	0.00	0.00	12.82	0.00	
	33.96	51.72	100.00	0.00	0.00	0.00	71.43	0.00	
pigmeo	35	14	0	2	2	4	2	1	60
	35.35	14.14	0.00	2.02	2.02	4.04	2.02	1.01	60.61
	58.33	23.33	0.00	3.33	3.33	6.67	3.33	1.67	
	66.04	48.28	0.00	100.00	100.00	100.00	28.57	100.00	
Total	53	29	1	2	2	4	7	1	99
	53.54	29.29	1.01	2.02	2.02	4.04	7.07	1.01	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	7	12.8989	0.0746
Likelihood Ratio Chi-Quad	7	16.2876	0.0226
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.0514	0.8207
Phi Coefficient		0.3610	
Contingency Coefficient		0.3395	
Cramer's V		0.3610	

ADVERTENCIA: 75% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	1.914E-05
Pr <= P (p-valor)	0.0511

Tamanho da amostra = 99

Tabela 24. Comparação entre as populações de Indianos e Parakanã

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo				
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AC	BB	Total
indiano	18	15	1	5	39
	16.51	13.76	0.92	4.59	35.78
	46.15	38.46	2.56	12.82	
	32.73	38.46	100.00	35.71	
parakana	37	24	0	9	70
	33.94	22.02	0.00	8.26	64.22
	52.86	34.29	0.00	12.86	
	67.27	61.54	0.00	64.29	
Total	55	39	1	14	109
	50.46	35.78	0.92	12.84	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	2.1400	0.5439
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	2.4025	0.4932
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.2161	0.6420
Phi Coefficient		0.1401	
Contingency Coefficient		0.1388	
Cramer's V		0.1401	

ADVERTENCIA: 25% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0123
Pr <= P (p-valor)	0.6172

Tamanho da amostra = 109

Tabela 25. Comparação entre as populações de Indianos e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População / Genótipo	AA	AB	AC	BB	Total
indiano	18	15	1	5	39
	13.43	11.19	0.75	3.73	29.10
	46.15	38.46	2.56	12.82	
	19.78	42.86	100.00	71.43	
xikrin	73	20	0	2	95
	54.48	14.93	0.00	1.49	70.90
	76.84	21.05	0.00	2.11	
	80.22	57.14	0.00	28.57	
Total	91	35	1	7	134
	67.91	26.12	0.75	5.22	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	3	15.5555	0.0014
Likelihood Ratio Chi-Quad	3	14.9313	0.0019
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	14.3000	0.0002
Phi Coefficient		0.3407	
Contingency Coefficient		0.3225	
Cramer's V		0.3407	

ADVERTENCIA: 50% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	3.407E-05
Pr <= P (p-valor)	7.653E-04

Tamanho da amostra = 134

Tabela 26. Comparação entre as populações de Indonesios e Chineses

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
chines	12	10	1	23
	21.05	17.54	1.75	40.35
	52.17	43.48	4.35	
	37.50	43.48	50.00	
indonesi	20	13	1	34
	35.09	22.81	1.75	59.65
	58.82	38.24	2.94	
	62.50	56.52	50.00	
Total	32	23	2	57
	56.14	40.35	3.51	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	0.2789	0.8698
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	0.2776	0.8704
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.2738	0.6008
Phi Coefficient		0.0699	
Contingency Coefficient		0.0698	
Cramer's V		0.0699	

ADVERTENCIA: 33% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0973
Pr <= P (p-valor)	0.8931

Tamanho da amostra = 57

Tabela 27. Comparação entre as populações de Indonesios e Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo					
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	BB	BD	Total
africano	16	6	9	0	1	32
	24.24	9.09	13.64	0.00	1.52	48.48
	50.00	18.75	28.13	0.00	3.13	
	44.44	31.58	100.00	0.00	100.00	
indonesi	20	13	0	1	0	34
	30.30	19.70	0.00	1.52	0.00	51.52
	58.82	38.24	0.00	2.94	0.00	
	55.56	68.42	0.00	100.00	0.00	
Total	36	19	9	1	1	66
	54.55	28.79	13.64	1.52	1.52	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	4	13.9756	0.0074
Likelihood Ratio Chi-Quad	4	18.2747	0.0011
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	3.4588	0.0629
Phi Coefficient		0.4602	
Contingency Coefficient		0.4180	
Cramer's V		0.4602	

