

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE INSERÇÃO ALU EM UMA POPULAÇÃO DA CIDADE DE SÃO PAULO: PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Barbara Luiza Cardanha (IC) e Ana Paula Pimentel Costa (Orientador)

Apoio: PIBIC Mackenzie

Resumo

Cerca de 98% do genoma humano é composto por sequencias que não codificam proteínas, entre essas sequencias aproximadamente 10% são de sequencias Alu, que podem ser usadas para teste de paternidade, análises forenses e de ancestralidade e composição da população servindo como marcadores moleculares. O objetivo foi padronizar o protocolo de análise de loci polimórficos (ACE, APOA1, B65, PV92, TPA25), estudando os métodos de coleta, extração de DNA, seleção de primers e condições da PCR, eletroforese e análise dos dados. Os resultados mostram que o *swab* é a melhor forma de coleta pela facilidade, seu caráter não invasivo e rendimento da extração de DNA obtido. Foi possível analisar os três loci selecionados através das condições de ensaio utilizadas. A seleção dos primers também se mostrou correta.

Palavras-chave: Alu, extração de saliva, padronização

SUMMARY

Around 98 % of the human genome is composed by no coding protein sequences. Approximately 10 % of these sequences are known as Alu sequences, which can be used in paternity test and forensic and ancestry analysis and composition of the population, serving as molecular markers. The aim of this work was to standardize the protocol to analyse Alu polymorphic loci (ACE APOA1, B65 , PV92 , TPA25), including sample collection , DNA extraction, selection of Alu insertion primers and PCR conditions, electrophoresis and data analysis. The results show that the swab is the best procedure to collect samples due to be non-invasive and the yield obtained in DNA extraction. It was possible to analyze the three Alu loci selected through the test conditions used. The selection of primers was also correct.

Keywords: Alu, saliva extraction, standardization

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 98% do genoma humano é composto por sequências que não codificam para proteína. Deste total, 42% é composto por sequências genéticas móveis, conhecidas como elementos de transposição (ULE, 2013). Estes elementos têm profundos efeitos na estrutura e funcionamento do genoma. Os elementos de transposição são responsáveis em parte por, gerar variabilidade genética. Variabilidade esta gerada como consequência da capacidade intrínseca de mudar de lugar nos genomas em que se encontram associados (VENNER et al, 2009).

A família de elementos *Alu* representa os elementos de retrotransposição mais comuns em primatas, constituindo aproximadamente 10 % do genoma humano. Acredita-se que as primeiras inserções destes elementos no genoma de primatas tenham ocorrido a 65 milhões de anos, tornando-se o mais bem-sucedido elemento móvel do genoma humano (CORDAUX et al., 2004). As diferentes inserções destes elementos no genoma geraram diferentes polimorfismos, que podem ser utilizados como marcadores de DNA em estudos de populações humanas (AYARPADIKANNAN, et al, 2014). Analisando o polimorfismo da inserção *Alu* é possível estudar a diversidade, origem e estrutura do genoma da população mundial (BATZER; DEININGER, 2002), assim como estudar doenças ligadas aos genes (CHEN et al., 2005 apud CORDAUX et al., 2007).

Durante a evolução, uma ou várias sequências *Alu* “masters” foram capazes de se inserir em outras partes do genoma. Estima-se que uma nova inserção ocorra uma vez a cada 200 nascidos (PRAK; KAZAZIAN, 2000).

Cada *Alu* é proveniente de um único evento de retrotransposição que ocorreu nos primatas. Depois dessa transposição inicial, as sequências são herdadas segundo padrão mendeliano. A maioria das inserções *Alu* aconteceu há milhões de anos e estão fixadas, isso significa que, em um locus em particular, todos os primatas tem a sequência *Alu* em cada um dos pares de cromossomos. Entretanto, centenas de *Alus* tem se inserido no genoma desde a evolução de primatas para os humanos, consequentemente algumas inserções não são fixadas, o que significa que se pode ter ou não a presença da sequência em cada um dos pares de cromossomos, dessa forma cria-se dois possíveis alelos (presença [+] e/ou ausência [-]) (DEININGER; BATZER, 1999).

Assim esse dimorfismo da inserção *Alu*, em um estudo feito por Batzer et al. (1994) usando quatro loci polimórficos das inserções *Alu* (TPA25, ACE, APO, PV92), onde eram analisadas ausência ou presença da inserção, demonstrou que este polimorfismo era útil para o estudo genético de populações. Ray et al. (2005) analisou 100 loci polimórficos da inserção *Alu*, para determinar a ancestralidade das amostras de DNA de 18 pessoas geograficamente

aleatórias, classificando essas amostras em quatro grandes grupos populacionais do mundo. Um estudo feito na Rússia pelo Solovieva et al. (2009) foi usado cinco loci polimórficos (ACE, APOA1, B65, PV 92, TPA25) das inserções *Alu* para se determinar a frequência das inserções na população russa e determinar a ancestralidade de 10 populações de diferentes partes da Rússia. Foram observadas diferentes frequências dos alelos nas diferentes populações, indicando que as inserções *Alu* são ótimos marcadores para se estudar a evolução humana e a migração. Vários trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade das inserções *Alu* neste tipo de estudo.

No Brasil, Marrero et al. (2007) realizaram estudos usando a sequência *Alu* para investigar a história evolutiva de uma população do sul do país (os habitantes da região do Pampa em comparação com populações correspondentes da Argentina e Uruguai). Em um estudo anterior, Cotrim et al. (2004) analisaram quatro loci polimórficos de *Alu* ((APO, ACE, TPA25 e FXIIB) para caracterizar grupos de quilombolas do Vale do Ribeira. No trabalho de Mendes-Junior e Simões (2001), foram analisadas as inserções 3 loci polimórficos (TPA25, PV 92, APO) de inserção *Alu* em uma população urbana do sudeste do Brasil para caracterizar a composição étnica dessa população.

