

OCUPAÇÃO INDÍGENA DA AMAZÔNIA COM BASE NO MTDNA. POPULAÇÕES CONTEMPORÂNEAS E ANCESTRAIS

*Sidney E. B. dos Santos**
*Ândrea K. C. Ribeiro-dos-Santos**
*Marco A. Zago***

SANTOS, S.E.B. DOS; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.K.C.; ZAGO, M.A. Ocupação indígena da Amazônia com base no mtDNA: populações contemporâneas e ancestrais. *Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia*, São Paulo, Suplemento 2: 167-180, 1997.

RESUMO: Diversas abordagens têm sido empregadas na tentativa de responder questões sobre a origem e a dispersão do homem nas Américas. Do ponto de vista da biologia, a investigação da variabilidade presente no DNA mitocondrial (mtDNA) tem se revelado um excelente instrumento para este fim. Os dados acumulados a partir da investigação de populações indígenas contemporâneas indicam: i) a existência de um estrangulamento populacional dramático durante a migração da Ásia para as Américas, ii) a presença quase que exclusiva de quatro grupos de haplótipos (haplogrupos A-D) cada um originado a partir de um único haplóide fundador, iii) a ocorrência de três ou quatro ondas principais de migração que teriam se iniciado entre 22 mil e 29 mil anos atrás. O número de haplótipos fundadores ocupa o ponto central das inferências acima citadas. Parte da diversidade presente entre os primeiros ameríndios pode ter sido perdida durante o processo de ocupação do continente pelos europeus a partir do início do século XVI ou pode estar sub-representada em função do número relativamente restrito de indivíduos investigados até o momento. Com o objetivo de solucionar parte dessas divergências nós investigamos a variabilidade do mtDNA de 139 indivíduos de oito tribos indígenas da Amazônia brasileira e de 18 fragmentos de ossos escavados em diferentes sítios arqueológicos da mesma região, com datação estimada entre 500-4.000 anos antes do presente. As análises revelaram que: i) todas as seqüências de mtDNA de indígenas contemporâneos enquadram-se em um dos haplogrupos (A-D) principais, entretanto, nossos dados são compatíveis com a existência de múltiplos haplótipos fundadores dentro de cada um dos haplogrupos, ii) 39% das seqüências ancestrais de mtDNA não pertencem a nenhum dos quatro haplogrupos. Esses resultados sugerem que as previsões sobre o tempo de chegada dos primeiros ameríndios ao continente podem ter sido superestimadas, e que a diversidade restrita das populações ameríndias atuais pode ser devida, em parte, à redução das populações indígenas durante a colonização européia.

UNITERMOS: Ocupação populacional — mtDNA na Arqueologia — Populações indígenas

(*) Laboratório de Genética Humana e Médica. Depto. de Patologia. Univ. Federal do Pará. Belém.

(**) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Introdução

Diversas abordagens têm sido empregadas na tentativa de responder questões sobre a origem e a dispersão do homem nas Américas. Do ponto de vista da biologia, as estimativas de diversidade genética de grupos indígenas que ainda hoje mantêm um elevado grau de isolamento reprodutivo em relação a outros étnicos são as mais empregadas para estes propósitos. As investigações têm se concentrado na análise da variabilidade proteica (Salzano e Callegari-Jacques, 1988), do DNA nuclear (Zago e cols., 1995) e, principalmente, do DNA mitocondrial (Wallace e cols., 1985; Ward e cols., 1991; Torroni e cols., 1992, 1993a, 1993b, 1994a, 1994b; Horai e cols., 1993). O DNA mitocondrial (mtDNA) é utilizado como instrumento de reconstrução da história evolutiva humana devido a sua herança materna, a ausência de recombinação e a elevada taxa de mutação (Giles e cols., 1980), o que permite ser muito informativo em relação a fenômenos evolucionários relativamente recentes do ponto de vista biológico, como é o caso do povoamento das Américas. Cada célula pode ter até 3 mil cópias idênticas do genoma mitocondrial (Shuster e cols., 1988) o que o torna muito acessível especialmente em estudos de populações que viveram no passado e tiveram parte de tecidos (ossos e peles, por exemplo) parcialmente preservados.

A variabilidade do mtDNA têm sido estudada em populações indígenas contemporâneas de forma independente tanto com base nos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism) como por seqüenciamento direto da alça-D (a região do mtDNA não codificante que acumula a maior taxa de mutação da molécula), com resultados nem sempre convergentes. Os dados obtidos por RFLP sugerem: a) a existência de um estrangulamento populacional considerado como "dramático" durante a migração da Ásia para as Américas; b) a existência quase que exclusiva de quatro grupos de haplótipos (haplogrupos A-D) cada um originado por acúmulo de mutações a partir de um único haplótipo fundador (Schurr e cols., 1990; Torroni e cols., 1992, 1993a, 1993b, 1994a), em discordância com Bailliet e cols. (1994) que vêem evidências de outros haplótipos fundadores nos mesmos dados; c) que os primeiros ameríndios chegaram ao continente entre 22 mil anos antes do presente (Torroni e cols., 1994a). Os dados obtidos por seqüenciamento direto da região da alça-D

sugerem: a) a existência de quatro (Horai e cols., 1993) ou mais (Ward e cols., 1991) grupos principais de haplótipos; b) quatro ondas distintas de migração para o Novo Mundo, a primeira delas entre 14 mil e 21 mil anos atrás (Horai e cols., 1993); c) que a variabilidade detectada não permite concordar com o postulado estrangulamento populacional durante a migração para o continente americano (Ward e cols., 1991; Horai e cols., 1993; Bailliet e cols., 1994; Schields e cols., 1992). Como o número de haplótipos fundadores entre os ameríndios ocupa o ponto central das inferências acima citadas, ocupa também o centro das divergências observadas.

Recentemente, o estudo de material biológico humano (DNA) conservado em ossos e peles tem fornecido informações importantes do ponto de vista arqueológico e antropológico (Pääbo, 1989; Hagelberg e cols., 1991; Merriwether e cols., 1994; handt e cols., 1994; Oota e cols., 1995). As investigações sobre a variabilidade do mtDNA de populações pré-históricas sugerem que os primeiros habitantes da Polinésia foram descendentes de povos da Melanésia (Hagelberg e Cleeg, 1993) e que os primeiros colonizadores da ilha de Páscoa se originaram da Polinésia (Hagelberg e cols., 1994). Stone e Stoneking (1993) estudaram amostras de 50 esqueletos pré-colombianos com datação estimada de 700 anos AP. Seus resultados demonstraram que 98% dos tipos de mtDNA encontrados pertencem a um dos quatro grupos principais de haplótipos (haplogrupos A-D) e que uma das amostras (2%) não tem tipo similar entre as populações ameríndias contemporâneas já estudadas. Afastada a hipótese de miscigenação étnica, este achado abre a perspectiva da existência de outros grupos de linhagens de mtDNA presentes entre os povos que iniciaram o processo de colonização das Américas.