ADVERTENCIA: 60% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	2.830E-05
Pr <= P (p-valor)	0.0015

Tamanho da amostra = 66

Tabela 28. Comparação entre as populações de Indonesios e Pigmeos Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo							
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	AE	AF	BB	BD	Total
indonesi	20	13	0	0	0	1	0	34
	21.28	13.83	0.00	0.00	0.00	1.06	0.00	36.17
	58.82	38.24	0.00	0.00	0.00	2.94	0.00	
	36.36	48.15	0.00	0.00	0.00	33.33	0.00	
pigmeo	35	14	2	2	4	2	1	60
	37.23	14.89	2.13	2.13	4.26	2.13	1.06	63.83
	58.33	23.33	3.33	3.33	6.67	3.33	1.67	
	63.64	51.85	100.00	100.00	100.00	66.67	100.00	
Total	55	27	2	2	4	3	1	94
	58.51	28.72	2.13	2.13	4.26	3.19	1.06	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	6	6.7892	0.3408
Likelihood Ratio Chi-Quad	6	9.7106	0.1374
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	1.9399	0.1637
Phi Coefficient		0.2687	
Contingency Coefficient		0.2595	
Cramer's V		0.2687	

ADVERTENCIA: 71% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	6.866E-04
Pr <= P (p-valor)	0.4440

Tamanho da amostra = 94

Tabela 29. Comparação entre as populações de Indonesios e Parakanã

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
indonesi	20	13	1	34
	19.23	12.50	0.96	32.69
	58.82	38.24	2.94	
	35.09	35.14	10.00	
parakana	37	24	9	70
	35.58	23.08	8.65	67.31
	52.86	34.29	12.86	
	64.91	64.86	90.00	
Total	57	37	10	104
	54.81	35.58	9.62	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	2.5891	0.2740
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	3.1065	0.2116
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	1.2994	0.2543
Phi Coefficient		0.1578	
Contingency Coefficient		0.1559	
Cramer's V		0.1578	

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0148
Pr <= P (p-valor)	0.3021

Tamanho da amostra = 104

Tabela 30. Comparação entre as populações de Indonesios e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
indonesi	20	13	1	34
	15.50	10.08	0.78	26.36
	58.82	38.24	2.94	
	21.51	39.39	33.33	
xikrin	73	20	2	95
	56.59	15.50	1.55	73.64
	76.84	21.05	2.11	
	78.49	60.61	66.67	
Total	93	33	3	129
	72.09	25.58	2.33	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	4.0927	0.1292
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	3.9047	0.1419
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	3.4308	0.0640
Phi Coefficient		0.1781	
Contingency Coefficient		0.1754	
Cramer's V		0.1781	

ADVERTENCIA: 33% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0112
Pr <= P (p-valor)	0.0849

Tamanho da amostra = 129

Tabela 31. Comparação entre as populações de Chineses e Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo					
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	BB	BD	Total
africano	16	6	9	0	1	32
	29.09	10.91	16.36	0.00	1.82	58.18
	50.00	18.75	28.13	0.00	3.13	
	57.14	37.50	100.00	0.00	100.00	
chines	12	10	0	1	0	23
	21.82	18.18	0.00	1.82	0.00	41.82
	52.17	43.48	0.00	4.35	0.00	
	42.86	62.50	0.00	100.00	0.00	
Total	28	16	9	1	1	55
	50.91	29.09	16.36	1.82	1.82	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	4	11.4041	0.0224
Likelihood Ratio Chi-Quad	4	15.3539	0.0040
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	1.4934	0.2217
Phi Coefficient		0.4554	
Contingency Coefficient		0.4144	
Cramer's V		0.4554	

ADVERTENCIA: 50% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	1.305E-04
Pr <= P (p-valor)	0.0062