Deste modo, o polimorfismo da inserção *Alu* mostrou-se como um importantíssimo marcador nos estudos de populações em escalas globais (BATZER et al., 1996; STONEKING et al., 1997; CARROLL et al., 2001; ROY-ENGEL et al., 2001) e regionais (BATTILANA et al., 2006; NASIDZE et al., 2001; XIAO et al., 2002; KHUSAINOVA et al., 2004; SOLOVIEVA et al., 2009), assim como é útil para teste de paternidade (NOVICK et al., 1995) e para análises forenses (NOVICK et al., 1993; RAY et al., 2005).

Segundo a literatura, muitos dos marcadores de loci polimórficos das inserções *Alu* são caracterizados como informativos de ancestralidade por apresentarem alto diferencial de frequência entre as populações. Com a formação de uma população miscigenada, espera-se que a frequência de qualquer locus, definidos como marcadores que apresentam frequências extremas e distintivas entre populações diferenciadas por fatores étnicos ou geográficos, atinja valores diferentes ao encontrado nas populações parentais (Telo, 2010)

Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de padronizar as condições experimentais e validar o protocolo para analisar de 5 loci polimórficos (ACE, APOA1, B65, PV92, TPA25) de inserções *Alu* em uma população da cidade de São Paulo. Assim foram estudados os parâmetros relacionados a: métodos de coleta de amostras; método de extração do DNA; seleção dos primers e condições de amplificação das sequências pela técnica de PCR; eletroforese e análise dos dados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para fins de padronização do protocolo experimental foram utilizadas cedidas voluntariamente, disponíveis no laboratório de análises clínicas do CCBS.

2.1. Coleta

A coleta das amostras foi realizada de duas formas, através do *salivette* e *swab*.

Para ambas as formas de coleta era necessário que o participante não tivesse ingerido nenhum tipo de alimento ou bebida por, pelo menos, meia hora e estar com as mãos limpas.

2.1.1. Coleta com *salivette*

Os participantes abriram o tubo contendo o algodão, verteram o tubo na boca e mastigaram o algodão por um minuto. Depois tamparam o tubo com o algodão mascado dentro, esse tubo foi centrifugado por 20 minutos a 15.000 rpm. A saliva foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL em seguida o material foi armazenado sob refrigeração até a extração do DNA.

2.1.2. Coleta com *swab*

Neste caso, os participantes retiraram o *swab* da embalagem individual, sem tocar na ponta com o algodão. Segurando na extremidade inferior, raspavam com cuidado a parte interna da bochecha e entre a gengiva e a bochecha por um minuto.

Posteriormente o *swab* embebido de saliva foi mergulhado no tubo eppendorf contendo 200 µL de TES (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e agitou-se por 30 segundos utilizando o vórtex, em seguida o material foi armazenado sob refrigeração até a extração do DNA.

2.3. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico foi realizado a partir de amostras de saliva segundo o protocolo adaptado de Abraão *et. al* (2005) utilizando o método de “salting out”, cujas adaptações foram: centrifugar as amostras por três minutos a 15.000 rpm após o banho-maria por duas horas, a centrifugação após a adição do etanol absoluto também por três minutos a 15.000 rpm, a lavagem do *pellet* com etanol 70% foi feita duas vezes sem centrifugar as amostras entre as lavagens, os tubos eppendorf ficaram abertos por pelo menos uma hora e o DNA foi ressuspenso em 40 µL de TE (Tris 10mM pH 8, EDTA 0,1mM pH 8) .

As amostras de DNA obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,8% para quantificação utilizando marcadores de concentração (λ DNA, Invitrogen) e conservadas a -20°C até a sua utilização.

2.4. ANÁLISE DOS LOCI POLIMÓRFICOS DAS INSERÇÕES ALU.

A genotipagem foi realizada através de amplificação por PCR utilizando iniciadores específicos para cada loci (tabela 1). A seguir os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 20-100ng de DNA, 0,2 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 8,6, 50 mM KCl, 0,5 U da enzima Taq polymerase, com 10 pMol de iniciadores conforme listados na tabela 1. As reações de PCR serão realizadas nas seguintes condições: denaturação por 2 minutos em 94°C, 1 minuto na temperatura de *annealing* correta para cada primer indicada na tabela 1, 1 minuto em 72°C, e repetir esse ciclo 32 vezes, permanecendo a 12°C após o termino dos ciclos até as amostras serem retiradas do termociclador.

Tabela 1: Loci genéticos, sequência dos iniciadores, localização cromossômica e tamanho do fragmento dos polimorfismos que serão utilizados neste trabalho. (adaptado BATZER *et al*, 1994).

Locus do DNA	APO	PV92	TPA25
Localização no cromossomo	11	16	8
Tamanho da sequência	400/110	450/130	457/134
Sequência	F-5'- AAGTGCTGTAGGCCA TTTAGATTAG -3' R-5'- AGTCTTCGATGACAG CGTATACAGA -3'	F-5'- AACTGGGAAAATTTGAA GAGAAAGT -3' R-5'- TGAGTTCTCAACTCCTGT GTGTTAG -3'	F-5'- GTAAGAGTTCCGTAAC AGGACAGCT 3' R-5'- CCCCACCCTAGGAGAA CTTCTCTTT -3'
T _m em °C	60	58	63

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,8% e visualizados através de coloração com Syber Safe (Invitrogen). Todas as condições de eletroforese do gel de agarose foram padronizadas.

Para cada locus pode ser observado uma ou duas bandas, segundo o tamanho da sequência amplificada esperada (tabela 1). A genotipagem de cada locus foi indicada pela presença (+) ou ausência (-) dos fragmentos esperados pela amplificação por PCR.

A distribuição dos genótipos e frequências alélicas são obtidas por contagem direta a partir da leitura dos géis de agarose.