O número reduzido de linhagens mitocondriais presentes entre os ameríndios contemporâneos pode ser produto estrangulamento populacional durante a migração da Ásia para as Américas (Wallace e Torroni, 1992), pode ser devido à drástica redução do número de indivíduos após o contato com os europeus a partir do século XVI (Ubelaker, 1992; Cunha, 1992) ou pode estar em função do número relativamente restrito de indivíduos investigados até o momento. Com o objetivo de solucionar parte destas questões, nós investigamos a variabilidade do mtDNA de 139 indivíduos de oito tribos da Amazônia brasileira e de 26 fragmentos de ossos escavados em diferentes sítios arqueológicos da

mesma região, com datação estimada entre 500 e 4.000 anos antes do presente.

Material e métodos

Amostras

A amostra de populações contemporâneas foi constituída de 139 indivíduos de oito tribos representando quatro grupos lingüísticos diferentes (Tabela 1), distribuídos em uma vasta área da Amazônia brasileira. Nós analisamos ainda o DNA de fragmentos ósseos de 26 esqueletos que constituem a coleção do Museu Paraense Emílio Goeldi, dos quais obtivemos sucesso em 18 amostras. Os esqueletos foram escavados em onze sítios arqueológicos (Tabela 2) da região amazônica, nos Estados do Pará, Amazonas e Amapá, com datação estimada entre 500 e 4.000 anos antes do presente.

RFLP

As análises por RFLP foram com base na amplificação de sete segmentos de DNA, correspondentes a 45% do genoma mitocondrial, seguido da digestão de cada segmento com dez enzimas de restrição. Esta abordagem, que permite identificar 143 sítios de restrição, foi utilizada em 79 amostras. Nas tribos Awa-Guaiá, Katuena e Poturujara (60 amostras) nós investigamos somente cinco sítios polimórficos que definem os quatro

principais haplogrupos (A-D) de ameríndios (Torroni e cols., 1993a).

Seqüenciamento

Nós seqüenciamos a alça-D do mtDNA de 92 indivíduos das tribos Yanomama (27), Waiãpi (21), Tiryó (02), Kayapó (13), Arara (09), Katuena, Poturujara (09), Awa-Guajá (02), e de 18 fragmentos de ossos de esqueletos pré-colombianos. A abordagem empregada permitiu a leitura de, pelo menos, 358 pares de bases entre as coordenadas 16.047 e 16.405 em todos os 110 mtDNAs investigados.

Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas empregando os métodos de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987) e de *Máxima Parcimônia* (Swofford, 1992).

Cuidados Especiais

Uma das maiores preocupações ao se trabalhar com DNA antigo é a possibilidade de contaminação das amostras com DNA contemporâneo. A contaminação da superfície externa dos ossos com DNA humano pode acontecer durante o processo de escavação, classificação ou armazenamento das amostras; contaminação no laboratório pode ocorrer durante a extração ou a ampliação do DNA. Os seguintes procedimentos foram empregados para

Tabela 1 — Tribos amazônicas investigadas, com o grupo lingüístico a que pertencem, a população estimada e as aldeias amostradas

Tribo	Família ou grupo lingüístico	População estimada	População amostrada Aldeias	Coordenadas	N
Arara	Karib	130	Laranjal e Iriri	53°11'W 3°58'S	13
Awá-Guajá	Tupi	230	Turiação	46°18'W 2°18'S	20
Katuena	Karib	136	Mapuera	58°00'0°40'S	20
Kayapó	Gê	2.100	Kubenkokre	53°24'W 8°43'S	13
Poturujara	Tupi	130	Cuminapanema	—	20
Tiryó	Karib	380	Sede	55°59'W 02°15'N	02
Waiãpi	Tupi	600	Mariry	52°33'W 1°06'S	21
Yanomama	Yanomama	10.000	Mucajaf	—	30

Tabela 2 — Descrição das amostras ancestrais estudadas no presente trabalho

Amostra	Sítio de Escavação	Tipo ¹	Datação AP ²
1	Sambaqui Pirabas (PA)	SB	4.000
2	Aterro dos Bichos (PA)	UA	1.900
3	Marajó (PA)	UA	1.900
7	Rio Pau D' Arco (PA)	UA	500
8	PA-AT-59	UA	600
9	Rio Tocantins (PA)	SB	1.000
10	Sambaqui do Furinho (PA)	SB	4.000
11	Sambaqui Pirabas (PA)	SB	4.000
12	Rio Maracá (AP)	UA	500
13	Sambaqui Cotias (PA)	SB	4.000
14	Sambaqui de Gastropode (PA)	SB	1.600
15	Sambaqui Marco, Maracanã (PA)	SB	4.000
21	Marajó (PA)	UA	1.900
22	Marajó (PA)	UA	1.900
23	Aterro dos Bichos (PA)	UA	1.900
24	Marajó (PA)	UA	1.900
28	Rio Urubu (AM)	UA	1.300
29	Rio Maracá (AP)	UA	500

¹ SB: sambaqui; UA: urna antropomórfica.

² AP: anos antes do presente.

evitar a contaminação, a maioria deles sugerido por Pääbo (1990):

a) o uso de luvas e máscaras cirúrgicas durante a manipulação das amostras e o uso de material de laboratório exclusivo para o processamento deste tipo de amostra;

b) a superfície externa dos ossos foi irradiada com luz ultra-violeta e o material utilizado para a extração do DNA foi obtido do interior da medula óssea através de um pequeno orifício feito com uma broca;

c) utilizou-se um método de extração do DNA com o número de passos reduzido;

d) a extração do DNA foi realizada em duplicata para cada amostra; para cada procedimento foi realizada uma *extração negativa* usando todos os reagentes com exceção da medula óssea; essa *extração negativa* foi utilizada durante o processo de amplificação do DNA como um controle negativo;

e) a amplificação do DNA de cada amostra foi realizada em duplicata; de cada segmento ampli-

ficado, o seqüenciamento foi realizado nas duas cadeias e os resultados foram coincidentes;

f) resultados do seqüenciamento do mtDNA dos quatro pesquisadores que manipularam as amostras foram diferentes dos 13 haplótipos obtidos das amostras antigas;

g) nosso laboratório está envolvido na investigação do mtDNA de populações negras e ameríndias; somente três dos 13 haplótipos de populações pré-históricas também foram observados entre os 41 haplótipos de populações ameríndias contemporâneas investigadas em nosso laboratório e nenhum deles é coincidente com os haplótipos obtidos em populações negras.