Tamanho da amostra = 55

Tabela 32. Comparação entre as populações de Chineses e Pigmeos Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo							
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	AE	AF	BB	BD	Total
chines	12	10	0	0	0	1	0	23
	14.46	12.05	0.00	0.00	0.00	1.20	0.00	27.71
	52.17	43.48	0.00	0.00	0.00	4.35	0.00	
	25.53	41.67	0.00	0.00	0.00	33.33	0.00	
pigmeo	35	14	2	2	4	2	1	60
	42.17	16.87	2.41	2.41	4.82	2.41	1.20	72.29
	58.33	23.33	3.33	3.33	6.67	3.33	1.67	
	74.47	58.33	100.00	100.00	100.00	66.67	100.00	
Total	47	24	2	2	4	3	1	83
	56.63	28.92	2.41	2.41	4.82	3.61	1.20	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	6	5.9422	0.4297
Likelihood Ratio Chi-Quad	6	8.1513	0.2272
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.6561	0.4179
Phi Coefficient		0.2676	
Contingency Coefficient		0.2585	
Cramer's V		0.2676	

ADVERTENCIA: 71% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0017
Pr <= P (p-valor)	0.5411

Tamanho da amostra = 83

Tabela 33. Comparação entre as populações de Chineses e Parakanã

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
chines	12	10	1	23
	12.90	10.75	1.08	24.73
	52.17	43.48	4.35	
	24.49	29.41	10.00	
parakana	37	24	9	70
	39.78	25.81	9.68	75.27
	52.86	34.29	12.86	
	75.51	70.59	90.00	
Total	49	34	10	93
	52.69	36.56	10.75	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	1.5675	0.4567
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	1.7928	0.4080
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.2287	0.6325
Phi Coefficient		0.1298	
Contingency Coefficient		0.1287	
Cramer's V		0.1298	

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0324
Pr <= P (p-valor)	0.5419

Tamanho da amostra = 93

Tabela 34. Comparação entre as populações de Chineses e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
chines	12	10	1	23
	10.17	8.47	0.85	19.49
	52.17	43.48	4.35	
	14.12	33.33	33.33	
xikrin	73	20	2	95
	61.86	16.95	1.69	80.51
	76.84	21.05	2.11	
	85.88	66.67	66.67	
Total	85	30	3	118
	72.03	25.42	2.54	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	5.5934	0.0610
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	5.1964	0.0744
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	5.0583	0.0245
Phi Coefficient		0.2177	
Contingency Coefficient		0.2127	
Cramer's V		0.2177	

ADVERTENCIA: 33% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	0.0068
Pr <= P (p-valor)	0.0348

Tamanho da amostra = 118

Tabela 35. Comparação entre as populações de Africanos e Pigmeos Africanos

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo							
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	AE	AF	BB	BD	Total
africano	16	6	9	0	0	0	1	32
	17.39	6.52	9.78	0.00	0.00	0.00	1.09	34.78
	50.00	18.75	28.13	0.00	0.00	0.00	3.13	
	31.37	30.00	81.82	0.00	0.00	0.00	50.00	
pigmeo	35	14	2	2	4	2	1	60
	38.04	15.22	2.17	2.17	4.35	2.17	1.09	65.22
	58.33	23.33	3.33	3.33	6.67	3.33	1.67	
	68.63	70.00	18.18	100.00	100.00	100.00	50.00	
Total	51	20	11	2	4	2	2	92
	55.43	21.74	11.96	2.17	4.35	2.17	2.17	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	6	15.6620	0.0157
Likelihood Ratio Chi-Quad	6	17.7934	0.0068
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.0002	0.9894
Phi Coefficient		0.4126	
Contingency Coefficient		0.3814	
Cramer's V		0.4126	

ADVERTENCIA: 64% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	5.385E-06
Pr <= P (p-valor)	0.0106

Tamanho da amostra = 92

Tabela 36. Comparação entre as populações de Africanos e Parakanã

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo					
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	BB	BD	Total
africano	16	6	9	0	1	32
	15.69	5.88	8.82	0.00	0.98	31.37
	50.00	18.75	28.13	0.00	3.13	
	30.19	20.00	100.00	0.00	100.00	
parakana	37	24	0	9	0	70
	36.27	23.53	0.00	8.82	0.00	68.63
	52.86	34.29	0.00	12.86	0.00	
	69.81	80.00	0.00	100.00	0.00	
Total	53	30	9	9	1	102
	51.96	29.41	8.82	8.82	0.98	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	4	27.8259	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Quad	4	31.9537	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.4671	0.4943
Phi Coefficient		0.5223	
Contingency Coefficient		0.4630	
Cramer's V		0.5223	