4. resultados e discussão

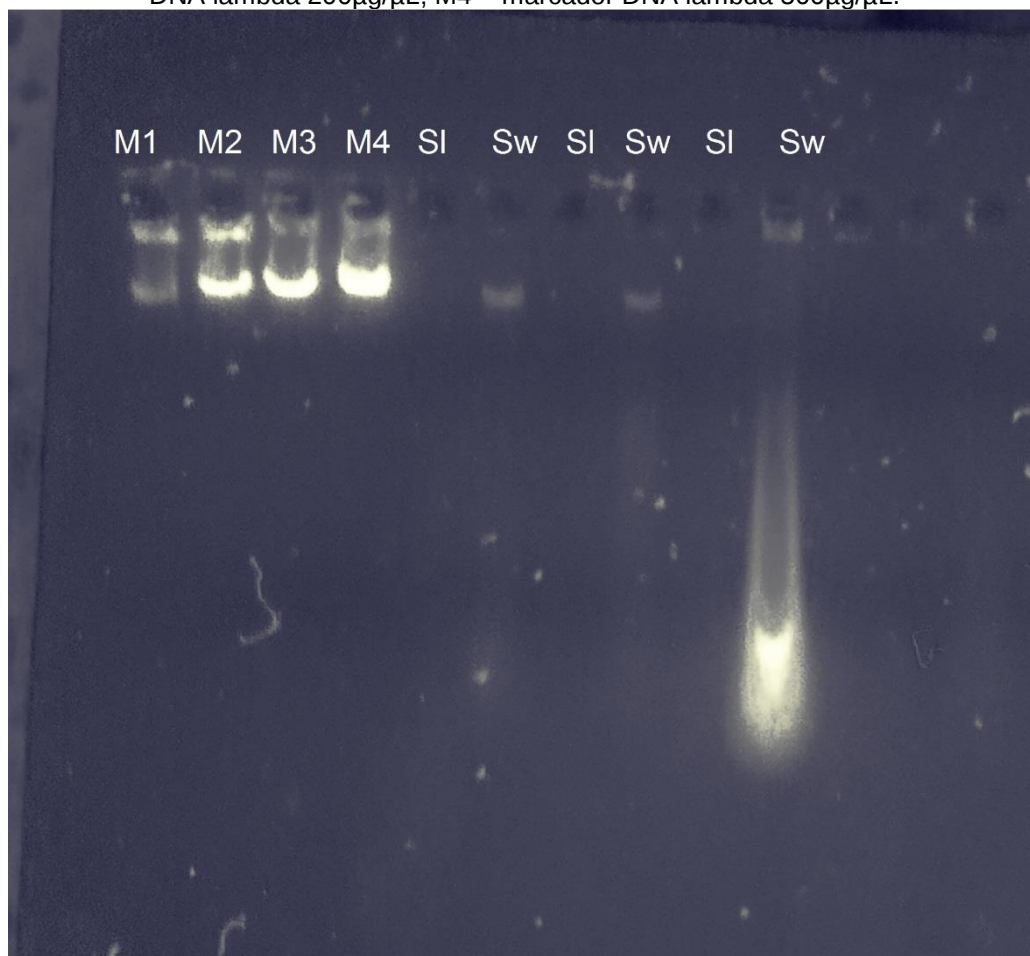
4.1. Comparação entre AS TÉCNICAS DE COLETA

Para padronizar a melhor forma de coleta do material, foi realizada a extração de DNA das amostras coletadas utilizando *salivette* e *swab* e os resultados foram comparados através da análise de uma eletroforese em gel de agarose (Figura 1).

Como mostrado na figura 1, obteve-se um melhor rendimento e DNA de melhor qualidade (aferido pelo padrão de bandas observado no gel) nas amostras coletadas utilizando o *swab*; em comparação as amostras coletadas por *salivette*. A comparação com os marcadores moleculares indica que na extração de DNA de amostras coletadas com *swab* foi obtido em média 50µg/µL de DNA. O suficiente para realizar a amplificação por PCR.