Resultados

Os resultados obtidos da análise conjunta RFLP e Seqüenciamento entre 92 indivíduos de oito tri-

Number of Subjects	D-loop sequence data				RFLP data	
	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	11	1111111111R
	6666666666	6666666666	6666666666	6666666666	66	500003333665V
	0001111111	1112222222	2222222222	2233333333	33	6133460223025d
	89914444667	7891122334	4556677799	9901112245	56	6799346562541e
	4351023589	9925739991	9796714702	5891295743	72	36487959251171
	ab					
	Anderson	GTCCTCTACC	CTCATCTCCA	TCCCCTGACC	CTATAGTCCC	TT 01001011011000
2	S01/R01	..T.....T....T..A....	.C 11101011011010
1	S01/R02	..T.....T....T..A....	.C 11000011011010
13	S01/R03	..T.....T....T..A....	.C 11001011011010
2	S02/RXX	..T.....T....	TT.T....A....	.C 11777771777710
1	S03/R03	..T.....T....T..A....	.C 11001011011010
1	S04/RXX	..T.....T....T..A....	.C 11777771777700
4	S01/R04	..T.....T....T..A....	.C 11001011011000
1	S05/R05	A..T.....	..G.T....T..A....	.C 11011011011000
3	S06/RXX	..T.....T.A..	..T....T.A....	.C 11777771777700
1	S07/RXX	..T.....T.A..	..T....T.A....	.C 11777771777700
3	S08/R03	..T.....T....T..A....	.C 11001011011000
1	S09/R06*	..T.....T....T..A....	.C 01001111011000
1	S01/R07*	..T.....T....T..A....	.C 01001011011000
1	S10/R08*AT....C..TC..T	.C 11001111010000
2	S11/RXXT..T.T....C....C....	.C 00777771777700
1	S12/R09T....	T.....T....C....C....	.C 00111011011000
1	S13/R09T....	T.....T....T....C...C....	.C 00111011011000
2	S14/RXXT....	T.....T....T....C...C....	.C 00777771777710
1	S15/R10	..T....	TC...T....T....C...C....	.C 00101011011010
1	S16/R11T....	TC...T....T....C...C....	.C 00011011011010
2	S16/R10T....	TC...T....T....C...C....	.C 00101011011010
1	SXX/R19T....	TC...T....T....C...C....	.C 00111011011010
1	S17/R12*C..C....C..C....C...CT..C...CT..	.C 01001001011011
1	S18/R13*C..C....C..C....T...C...CT..C...CT..	.C 01001011011011
2	S19/R13C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
1	S20/R13C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
1	S21/R13C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
5	S22/R13C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
1	S23/R12T...C..C....T...C..C....G...C....G...C....	.C 01001001011011
1	S24/R12C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001001011011
1	S25/R13C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
2	S26/R13C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
1	S27/R14C..C..GC..C..GG...C....G...C....	.C 01001011011111
1	S28/R13C..C....C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
1	S29/R13A..C..C....A..C..C....G...C....G...C....	.C 01001011011011
1	S30/R13T...C..C..A..T...C..C..A..G...T..G...T..	.C 01001011011011
1	S31/R13C..C....C..C....G...T..G...T..	.C 01001011011011
5	S32/R15T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111010111000
1	S33/R15C....T....A..T..C...CT..	.C 01111010111000
2	S34/R15T....T....A..T..C...CT..	.C 01111010111000
2	S35/R15T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111010111000
3	S35/R16T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111010111010
3	S35/R17T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111010101010
1	S36/RXXT....T....C...CT..C...CT..	.C 01777770777710
3	S37/RXXT....T....C...CT..C...CT..	.C 01777770777710
1	S38/R18T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111100111010
2	S39/R17T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111010101010
1	S39/R16T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111010111010
1	S40/R17*T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111010101010
1	S41/RXXA..T....A..T....C...CT..C...CT..	.C 77777777777777
1	SXX/R20T....T....C...CT..C...CT..	.C 01111000101010

Fig. 1 — Resultados obtidos para a análise conjunta RFLP e seqüenciamento entre 92 índios de oito tribos da Amazônia. Os haplótipos definidos por seqüenciamento direto da alça-D foram numerados de S01 a S41, os haplótipos definidos por RFLP foram numerados de R01 a R20.

bos da Amazônia são apresentados na Figura 1. Os haplótipos definidos com base na análise por RFLP foram numerados de R01 a R20, os haplótipos definidos por seqüenciamento direto da alça-D foram numerados de S01 a S41. Os haplótipos definidos com base nas duas abordagens foram identificados pela combinação dos dois sistemas (S07/R01, por exemplo).

Análise por RFLP

Entre os 79 indígenas cujo mtDNA foi amplificado e digerido com 10 enzimas de restrição foram reconhecidos 20 haplótipos diferentes definidos por 18 sítios polimórficos. Desses, três sítios são raros, limitados a uma única tribo, mas é pouco provável que representem polimorfismos privados destas desde que eles estão representados em mais de um haplogrupo:

i) a mutação que cria o sítio Hae III no np 10.694 foi detectada em três indivíduos da tribo Yanomama em associação com diferentes haplótipos dos grupos A, C e E;

ii) a mutação que elimina o sítio Dde I no np 13.065, também limitada a tribo Yanomama está associada com os haplogrupos C e B;

iii) a mutação que elimina o sítio Rsa I no np 16.049 está ligada a um haplogrupo A mas foi previamente descrita em associação com seis haplótipos das tribos Makiritare, Ticuna, Macushi e Marubo todos eles pertencentes ao haplogrupo C (Torroni e cols., 1993a).

Dois haplótipos (R06 e R07) das tribos Yanomama e Arara, respectivamente, têm mutações que não permitem associá-los a qualquer um dos haplogrupos (A-D) previamente descritos em populações ameríndias.

Nós estendemos a análise a 60 amostras de outras tribos na qual somente os cinco sítios polimórficos que definem os quatro principais haplogrupos foram analisados. No total de 139 seqüência de mtDNA analisadas, 41 (29%) pertencem ao haplogrupo A, 39 (28%) ao haplogrupo B, 38 (27%) ao haplogrupo C, 19 (14%) ao haplogrupo D e 2 (<2%) não podem ser enquadradas em nenhum desses haplogrupos.