ADVERTENCIA: 40% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	2.890E-08
Pr <= P (p-valor)	5.699E-06

Tamanho da amostra = 102

Tabela 37. Comparação entre as populações de Africanos e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo					
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	BB	BD	Total
africano	16	6	9	0	1	32
	12.60	4.72	7.09	0.00	0.79	25.20
	50.00	18.75	28.13	0.00	3.13	
	17.98	23.08	100.00	0.00	100.00	
xikrin	73	20	0	2	0	95
	57.48	15.75	0.00	1.57	0.00	74.80
	76.84	21.05	0.00	2.11	0.00	
	82.02	76.92	0.00	100.00	0.00	
Total	89	26	9	2	1	127
	70.08	20.47	7.09	1.57	0.79	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	4	32.8842	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Quad	4	31.4418	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	14.9310	0.0001
Phi Coefficient		0.5089	
Contingency Coefficient		0.4535	
Cramer's V		0.5089	

ADVERTENCIA: 50% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	3.666E-08
Pr <= P (p-valor)	1.467E-06

Tamanho da amostra = 127

Tabela 38. Comparação entre as populações de Pigmeos Africanos e Parakanã

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo							
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	AE	AF	BB	BD	Total
parakana	37	24	0	0	0	9	0	70
	28.46	18.46	0.00	0.00	0.00	6.92	0.00	53.85
	52.86	34.29	0.00	0.00	0.00	12.86	0.00	
	51.39	63.16	0.00	0.00	0.00	81.82	0.00	
pigmeo	35	14	2	2	4	2	1	60
	26.92	10.77	1.54	1.54	3.08	1.54	0.77	46.15
	58.33	23.33	3.33	3.33	6.67	3.33	1.67	
	48.61	36.84	100.00	100.00	100.00	18.18	100.00	
Total	72	38	2	2	4	11	1	130
	55.38	29.23	1.54	1.54	3.08	8.46	0.77	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	6	15.4640	0.0169
Likelihood Ratio Chi-Quad	6	19.2432	0.0038
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	0.0359	0.8498
Phi Coefficient		0.3449	
Contingency Coefficient		0.3260	
Cramer's V		0.3449	

ADVERTENCIA: 57% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	3.529E-06
Pr <= P (p-valor)	0.0072

Tamanho da amostra = 130

Tabela 39. Comparação entre as populações de Pigmeos Africanos e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo							
Frequência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	AD	AE	AF	BB	BD	Total
pigmeo	35	14	2	2	4	2	1	60
	22.58	9.03	1.29	1.29	2.58	1.29	0.65	38.71
	58.33	23.33	3.33	3.33	6.67	3.33	1.67	
	32.41	41.18	100.00	100.00	100.00	50.00	100.00	
xikrin	73	20	0	0	0	2	0	95
	47.10	12.90	0.00	0.00	0.00	1.29	0.00	61.29
	76.84	21.05	0.00	0.00	0.00	2.11	0.00	
	67.59	58.82	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	
Total	108	34	2	2	4	4	1	155
	69.68	21.94	1.29	1.29	2.58	2.58	0.65	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	6	16.3601	0.0119
Likelihood Ratio Chi-Quad	6	19.2301	0.0038
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	10.1738	0.0014
Phi Coefficient		0.3249	
Contingency Coefficient		0.3090	
Cramer's V		0.3249	

ADVERTENCIA: 71% das celas têm esperado menor que 5. O teste Chi-Quadrado (χ^2) pode não ser um teste válido.

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	4.299E-06
Pr <= P (p-valor)	0.0034

Tamanho da amostra = 155

Tabela 40. Comparação entre as populações de Parakanã e Xikrin

The SAS System
The FREQ Procedure

Tabela de População por Genótipo

População	Genótipo			
Freqüência, Porcentagem, Linha Pct, Coluna Pct	AA	AB	BB	Total
parakana	37	24	9	70
	22.42	14.55	5.45	42.42
	52.86	34.29	12.86	
	33.64	54.55	81.82	
xikrin	73	20	2	95
	44.24	12.12	1.21	57.58
	76.84	21.05	2.11	
	66.36	45.45	18.18	
Total	110	44	11	165
	66.67	26.67	6.67	100.00