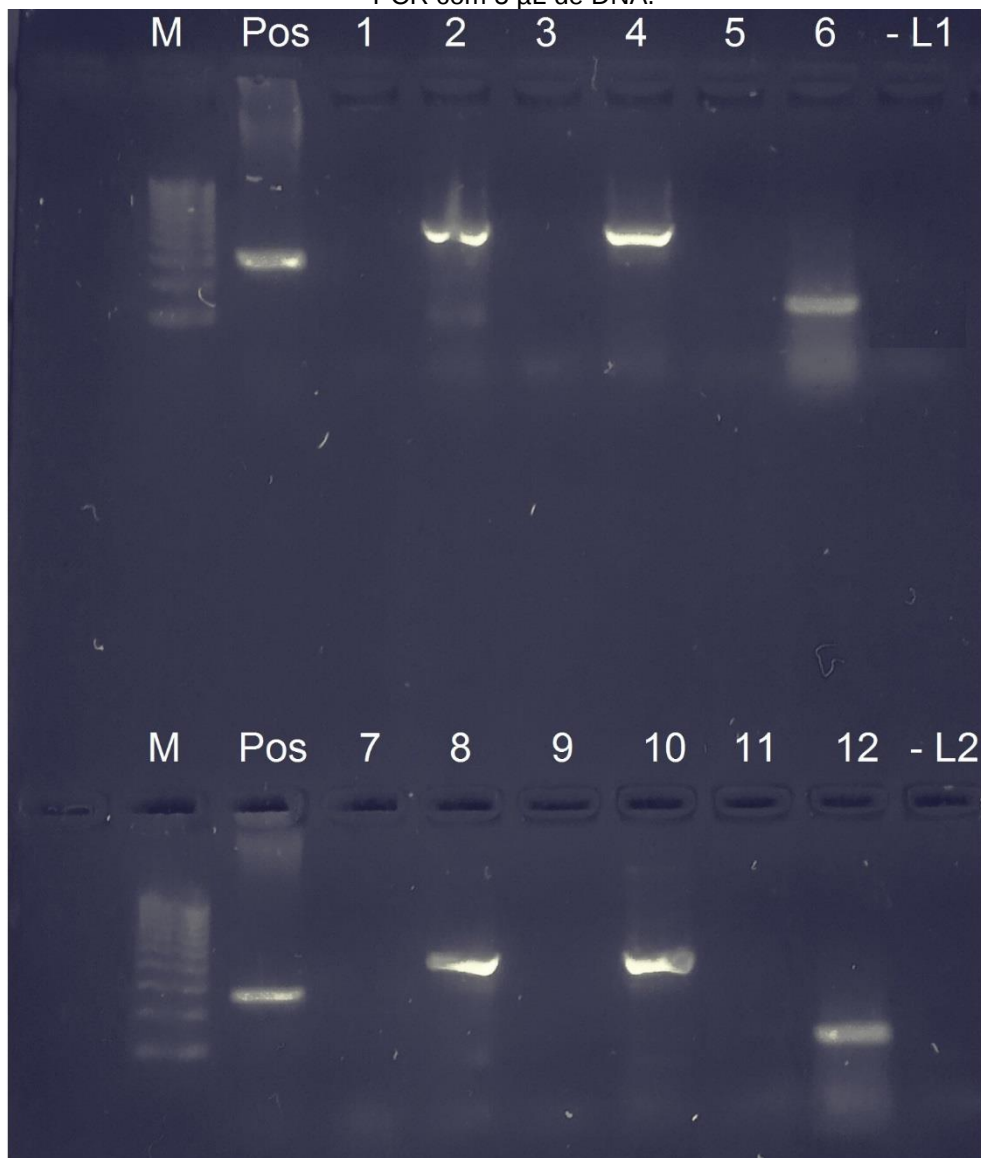
A diferença no resultado da extração de DNA deve-se provavelmente por causa da raspagem na bochecha e gengiva durante o uso do *swab*. Isto possibilitaria coletar uma maior quantidade de material da mucosa bucal. Já com o *salivette*, não há raspagem da mucosa bucal durante a coleta, resultando em uma menor quantidade de células coletadas. Isto resultaria em um menor rendimento na extração do DNA.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% para analisar qualitativamente a extração de DNA pelas coletas através do *salivette* e *swab*. SI – extração utilizando o *salivette*; Sw – extração utilizando o *swab*; M1 – marcador DNA lambda 50µg/µL; M2 – marcador DNA lambda 100µg/µL; M3 – marcador DNA lambda 200µg/µL; M4 – marcador DNA lambda 500µg/µL.



Para avaliar a qualidade do DNA extraído, as amostras obtidas por *swab* e *salivette* foram submetidas a PCR, utilizando o iniciador TPA25. Foi observado produtos de amplificação apenas nas amostras coletadas por *swab*. Este resultado mostrado na figura 2 confirma que a coleta por *swab* é mais eficiente do que a coleta com *salivette*, pois a amplificação do DNA foi possível tanto com 5µL (L2) como com 10 µL (L1) de DNA e o DNA obtidos era de boa qualidade.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1,8%. Comparação entre os métodos de coleta: M – marcador; Pos – positivo; amostras 1, 3, 5, 7, 9, 11 – extração utilizando o salivette; amostras 2, 4, 6, 8, 10, 12 – extração utilizando o swab; Neg – negativo; Linha 1 – PCR com 10 μ L de DNA; Linha 2 – PCR com 5 μ L de DNA.



4.2. ANÁLISE DOS LOCI POLIMÓRFICOS DAS INSERÇÕES ALU

Inicialmente era prevista a análise de 5 loci polimórficos (ACE, APOA1, B65, PV92, TPA25), porém os testes de padronização foram realizados com os 3 loci mais representativos na população brasileira (MENDES-JUNIOR; SIMÕES, 2001 e BATZER *et al*, 1994). Assim foram analisados os loci marcadores polimórficos: APO, PV92, TPA25 (tabela 1). Estes 3 loci, segundo estudos anteriores, apresentam uma significativa diversidade genética (BATZER *et al*, 1994).

Tabela 1: Loci genéticos, sequência dos iniciadores, localização cromossômica e tamanho do fragmento dos polimorfismos que serão utilizados neste trabalho. (adaptado BATZER *et al* ,1994).

Locus do DNA	APO	PV92	TPA25
Localização no cromossomo	11	16	8
Tamanho da sequência	400/110	450/130	457/134
Sequência	F-5'- AAGTGCTGTAGGCCA TTTAGATTAG -3' R-5'- AGTCTTCGATGACAG CGTATACAGA -3'	F-5'- AACTGGGAAAATTTGAA GAGAAAGT -3' R-5'- TGAGTTCTCAACTCCTGT GTGTTAG -3'	F-5'- GTAAGAGTTCCGTAAC AGGACAGCT 3' R-5'- CCCCACCCTAGGAGAA CTTCTCTTT -3'
Tm em °C	60	58	63

Após a definição do melhor método de coleta, as amostras obtidas foram submetidas à amplificação por PCR para caracterização dos loci polimórficos em 10 amostras e depois foi realizada uma eletroforese em gel de 1,8% para separar as possíveis bandas formadas em cada amostra, como indicado na figura 3.

Na figura 3, mostra o resultado da eletroforese da PCR usando o primer TPA25. A observação de duas bandas nas amostras indica que há apenas uma inserção (banda superior) de tamanho 457 pares de base (bp) mostrando que o indivíduo é heterozigoto, a banda inferior de tamanho 134 é sem a inserção. A presença de uma única banca indica que o indivíduo é homozigoto, tanto para a presença (+) quanto para a ausência (-) da inserção.