Análise por seqüenciamento

Entre os 92 indivíduos analisados por seqüenciamento direto da região da alça-D, foram observados 41 diferentes haplótipos definidos por

42 pontos polimórficos. A maioria dos haplótipos (27) está representada em apenas um indivíduo, 10 estão presentes em mais de um indivíduo mas restritos a uma única tribo e somente 4 haplótipos são compartilhados por duas ou mais tribos. Um desses haplótipos (S40), observado em um indivíduo da tribo Yanomama, tem mutações que não permitem associá-lo a qualquer um dos quatro *clusters* (I-IV) previamente descritos em tribos ameríndias (Horai e cols., 1993).

Comparação de RFLP e Seqüenciamento.

A análise conjunta dos dados obtidos por RFLP e seqüenciamento do mtDNA demonstram 93% de concordância entre a classificação dos quatro haplogrupos (A-D) definidos por Torroni e cols. (1993a) e a classificação dos quatro *clusters* (I-IV) definidos por Horai e cols. (1993). Desta forma iremos nos referir aos haplogrupos (A-D) e aos *clusters* (I-IV) como haplogrupos A, B, C e D.

Haplótipos atípicos, tentativamente classificados no grupo E, foram definidos como qualquer haplótipo que não pode ser enquadrado em qualquer um dos grupos (A-D) tanto na análise por RFLP, como na análise por seqüenciamento, ou pela combinação de ambas. Na amostra investigada seis seqüências de mtDNA (7% do total da amostra ou 12% de todos os haplótipos) têm discrepâncias entre os dados obtidos por RFLP e por seqüenciamento:

i) dois haplótipos do grupo E na análise por RFLP foram classificados no grupo A por seqüenciamento;

ii) um haplótipo do grupo E na análise por seqüenciamento tem a mutação característica do haplogrupo A na análise por RFLP;

iii) dois haplótipos que têm mutações compostas dos grupos B e C por seqüenciamento foram classificados no grupo B por RFLP;

iv) um haplótipo tem as mutações características do grupo B na análise por RFLP e do grupo A quando analisado por seqüenciamento.

Em todos os seis casos a presença de mutações comumente detectadas entre ameríndios afasta a possibilidade de que estes haplótipos sejam decorrentes do processo de miscigenação racial nas populações ameríndias investigadas.

Diversidade nucleotídica

As médias das diferenças entre pares de seqüências de um mesmo haplogrupo foram calculadas

Tabela 3 — Porcentagem de divergências entre pares de seqüências de um mesmo haplogrupo de mtDNA analisadas por RFLP e por seqüenciamento

Cluster/ Haplogrupo	Divergências entre seqüências %			
	RFLP*	RFLP**	SEQ**	SEQ***
A	0,075	0,187	0,56	0,31
B	0,034	0,062	0,84	0,90
C	0,096	0,282	0,49	0,75
D	0,053	0,227	0,94	0,82

* Dados de Torroni et al. 1994.

** Dados reunidos: Horai e cols., 1993; Ward e cols., 1991; Santos e cols., 1996.

*** Dados de Santos e cols., 1996.

tanto para os dados de RFLP como para os de seqüenciamento. Os valores estimados junto com os de outras tribos ameríndias, previamente publicados, são apresentados na Tabela 3. Quando analisados por RFLP os indivíduos do haplogrupo B têm a menor diversidade (0,062%) e os do haplogrupo C têm o valor mais elevado (0,282%). Quando analisados por seqüenciamento os mesmos indivíduos têm valores relativos inversos, isto é, a diversidade do haplogrupo B (0,90%) é a mais elevada e a do haplogrupo C (0,75%) é uma das menores.

Análises filogenéticas

A análise conjunta dos dados obtidos por RFLP e seqüenciamento revelou a existência de 51 haplótipos compostos dentro das tribos amazônicas investigadas. As relações filogenéticas entre estes haplótipos foram inferidas usando os métodos de *máxima parcimônia* e de *neighbor-joining*. As árvores obtidas em ambas as abordagens são muito semelhantes (Figura 2 apresenta a árvore gerada por *neighbor joining*). A característica mais marcante dessas árvores é que, em ambos os casos, os haplótipos são distribuídos em quatro grupos principais correspondente àqueles previamente descritos em populações ameríndias (Torroni e cols. 1993a, Horai e cols. 1993).

Análise do DNA antigo

Nós obtivemos sucesso na amplificação e seqüenciamento do mtDNA de 18 em 26 fragmentos de ossos escavados em diferentes sítios arqueológicos da Amazônia brasileira. Os resultados

obtidos são apresentados na Figura 4. Nas 18 amostras foram identificados 13 haplótipos diferentes definidos por 26 pontos polimórficos. Desses, 10 haplótipos são específicos de um único extrato de DNA, enquanto que três são compartilhados por duas ou mais amostras.

Quando comparamos as diferentes seqüências de mtDNA nós observamos que sete haplótipos (M01 a M07: 11 amostras) representam um dos quatro haplogrupos previamente descritos em populações ameríndias contemporâneas. Seis haplótipos (M08 a M13: 7 amostras) que não apresentam nenhuma das mutações características dos haplogrupos A-D, embora apresentem modificações comumente observadas em populações asiáticas, foram tentativamente classificadas nos grupos E e F.

Discussão

Na última década foram publicados diversos trabalhos sobre a variabilidade do mtDNA em populações ameríndias. Entretanto, a interpretação dos dados obtidos por seqüenciamento da alça-D e por RFLP nem sempre são convergentes. Os resultados obtidos com os dois métodos concordam a respeito da existência de quatro grupos principais de haplótipos entre os ameríndios contemporâneos, mas divergem em relação ao número de haplótipos fundadores dentro de cada haplogrupo. Os dados de seqüenciamento da alça-D revelam que a diversidade nucleotídica observada não suporta o postulado efeito de estrangulamento populacional