Estatísticas para a Tabela de População por Genótipo

Estatística	GL	Valor	P-valor
Chi-Quadrada	2	13.1132	0.0014
Likelihood Ratio Chi-Quad	2	13.3815	0.0012
Mantel-Haenszel Chi-Quad	1	12.9474	0.0003
Phi Coefficient		0.2819	
Contingency Coefficient		0.2713	
Cramer's V		0.2819	

Teste Exato de Fisher

Tabela Probabilidade (P)	5.704E-05
Pr <= P (p-valor)	0.0013

Tamanho da amostra = 165

ANEXO 2

Paralelamente ao trabalho de determinação dos haplótipos do "α-MRE" em representantes das tribos indígenas Parakanã e Xikrin, nos propusemos a determinar estes haplótipos em indivíduos com a deleção $-\alpha^{3.7}$, com a finalidade de investigarmos uma possível associação dos haplótipos do elemento regulatório dos genes α e o principal determinante de talassemia α na região de Campinas (SP).

A origem predominantemente africana dos portadores desta deleção também poderia nos permitir visualizar as diferenças entre os haplótipos encontrados nos indígenas analisados no trabalho central e os obtidos neste outro grupo populacional que compõe a população brasileira.

Determinação dos haplótipos do "α-MRE" em indivíduos com a deleção -$\alpha^{3.7}$

INTRODUÇÃO

A investigação dos polimorfismos associados a determinadas mutações tem auxiliado na obtenção de dados antropológicos e no diagnóstico de determinadas doenças (Orkin e col., 1983). Os haplótipos do "α-MRE" podem ser úteis como marcadores genéticos, ao lado dos RFLPs e das regiões hipervariáveis (HVRs), na determinação dos haplótipos do *cluster* dos genes da globina α (Higgs e col., 1986). Especialmente quando grandes deleções removem grande parte dos sítios polimórficos, marcadores mais distantes podem ser muito úteis.

A deleção de 3.7 Kb de DNA (deleção -$\alpha^{3.7}$), referida como *rightward deletion*, é a causa mais comum de talassemia α^+ (Embury e col., 1980). Esta deleção tem distribuição mundial, com freqüências elevadas no Mediterrâneo, na África e na Ásia (Embury e col., 1980), sugerindo um efeito protetor contra a malária (Flint e col., 1986). Em algumas populações, como na Melanésia e Polinésia, essa forma de talassemia chega a atingir prevalências tão elevadas quanto 80%.

MATERIAIS E METODOLOGIA

Foram analisadas 52 amostras de DNA de portadores heterozigotos (-$\alpha^{3.7}$/αα), 54% caucasóides e 46% negróides, e 13 amostras de portadores homozigotos (-$\alpha^{3.7}$/-$\alpha^{3.7}$), 38% caucasóides e 62% negróides, nos quais a deleção havia sido previamente detectada. Estes indivíduos pertencem a uma população da região de Campinas (SP), previamente estudada em nosso Laboratório (Borges e col., 2001). A metodologia envolveu a amplificação do "α-MRE" pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o seqüenciamento direto dos produtos da PCR.

RESULTADOS

Entre os indivíduos portadores da deleção -$\alpha^{3.7}$, foram observados os haplótipos A, B e D (Tab.1).

Tabela 1. Haplótipos do "α-MRE" observados nas amostras de DNA estudadas (Harteveld, 1997; Harteveld e col., 2002).

	+96[a]	**+130**	**+158**	**+199**	**+209**	**+212**
Haplótipo A	C	G	C	G	G	G
Haplótipo B	C	**A**	C	**A**	G	G
Haplótipo D	C	G	**T[b]**	G	G	G

[a] Posições dos sítios polimórficos do "α-MRE" em relação ao sítio CAP do gene ζ
[b] As letras em negrito indicam as substituições nucleotídicas em comparação ao haplótipo A

Os diferentes genótipos do "α-MRE" nos indivíduos heterozigotos e homozigotos da deleção -$\alpha^{3.7}$ estão representados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Número de genótipos do "α-MRE" observados em 52 amostras de DNA de indivíduos heterozigotos da deleção -$\alpha^{3.7}$.

Genótipos	**(-$\alpha^{3.7}$/αα)**	
	Caucasóides	**Negróides**
AA	15	11
AB	11	8
BB	1	-
AD	1	4
BD	-	1
n	28	24

Tabela 3. Número de genótipos do "α-MRE" observados em 13 amostras de DNA de indivíduos homozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$.