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1,8%. Resultado da PCR realizada com primer TPA25; M – marcador; Pos – positivo; de 1 a 10 – amostras; Neg – negativo; (-/-) – homozigoto sem a inserção; (+/+) – homozigoto com a inserção; (+/-) – heterozigoto.

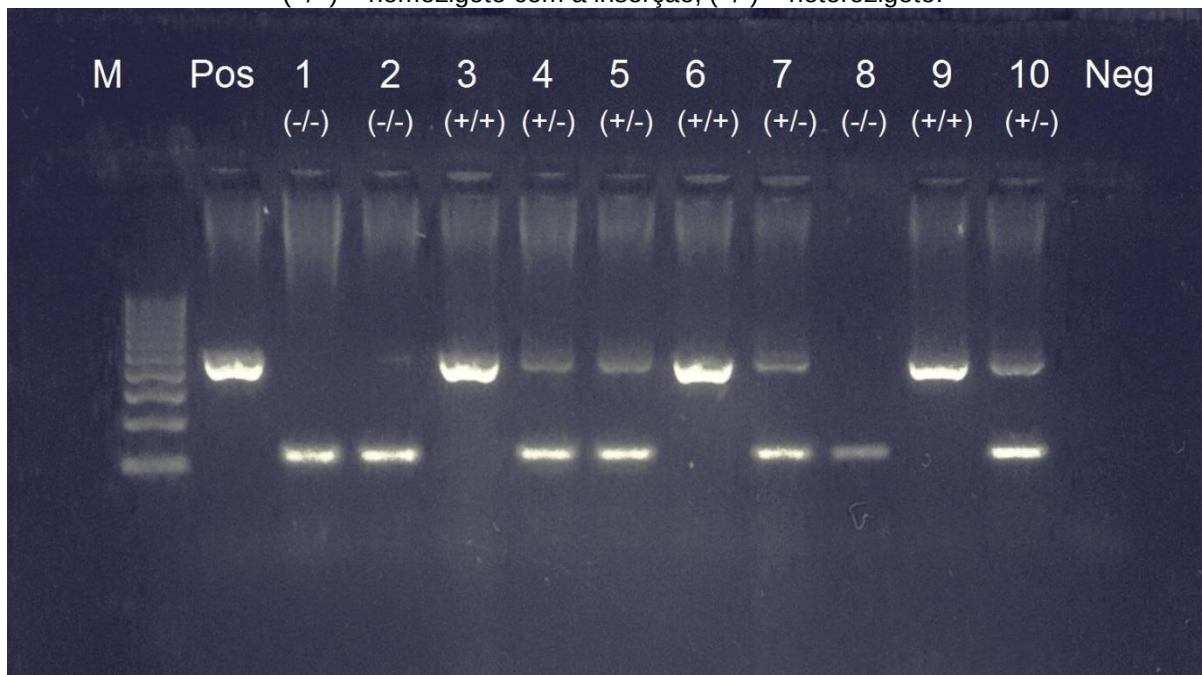
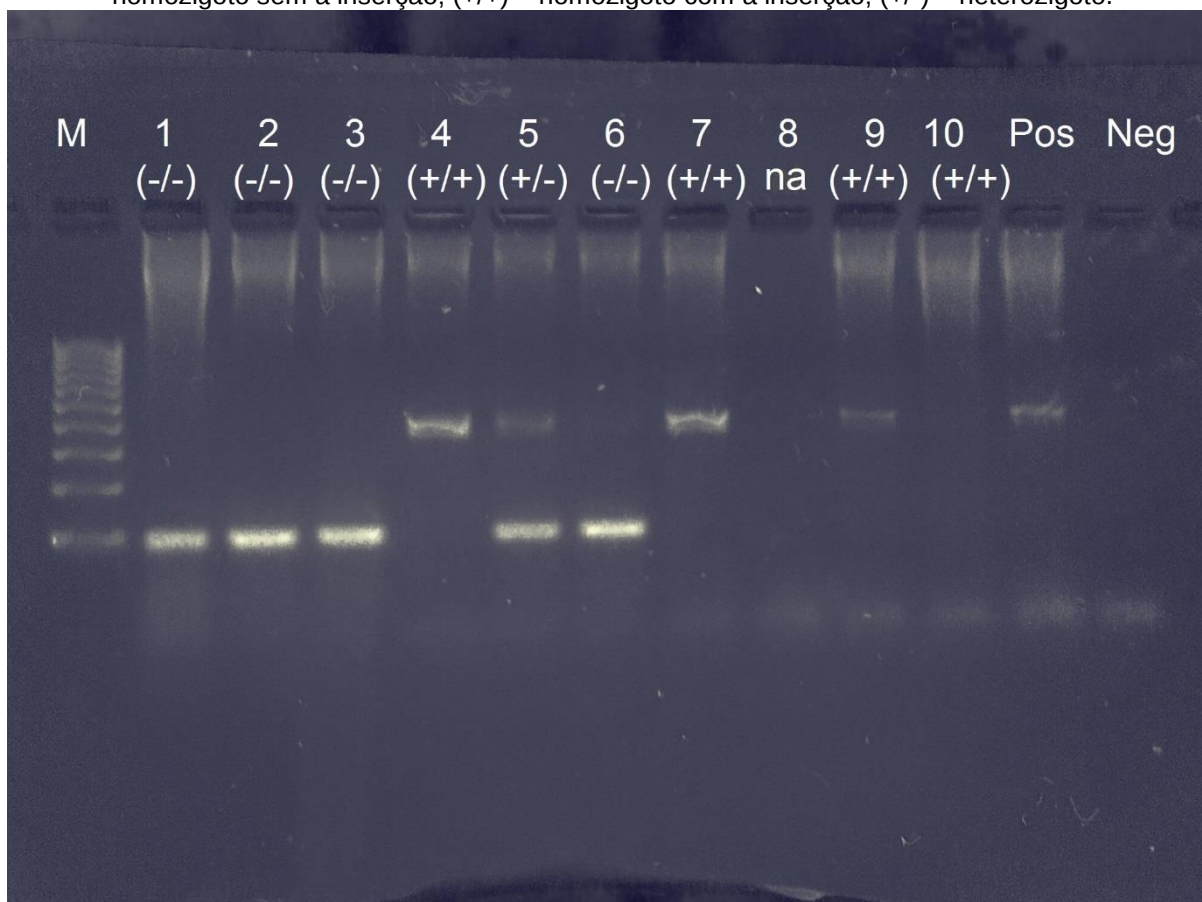
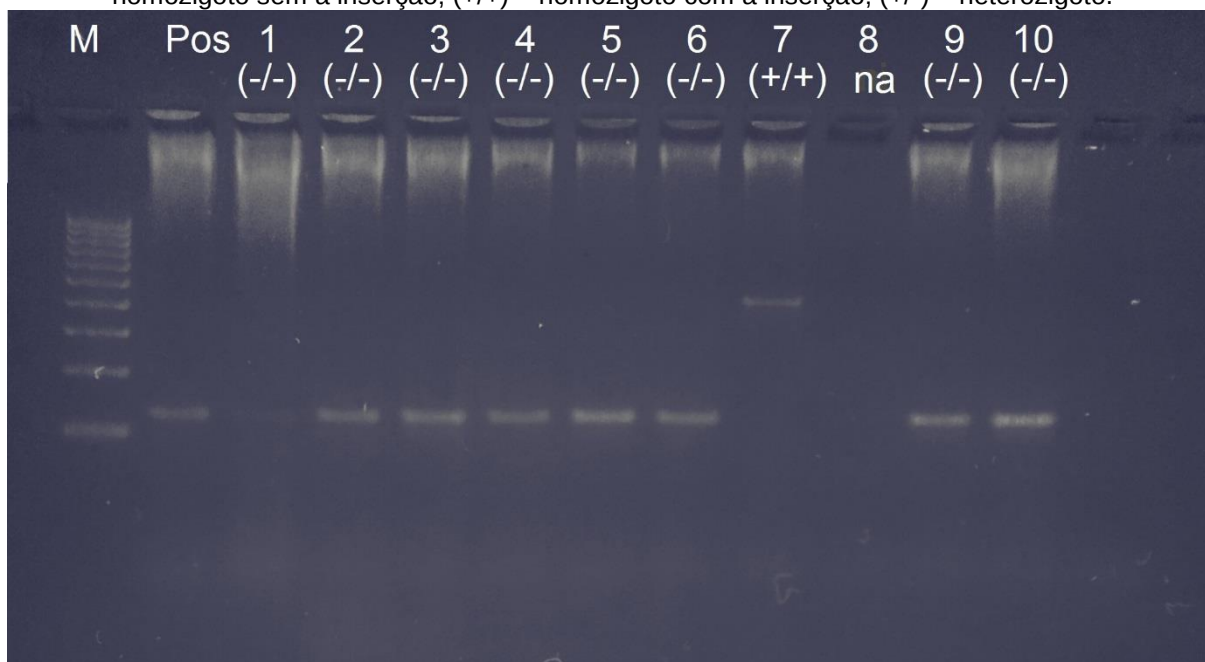