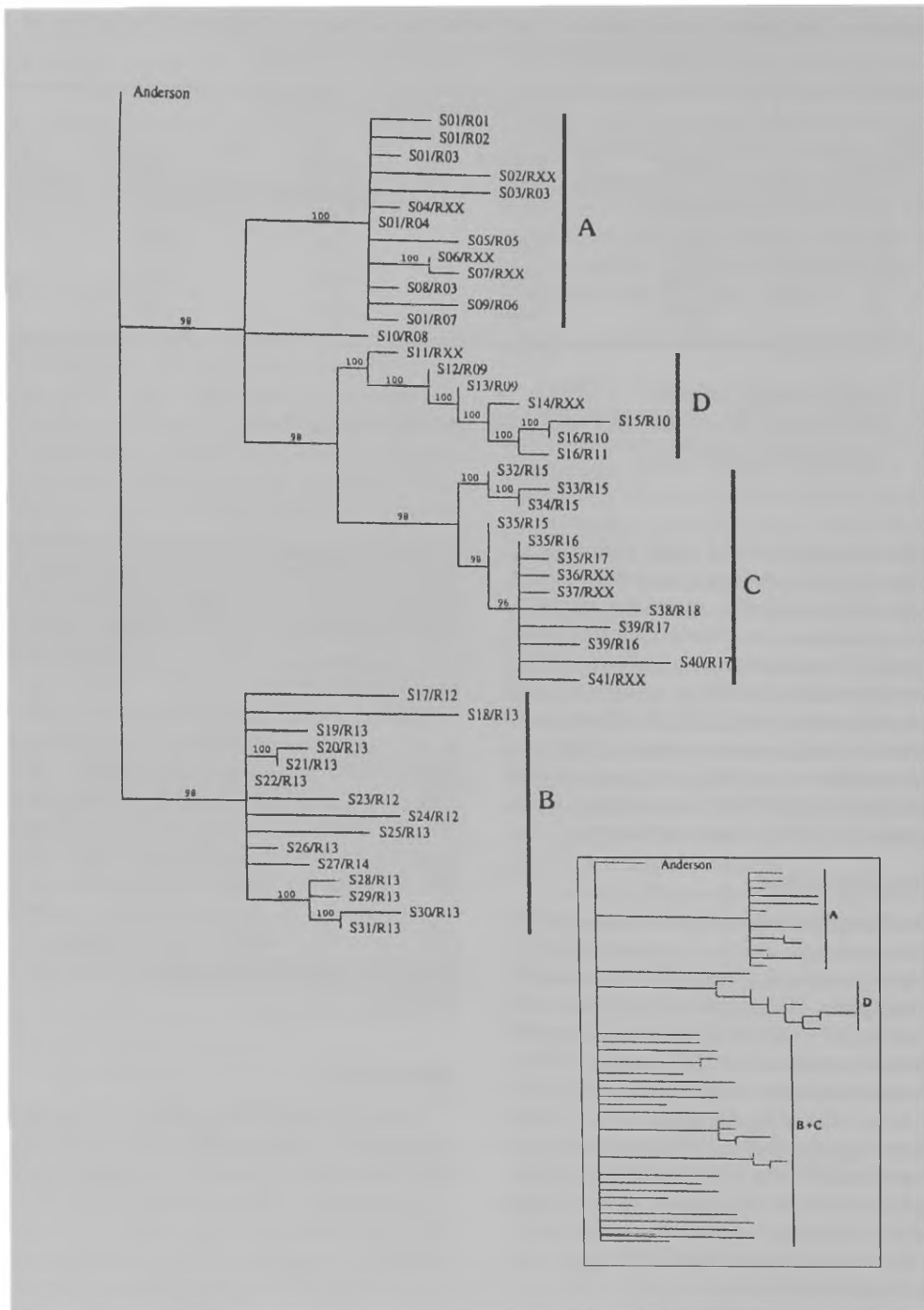


Fig. 2 — Na figura maior observamos uma árvore filogenética obtida através do método de neighbor-joining. Na figura menor observamos uma árvore filogenética obtida pelo método de máxima parcimônia.

durante a migração da Ásia para as Américas (Horai e cols., 1993; Ward e cols., 1991). Os resultados da análise por RFLP sugerem que toda a diversidade existente entre os mtDNAs de ameríndios ocorreu *in situ* nas Américas a partir de um único haplótipo fundador para cada um dos haplogrupos (Torroni e cols., 1993). Esse princípio rege o cálculo das médias de diversidade nucleotídica, que servem de base para as estimativas sobre o tempo de chegada dos primeiros ameríndios ao continente. A existência de haplótipos fundadores múltiplos dentro de cada um dos haplogrupos implica que o cálculo de divergência e, conseqüentemente, as estimativas sobre o início da colonização das Américas podem estar superestimados.

Os resultados da análise conjunta RFLP e seqüenciamento nas tribos amazônicas concordam com a prevalência de quatro haplogrupos principais entre os ameríndios contemporâneos e são compatíveis com múltiplos fundadores em cada um dos haplogrupos. Três linhas de evidências suportam estas conclusões:

- i) a elevada prevalência de haplótipos atípicos;
- ii) a presença de múltiplos sítios polimórficos compartilhados por diferentes haplogrupos;
- iii) a diferença relativa de diversidade nucleotídica com base em RFLP e seqüenciamento dentro de diferentes haplogrupos.

Haplótipos atípicos nas populações ameríndias são freqüentemente atribuídos à história de mistura racial. Haplótipos atípicos também foram descritos em populações ameríndias pré-colombianas (Stone e Stoneking, 1993). Os dados de RFLP de 591 ameríndios mostram que aproximadamente 5% desta amostra é constituída de haplótipos atípicos (Bailliet e cols., 1994). Os dados de seqüenciamento demonstram a existência de 3% a 11% de haplótipos atípicos (Horai e cols., 1993; Ward e cols., 1991). A análise conjunta RFLP e seqüenciamento permitiu-nos interpretar e quantificar estas discrepâncias. Por exemplo, a análise isolada por RFLP teria demonstrado que dois indivíduos possuíam haplótipos atípicos, enquanto que a de seqüenciamento teria demonstrado apenas um; em nenhum dos casos se eliminaria a hipótese de mistura racial para a origem desses haplótipos. A análise conjunta demonstrou que 12% de todos os haplótipos observados são atípicos e não podem ter a origem decorrente do processo de miscigenação racial nessas tribos. Haplótipos atípicos como aqui definidos podem ter surgido tanto por mutação reversa que elimina

uma (RFLP) ou mais (seqüenciamento) características de um determinado haplogrupo ou por mutações paralelas, que ocorrem de forma independente repetidas vezes, podendo gerar haplótipos compostos. As mutações que deram origem aos haplótipos atípicos são autóctones ou tiveram sua origem anterior ao processo de migração para as Américas? É mais provável que ambos os eventos tenham ocorrido. Eliminada a hipótese de miscigenação, é razoável assumir que quanto maior a proposição de haplótipos atípicos, maior a probabilidade que parte dessas mutações tenham origem asiática.