Genótipos	**$(-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7})$**	
	Caucasóides	**Negróides**
AA	2	3
AD	3	3
DD	-	2
n	5	8

As freqüências dos haplótipos do "α-MRE" nos indivíduos heterozigotos e homozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$ estão representados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Freqüência dos haplótipos do "α-MRE" em 52 amostras de DNA de indivíduos heterozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$.
(número de indivíduos estudados entre parênteses)

$(-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha)$	**Haplótipos**		
	A	**B**	**D**
Caucasóides (28)	0,75	0,23	0,02
Negróides (24)	0,71	0,19	0,10

Tabela 5. Freqüência dos haplótipos do "α-MRE" em 13 amostras de DNA de indivíduos homozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$.
(número de indivíduos estudados entre parênteses)

$(-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7})$	**Haplótipos**	
	A	**D**
Caucasóides (5)	0,70	0,30
Negróides (8)	0,56	0,44

DISCUSSÃO

Entre os heterozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$, de 56 cromossomos dos indivíduos caucasóides estudados, 75% apresentaram o haplótipo A, 23% o haplótipo B e 2% o haplótipo D; entre os indivíduos negróides, de 48 cromossomos analisados, 71% apresentaram o haplótipo A, 19% o haplótipo B e 10% o haplótipo D. Entre os homozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$, de 10 cromossomos dos indivíduos caucasóides estudados, 70% apresentaram o haplótipo A e 30% o haplótipo D; entre os indivíduos negróides, de 16 cromossomos analisados, 56% apresentaram o haplótipo A e 44% o haplótipo D.

Estes haplótipos são os mais frequentes nas populações de origem africana, sendo o haplótipo A o predominante (73%), seguido dos haplótipos D (16%) e B (11%). O haplótipo D foi observado somente entre africanos, com uma freqüência relativamente elevada (Harteveld, 1997; Harteveld e col, 2002).

Já entre os indígenas das tribos Parakanã e Xikrin, estudados no trabalho central, foram identificados apenas os haplótipos A e B. Em 330 cromossomos dos índios analisados, observou-se o predomínio do haplótipo A (80%), seguido do haplótipo B (20%).

A avaliação dos homozigotos da deleção $-\alpha^{3.7}$ permitiu verificar que a mesma encontra-se ligada aos haplótipos A e D, não podendo, no entanto, ser excluída a possibilidade de ligação também com o haplótipo B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Borges, E., Wenning, M.R.S.C., Kimura, E.M., Gervásio, A.S., Costa, F.F. and Sonati, M.F. (2001). High prevalence of α-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Brazilian J. Med. Biol. Res. 34:** 759-762

Embury, S.H., Miller, J.A., Dozy, A.M., Kan, Y.W., Chan. V. and Todd, D. (1980). Two different molecular organizations accounts for the single α Thalassemia-2 genotype. **J. Clin. Invest. 66:** 1319-1325.

Flint, J., Hill, A.V.S., Bowden, D.K., Oppenheimer, S.J., Sill, P.R., Serjeantson, S.W., Bana-Koiri, J., Bhatia, K., Alpers, M.P., Boyce, A.J., Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (1986). High frequencies of α-thalassemia are the result of natural selection by malaria. **Nature 321:** 744-750.

Harteveld, C.L. (1997). **The Molecular Genetics of α-Thalassemia: Structure and Expression of the α-Globin Gene Cluster.** Rijksuniversiteit te Leiden. PhD Thesis.

Harteveld, C.L., Muglia, M., Passarino, G., Kielman, M.F. and Bernini, L.F. (2002). Genetic Polymorphism of the Major Regulatory Element HS-40, upstream of the Human α-Globin Gene Cluster. **Br. J. Haematol.** (in press).

Higgs, D.R., Wainscoat, J.S., Flint, J., Hill, A.V.S., Thein, S.L., Nicholls, R.D. and Teal, H. (1986). Analysis of the human α-globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:** 5165-5169.

Orkin, S.H., Antonarakis, S.E. and Kazazian Jr, H.H. (1983). Polymorphism and molecular pathology of the human beta globin gene. **Prog. Hematol. 13:** 49-73.