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1,8%. Resultado da PCR realizada com primer APO; M – marcador; Pos – positivo; de 1 a 10 – amostras; na – não amplificado; Neg – negativo; (-/-) – homozigoto sem a inserção; (+/+) – homozigoto com a inserção; (+/-) – heterozigoto.



A figura 4, mostra o resultado da eletroforese da PCR usando o primer APO, a observação de duas bandas nas amostras indica que há apenas uma inserção de tamanho 400 bp mostrando que o indivíduo é heterozigoto, a banda de tamanho 110 é sem a inserção. A presença de uma única banca indica que o indivíduo é homozigoto, tanto para a presença (+) quanto para a ausência (-) da inserção.

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1,8%. Resultado da PCR realizada com primer PV92; M – marcador; Pos – positivo; de 1 a 10 – amostras; na – não amplificado; Neg – negativo; (-/-) – homozigoto sem a inserção; (+/+) – homozigoto com a inserção; (+/-) – heterozigoto.



A figura 5, mostra o resultado da eletroforese da PCR usando o primer PV92, a observação de duas bandas nas amostras indica que há apenas uma inserção de tamanho 450 bp mostrando que o indivíduo é heterozigoto, a banda de tamanho 130 é sem a inserção. A presença de uma única banca indica que o indivíduo é homozigoto, tanto para a presença (+) quanto para a ausência (-) da inserção.

Os cálculos da frequência genotípica e alélica dos primers TPA25, PV92 e APOA1 estão indicados na tabela 2.

Tabela 2: Frequência genotípica do homozigoto positivo (+/+), heterozigoto (+/-) e homozigoto negativo (-/-), respectivamente. Frequência alélica da presença e ausência da inserção, respectivamente.

	TPA25	APO	PV92
Frequência genotípica (%)	0,4; 0,4; 0,2	0,5; 0,2; 0,3	0,1; 0; 0,9
Frequência fenotípica (%)	0,6; 0,4	0,6; 0,4	0,1; 0,9

Observa-se que os primers TPA25 e APO são mais frequentes na população analisada. Estes dados, ao comparar com dados já descritos na literatura (Tabela 3) demonstram uma forte influência dos europeus, africanos e ameríndios na composição de nossa amostra assim como também foi descrito por Mendes-Junior e Simões (2001), em estudos com amostras da população brasileira. Estes resultados validam as condições experimentais padronizadas neste estudo.