A análise dos sítios de restrição polimórficos detectados entre as tribos amazônicas revelaram três mutações (+Hae III np 10.694; -Dde np 13.065; -Rsa I np 16.049) que embora restritas a uma única tribo não podem ser consideradas como polimorfismos privados dessas tribos porque elas estão distribuídas em diferentes haplogrupos. Segundo Wallace e Torroni (1985) toda a diversidade observada em cada um dos haplogrupos surgiu a partir de um único haplótipo fundador. Seguindo este princípio a presença da mesma mutação em seqüências mitocondriais de diferentes haplogrupos somente pode ser explicada pela ocorrência de mutações paralelas. Nós investigamos o número de mutações que são encontradas em mais de um haplogrupo e comparamos a freqüência em relação ao número total de mutações observadas. Para RFLP nossos dados junto com os de Torroni e cols. (1992, 1993a, 1994) revelam 133 sítios polimórficos dos quais 21 (16%) estão presentes em dois ou três haplogrupos. O seqüenciamento da região da alça-D em ameríndios (Horai e cols., 1993; Kolman e cols., 1995; Santos e cols., 1994; Ward e cols., 1991; presente estudo) identificou 100 pontos polimórficos dos quais 26 (26%) estão presentes de dois a quatro haplogrupos. A porcentagem de mutações idênticas ocorrendo repetidas vezes parece ser muito elevada para aceitar a hipótese que elas acumularam-se de forma recorrente após o povoamento das Américas. É razoável supor que parte destas mutações já estava presente entre os primeiros colonizadores.

As estimativas de divergência baseadas em RFLP e seqüenciamento mostram resultados conflitantes, especialmente com respeito aos haplogrupos B e C. Dados publicados por Torroni e cols. (1994b), baseados em RFLP, demonstram que o haplogrupo C tem a média de divergência

mais elevada (0,096%) enquanto que o haplogrupo B tem a menor média (0,034%). O seqüenciamento da região da alça-D mostra o oposto, isto é, o haplogrupo C tem a menor estimativa (0,049%) enquanto que o haplogrupo B tem uma das maiores (0,84%). As discrepâncias persistem nas tribos amazônicas em que RFLP e seqüenciamento foram aplicados nas mesmas amostras: indivíduos do grupo B mostram a diversidade mais baixa por RFLP (0,062%) e a mais alta por seqüenciamento (0,90%), enquanto que os do grupo C têm a diversidade mais elevada por RFLP (0,28%) e uma das menores por seqüenciamento (0,075%). Se cada haplogrupo tivesse somente um haplótipo fundador, os quatro haplogrupos deveriam manter a mesma ordem de valores relativos de diversidade nucleotídica, tanto quando medida na região da alça-D (seqüenciamento) ou no genoma mitocondrial inteiro (RFLP). Uma maneira de explicar estas diferenças é supor que cada haplogrupo continha originalmente uma população heterogênea de haplótipos fundadores ao invés de um único haplótipo.

Resumindo, nossos dados demonstram que todos os haplótipos de mtDNA de ameríndios contemporâneos agrupam-se em quatro haplogrupos (A-D) principais. A prevalência elevada de haplótipos atípicos; a discordância dos valores relativos de diversidade nucleotídica estimada com base em RFLP e seqüenciamento dentro de cada haplogrupo; e a elevada proporção de mutações que são compartilhadas por diferentes haplogrupos, sugerem que a diversidade dentro de cada haplogrupo surgiu à partir de múltiplos haplótipos fundadores. Este resultado é importante porque pode significar que as estimativas do tempo de chegada dos primeiros ameríndios, com base na variabilidade do mtDNA, podem estar superestimadas.

Nós obtivemos sucesso no seqüenciamento da alça-D do mtDNA de 18 fragmentos de ossos de nativos da Amazônia. Embora a amostra seja relativamente pequena observou-se ampla diversidade de haplótipos: além dos quatro haplogrupos previamente descritos por Horai e cols. (1993), correspondente a 61% da amostra, existem 8 amostras que não se enquadram em nenhum desses haplogrupos e foram tentativamente classificadas nos grupos E e F. O grupo E é mais homogêneo que o

grupo F e seus haplótipos são similares a quatro haplótipos descritos na tribo Nuu-Chah-Nulth — USA (Ward e cols., 1991), correspondendo a 10% da amostra total.

A possibilidade de que os haplótipos dos grupos E e F sejam de esqueletos de outros grupos raciais é afastada porque: o padrão de enterramento na posição fetal em urnas antropomórficas ou sambaquis é tipicamente indígena; todos os haplótipos apresentam pelo menos uma mutação característica de populações asiáticas. A possibilidade de contaminação com DNA exógeno durante o processamento laboratorial também pode ser afastada: além de todas as precauções tomadas, é significativo que dos treze haplótipos observados todos são diferentes dos pesquisadores que manipularam de alguma forma as amostras, e somente três (M01-M03) são idênticas a amostras previamente seqüenciadas no nosso laboratório.

Nós analisamos as relações filogenéticas entre os haplótipos pré-colombianos (13) e de populações ameríndias contemporâneas (103) representativos das três Américas (Ward e cols., 1991; Horai e cols., 1993; presente estudo). A árvore das relações filogenéticas (Fig. 3) demonstra a formação de um quinto grupo (grupo E) formado por haplótipos pré-colombianos (M07-M11), por um haplótipo da tribo Yanomama (presente estudo), um haplótipo de indígenas chilenos (Horai e cols., 1993) e por três haplótipos da tribo Nuu-Chah-Nulth (Ward e cols., 1991), todos considerados como atípicos.

Se a nossa amostra é representativa da América pré-colombiana a proporção de haplótipos que não pertencem a nenhum dos quatro haplogrupos (A-D) é muito maior do que a das populações indígenas contemporâneas. Esta evidência é suportada pelos resultados obtidos com indígenas atuais da Amazônia que demonstram que em 12% de todos os haplótipos, quando analisados por RFLP e seqüenciamento conjuntamente, falta pelo menos uma das mutações características dos quatro haplogrupos. Isto permite sugerir que a redução da variabilidade genética observada nas populações indígenas atuais pode também ser atribuída ao efeito da depopulação iniciada com a ocupação européia a partir do século XVI que reduziu em mais de 95% o tamanho da população original (Dobyns, 1966).

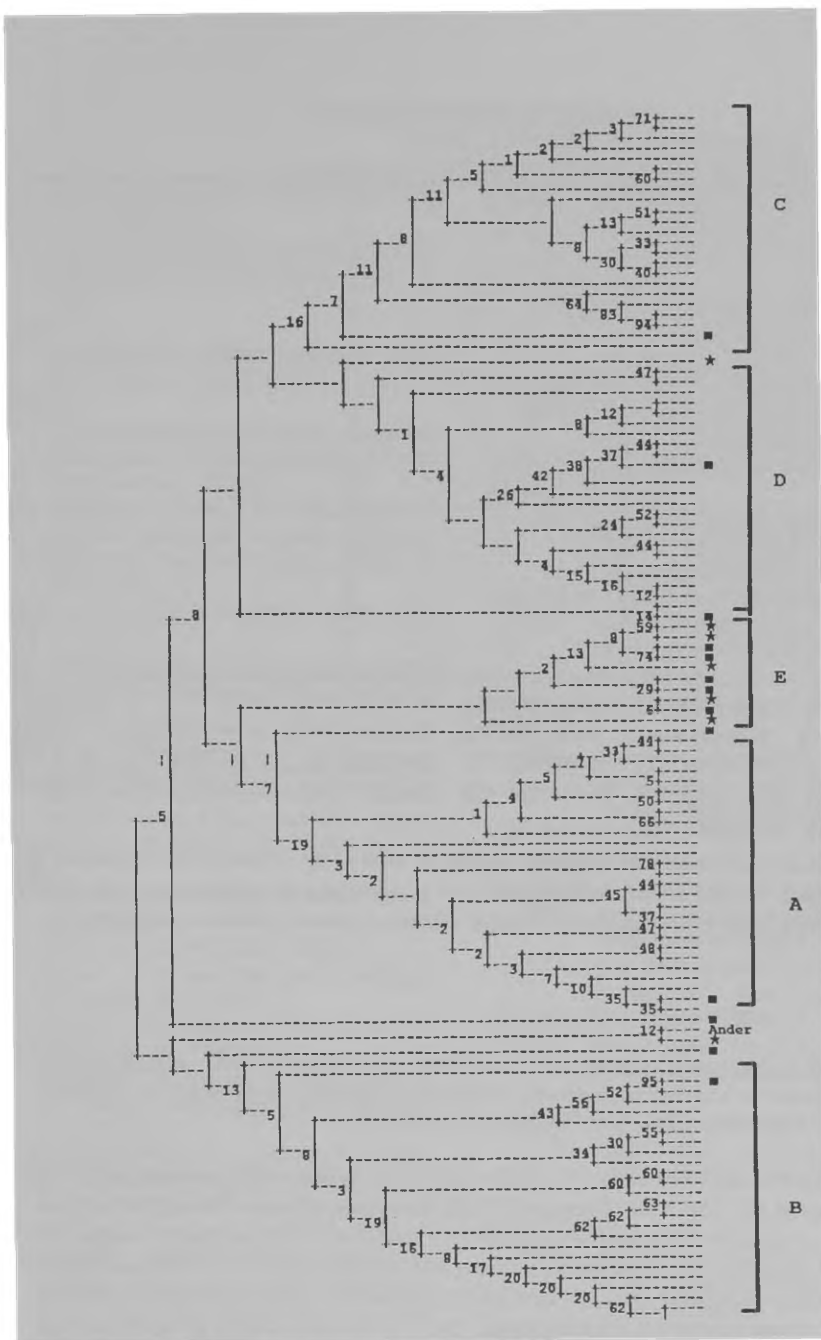


Fig. 3—Árvore filogenética reunindo 13 haplótipos Pré-Colombianos (■) e 103 haplótipos de populações Ameríndias contemporâneas. Os haplótipos marcados com (★) representam haplótipos que foram descritos como discrepantes, não pertencendo a nenhum dos haplogrupos principais (I - IV). Todos os haplótipos do mtDNA foram comparados à seqüência padrão humana (Anderson et al., 1981). A partir dos dados originais foi obtida uma árvore pelo método de Neighbor-Joining. Os números apresentados em cada nó corresponde aos valores de bootstrap (em %), obtidos para cada agrupamento (baseado em 500 replicações).

Haplótipo	11111111112222222											Haplogrupo															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	CTCCAA--TCTCTCCCCCTTAGTCCT																										
M01																											
M02																											
M03																											
M03																											
M03																											
M03																											
M04																											
M05																											
M05																											
M06																											
M07																											
M08																											
M09																											
M10																											
M11																											
M11																											
M12																											
M13																											

01-16.111(C→T), 02-16.124(T→C), 03-16.142(C→T), 04-16.179(C→T), 05-16.182(A→-), 06-16.183(A→-),
 07-16.183.3(-→C), 08-16.183.4(-→C), 09-16.189(T→C), 10-16.192(C→T), 11-16.217(T→C), 12-16.223(C→T),
 13-16.249(T→C), 14-16.278(C→T), 15-16.290(C→T), 16-16.292(C→T), 17-16.294(C→T), 18-16.295(C→T),
 19-16.298(T→C), 20-16.311(T→C), 21-16.312(A→G), 22-16.319(G→A), 23-16.325(T→C), 24-16.327(C→T),
 25-16.344(C→T), 26-16.362(T→C)

Fig. 4 — Sequências nucleotídicas dentro da região da alça-D de 18 amostras ancestrais de mtDNAs (Ribeiro-dos-Santos e cols., 1996), comparadas com a sequência de Anderson e cols. (1981). Os 26 pontos polimórficos estão especificados no rodapé. Numeral romano indica os haplogrupos.

SANTOS, S.E.B. DOS; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.K.C.; ZAGO, M.A. mtDNA and the indigenous occupation of the Amazon: contemporary and ancient populations. *Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia*, São Paulo, Suplemento 2: 167-180, 1997.

ABSTRACT: Our main goal in this article is to answer some questions about the origins and the dispersion of population in the American continent. Through the analysis of the variability of the mitochondrial DNA (mtDNA) in contemporary indigenous population from the Amazon we've been able to conclude that 1) there has been a dramatical population reduction during the migration from Asia to America; 2) there are only, almost exclusively, four haplotypes that originate respectively from one founder haplotype; 3) there has been three or four main migrational waves between 22 and 29 thousand years B.P. To better define these conclusions we analysed also archaeological bones from the Amazon area.

UNITERMS: Population occupation — Archaeology and mtDNA — Indigenous populations.

SANTOS, S.E.B. DOS; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.K.C.; ZAGO, M.A. Ocupação indígena da Amazônia com base no mtDNA: populações contemporâneas e ancestrais. *Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia*, São Paulo, Suplemento 2: 167-180, 1997.