Tabela 3: Frequência do gene ancestral utilizado para estimar a mistura nas amostras da população brasileira estudada (Adaptado MENDES-JUNIOR; SIMÕES, 2001).

Inserção Alu	Europeus	Africanos	Ameríndios
TPA25	0,578	0,252	0,599
PV92	0,225	0,255	0,919
APO	0,952	0,514	0,994

Tabela 4: Resultados do artigo de Mendes-Junior; Simões, 2001. Frequências encontradas na população do Sudeste do Brasil.

	TPA25	PV92	APO
Inserção Alu	0,488	0,215	0.861

Assim foi possível analisar os três loci selecionados através das condições de ensaio utilizadas. Indicando que a coleta por swab seria a mais indicada pela facilidade, seu caráter não invasivo e rendimento da extração de DNA obtido.

A seleção dos primers também se mostrou acertada, pois mesmo com um número reduzido de amostras analisadas nesta padronização, foi possível analisar os três loci das inserções Alu. Trabalhos anteriores analisando as frequências dos loci de Alu em diferentes populações demonstram uma variação na frequência destas inserções de acordo com os grupos étnicos. Segundo Terrero *et al.* (2009) a variação genética na população mundial se dá pela estrutura geográfica de acordo com a ancestralidade. De acordo com seu estudo, a deriva genética pode ter tido um papel importante na composição genética dos grupos étnicos como resultado do isolamento parcial na história evolutiva da humanidade, assim como a migração humana, repovoando o planeta, também influencia na diversidade genética.

Um ponto importante é no dimensionamento da amostragem. Um “n” amostral baixo, não permite fazer análises estatísticas confiáveis. De acordo com as frequências estimadas de cada inserção Alu seria necessário um número amostral ao redor de 100, para que os dados obtidos sejam realmente representativos do grupo amostral analisado. Terreros *et al.* (2009) que utilizou 563 amostras de seis populações da África, quatro da Ásia e duas da

Europa para estudar a evolução humana através de 27 inserções *Alu* polimórficas. Já Mendes-Junior e Simões (2001) ao analisarem uma população do Sudeste do Brasil (149 amostras) usando 3 polimorfismos de inserção *Alu*, determinaram a frequência dessas inserções na população estudada.

5. considerações finais

Com o objetivo de padronizar o protocolo de análise de loci polimórficos, a coleta do material biológico pelo *swab* se mostrou mais eficaz do que a coleta pelo *salivette*, provavelmente o primeiro método fornece mais células, por causa da raspagem do *swab* na bochecha e gengiva, para realizar a extração do DNA.

Os primers mais representativos na população brasileira foram escolhidos, uma vez que esta é heterogênea e ter sofrido muita influência dos grupos étnicos africanos e europeus na colonização do país.

Já para uma análise correta dos dados é necessário cuidado no número de amostras analisadas para que os cálculos estatísticos sejam considerados confiáveis. As frequências das inserções descritas na literatura são dados essenciais para o dimensionamento amostral.

A população brasileira constitui um dos grupos mais heterogêneos do mundo, como resultado de cruzamentos interétnicos entre europeus, africanos, ameríndios e asiáticos (ALVES-SILVA et al, 2000). Assim pesquisa dos polimorfismos das inserções *Alu* mostra-se bastante importante, pois resulta em dados importantes sobre a ancestralidade genética e a contribuição de cada grupo étnico na formação da nossa população.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, M. G.; BILLERBECK, A. E. C.; NISHI, M. Y.; MARUI, S.; MENDONÇA, B. B. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 6, p. 978-82, 2005.

AYARPADIKANNAN, S.; KIM, H.-S. The Impact of Transposable Elements in Genome Evolution and Genetic Instability and Their Implications in Various Diseases. **Genomics & informatics**, v. 12, n. 3, p. 98-104. 2014.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 26, n. 4, p. 274-81. 2004.

BATTILANA, J.; FAGUNDES, N. J. R.; HELLER, A. H.; GOLDANI, A.; FREITAS, L. B.; TARAZONA-SANTOS, E.; MUNKHBAT, B.; MUNKHTUVSHIN, N.; KRYLOV, M.; BENEVOLENSKAIA, L.; ARNETT, F. C.; BATZER M. A.; DEININGER P. L.; SALZANO, F. M.; BONATTO S. L. Alu insertion polymorphisms in Native Americans and related Asian populations. **Annals of human biology**, v. 33, n. 2, p. 142-160. 2006.

BATZER, M. A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAR, H.; KASS, D. H.; SHAIKH, T. H.; NOVICK, G. E.; IOANNOU, P. A.; SCHEER, W. D.; HERRERA, R. J.; DEININGER, P.L. I. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 12288-12292, 1994.

BATZER, M.A.; ARCOT, S. S; PHINNEY, J. W.; ALEGRIA-HARTMAN, M., KASS D. H.; MILLIGAN S. M.; KIMPTON C.; GILL P.; HOCHMEISTER M.; IOANNOU, P. A.; HERRERA, R. J.; BOUDREAU, D. A.; SCHEER, W. D.; KEATS, B. J. B.; DEININGER P. L.; STONEKING, M. Genetic variation of recent Alu insertions in human populations. **Journal of molecular evolution**, v. 42, n. 1, p. 22-29. 1996.

BATZER, M.A.; DEININGER P.L. Alu repeats and human genomic diversity. **Nature Publishing Group**, v.3, p.370-379, maio. 2002.

BLOOM, M. V. Human DNA fingerprinting by polymerase chain reaction. In: BLOOM, M. V. **Tested studies for laboratory teaching**. C. A. Goldman, p. 1-13.1994.

CARROLL, M. L.; ROY-ENGEL, A. M; NGUYEN, S. V.; SALEM, A.-H.; VOGEL, E.; VINCENT, B.; MYERS, J.; AHMAD, Z.; NGUYEN, L., SAMMARCO, M., WATKINS, W. S.; HENKE, J.; MAKALOWSKI, W.; JORDE, L. B.; DEININGER P. L.; BATZER M. A. Large-scale analysis of the Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity. **Journal of molecular biology**, v. 311, n. 1, p. 17-40. 2001.