Referências bibliográficas

- BAILLIET, G.; ROTHHAMMER, F.; CARNESE, F.R.; BRAVI, C.M.; BIANCHI, N.O.
1994 Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian population. *Am. J. Hum. Genet.*, 54: 27-33.
- CUNHA, M.C.
1992 Introdução a uma história indígena. In: *História dos Índios do Brasil*. 1ª ed. v. I. 611 p.
- DOBYNS, H.F.
1966 Estimating aboriginal population: an appraisal of techniques with a new hemispheric estimate. *Curr. Anthropol.* 7: 395-416.
- GILES, R.E.; BLANC, H.; CANN, H.M.; WALLACE, D.C.
1980 Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6715-6719.
- HAGELBERG, E.; BELL, L.S.; ALLEN, T.; BOYDE, A.; JONES, S.J.; CLEGG, J.B.
1991 Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 333: 399-407.
- HAGELBERG, E.; CLEGG, J.B.
1993 Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proc. R. Soc. Lond.*, 252: 163-170.
- HAGELBERG, E.; QUEVEDO, S.; TURBON, D.; CLEGG, J.B.
1996 DNA from ancient Easter islanders. *Nature*, 369: 25-26.
- HANDT, O.; HÖSS, M.; KRINGS, M.; PÄÄBO, S.
1994 Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*, 50: 524-529.
- HORAI, S.; KONDO, R.; NAKAGAWA-HATTORI, Y.; HAYASHI, S.; SONODA, S.; TAJIMA K.
1993 Peopling of the America founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 23-47.
- KOLMAN, C.J.; BERMINGHAM, E.; COOKE, R.; WARD, R.H.; ARAIS, T.D.; GUIONNEAU-SINCLAIR, F.
1995 Reduced mtDNA diversity in Ngöbé amerinds of Panama. *Genetics*, 140: 275-238.
- MERRIWETHER, D.A.; ROTHHAMMER, F.; FERREL, E.
1994 Genetic variation in the World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia*, 50: 592-601.
- OTA, H.; SAITOU, N.; MATSUSHITA, T.; UEDA, S.
1995 A genetic study of 2,000-year-old human remain from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Anthropol.*, 98: 133-145.
- PÄÄBO, S.
1989 Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1939-1943.
1990 *Amplifying Ancient DNA PCR Protocols: A guide to methods and Applications*. Academic Press, Inc.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; SANTOS, S.E.B.; MACHADO, A.L.; GUAPINDAIA, V.; ZAGO, M.A.
1996 *Am. J. Phys. Anthropol.* 101: 29-37.
- SAITOU, N.; NEI, M.
1987 The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- SALZANO, F.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.
1988 *South American Indians. A case study in evolution*. Clarendon Press, Oxford.
- SANTOS, S.E.B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS; MEYER, D.; ZAGO, M.A.
1996 Multiple founder haplotypes of mitochondrial DNA in Amerindians revealed by RFLP and sequencing. *Ann. Hum. Genet.*, 60: 305-319.
- SANTOS, M.; WARD, R.; BARRANTES, R.
1994 mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum. Biol.*, 66: 963-977.
- SCHIELDS, G.F.; HECKER, K.; VOEVODA, M.I.; REED, J.K.
1992 Absence of the Asian-specific region V mitochondrial marker in native Beringians. *Am. J. Hum. Genet.*, 50: 578-765.
- SCHURR, T.C.; BALLINGER, S.W.; GAN, Y.-Y.; HODGE, J.A.; MERRIWETHER, D.A.; LAWRENCE, D.N.; KNOWLER, W.C.; WEISS, K.M.; WALLACE, D.C.
1990 Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am. J. Hum. Genet.*, 46: 613-623.
- SHUSTER, R.C.; RUBENSTEIN, A.J.; WALLACE, D.C.
1988 Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155: 1360-1365.
- STONE, A.C.; STONEKING, M.
1993 Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 92: 463-471.
- SWOFFORD, D.
1992 *Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP) version 3.0s*. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- TORRONI, A.; CHEN, Y.-S.; SEMINO, O.; SANTACHIARA-BENEGERETTI, A.S.; SCOTT, C.R.; LOTT, M.T.; WINTER, M.; WALLACE, D.C.
1994a mtDNA and Y chromosome polymorphism in four native American populations from southern Mexico. *Am. J. Hum. Genetic.*, 54: 303-318.
- TORRONI, A.; NEEL, J.V.; BARRANTES, R.; SCHURR, T.G.; WALLACE, D.C.
1994b Mitochondrial DNA "clock" for the Amerindians and its implications for timing their entry in North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1158-1162.

SANTOS, S.E.B. DOS; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â.K.C.; ZAGO, M.A. Ocupação indígena da Amazônia com base no mtDNA: populações contemporâneas e ancestrais. *Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia*, São Paulo, Suplemento 2: 167-180, 1997.

TORRONI, A.; SCHURR, T.G.; CABELL, M.F.; BROWN, M.D.; NEEL, J.V.; LARSEN, M.; SMITH, D.G.; VULLO, C.M.; 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.; SCHURR, T.G.; YANG, C.C.; SZATMARY, E.J.E.; WILLIAMS, R.C.; SCHANFIELD, M.S.; TROUP, G.A.; KNOWLER, W.C.; LAWRENCE, D.N.; WEISS, K.M.; WALLACE, D.C.

1992 Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerindian and Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*, 130: 153-162.

TORRONI, A.; SUKERNIK, R.I.; SCHUR, T.G.; STARIKOVSKAYA, Y.B.; CABELL, M.F.; CRAWFORD, M.H.; COMUZZIE, A.G.; WALLACE, D.C.

1993b mtDNA variation of aboriginal siberians reveal

discint genetic affinities with native Americans. *Am. J. Hum. Genetic.*, 53: 591-608.

UBELAKER, DH.

1992 Patterns of demographic change in the Americas. *Hum. Biol.* 64: 361-379.

WALLACE, D.C.; GARRISON, K.; KNOWLER, W.C.

1985 Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68: 149-155.

WARD, R.H.; FRAZIER, B.L.; DEW-JAGER K.; PÄÄBO, S.

1991 Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8720-8724.

ZAGO, M.A.; SILVA JR., W.A.; TAVELLA, M.H.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F.; FIGUEIREDO, M.S.

1995 Interpopulational and intrapopulational genetic diversity of Amerindians as revealed by six VNTRs., *Ann. Hum. Genet.* (no prelo)