CORDAUX, R.; HEDGES D.J.; BATZER, M.A. Retrotransposition of alu elements: how many sources? **TRENDS in Genetics**, v.20, n.10, p.464-467, outubro. 2004.

CORDAUX, R.; SRIKANTA, D.; LEE, J.; STONEKING, M.; BATZER, M. A. **Genomics**, 90(1): 154-158, p. 1-12, julho. 2007.

COTRIM, N. H.; AURICCHIO, M. T. B. M.; VINCENTE, J. P.; OTTO, P. A.; MINGRONI-NETTO, R. C. Polymorphic Alu insertions in six Brazilian African-derived populations. **American Journal of Human Biology**, v. 16, n. 3, p. 264-277. 2004.

DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. Alu repeats and human disease. **Molecular genetics and metabolism**, v. 67, n. 3, p. 183-193. 1999.

- KHUSAINOVA, R.I.; AKHMETOVA, V. L.; KUTUEV, I. A.; SALIMOVA, A. Z.; KORSHUNOVA, TIU; LEBEDEV, IUB; KHUSNUTDINOVA, E. K. Genetic structure of people from the Volga–Ural and Central Asia from data of Alu-polymorphism. **Genetika**, v. 40, n. 4, p. 552-559. 2004.
- MARRERO, A. R.; BRAVI C.; STUART, S.; LONG, C. J.; LEITE, F. P. N; KOMMERS, T.; CARVALHO, C. M. B.; PENA, S. D. J.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, F. M.; BORTOLINI, M. C. Pre-and post-Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. **Human heredity**, v. 64, n. 3, p. 160-171. 2007.
- MENDES-JUNIOR, C. T.; SIMÕES, A. L. Alu insertions and ethnic composition in a Brazilian population sample. **International Journal of Human Genetics**, v. 1, n. 4, p. 249-254. 2001.
- NASIDZE, I.; RISCH, G. M.; ROBICHAUX, M.; SHERRY, S. T.; BATZER, M. A; STONEKING, M. Alu insertion polymorphisms and the genetic structure of human populations from the caucasus. **European journal of human genetics**, v. 9, n. 4, p. 267-272. 2001.
- NASIDZE, I.; RISCH, G.M.; ROBICHAUX, M.; SHERRY, S.T.; BATZER, M.A.; STONEKING, NOVICK, G. E.; GONZALEZ, T.; GARRISON, J.; NOVICK, C. C.; BATZER, M. A.; DEININGER, P. L.; HERRERA, R. J. The use of polymorphic Alu insertions in human DNA fingerprinting. In: **DNA Fingerprinting: State of the Science**. Birkhäuser Basel, p. 283-291. 1993.
- PRAK, E. T. L.; KAZAZIAN, H. H. Mobile elements and the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 2, p. 134-144. 2000.
- RAY, D. A.; WALKER, J. A.; HALL, A.; LLEWELLYN, B.; BALLANTYNE, J.; CHRISTIAN, A. T.; TURTELTAUB, K.; BATZER, A. M. Inference of human geographic origins using Alu insertion polymorphisms. **Forensic Science International**, v. 153, p. 117-124. 2005.
- ROY-ENGEL, A.M.; CARROLL, M. L.; VOGEL, E.; GARBER, R. K.; NGUYEN, S. V.; SALEM, A.-H., BATZER M. A.; DEININGER P. L. Alu insertion polymorphisms for the study of human genomic diversity. **Genetics**, v. 159, n. 1, p. 279-290. 2001.
- SOLOVIEVA, D. S.; BALANOVSKA, E. V.; KUZNETSOVA, M. A.; VASINSKAYA, O.A.; FROLOVA, S. A.; POCHESHKHOVA, E. A.; EVSEEVA, I. V.; BOLDYREVA, M. N.; BALANOVSKY, O. P. The Russian Gene Pool: the Gene Geography of Alu Insertions (ACE, APOA1, B65, PV92, TPA25). **Molecular Biology**, v.44, n.3, p.393-400. 2010.
- STONEKING, M.; FONTIUS, J. J.; CLIFFORD, S. L.; SOODYALL, H.; ARCOT, S. S.; SAHA, N.; JENKINS, T.; TAHIR, M. A.; DEININGER P. L.; BATZER M. A. Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa. **Genome research**, v. 7, n. 11, p. 1061-1071. 1997.

TELÓ, E. P. **Estimativa de mistura étnica avaliada por Mercadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) e Microsatélites (STRs)**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador.

TERREROS, M. C.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; NOVICK, G. E.; LUIS, J. R.; LACAU, H.; LOWERY, R. K.; REGUEIRO, M.; HERRERA, R. J. Insights on human evolution: an analysis of Alu insertion polymorphisms. **Journal of human genetics**, v. 54, n. 10, p. 603-611, 2009.

ULE, J. 5th Conference on Advances in Molecular Mechanisms Underlying Neurological Disorders: Alu elements: at the crossroads between disease and evolution. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. Pt 6, p. 1532. 2013.

VENNER, S.; FESCHOTTE, C.; BIÉMONT, C. Dynamics of transposable elements: towards a community ecology of the genome. **Trends in genetics**, v. 25, n. 7, p. 317-323. 2009.

XIAO, F.X., YANG, J.F., CASSIMAN, J.J., DECORTE, R. Diversity at eight polymorphic Alu insertion loci in Chinese populations shows evidence for European admixture in an ethnic minority population from northwest China. **Human biology**, v. 74, n. 4, p. 555-568. 2002.

Contato: barbara.cardanha@gmail.com e anapaula.costa@mackenzie.br