

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

A VARIABILIDADE GENÉTICA DE CINCO POPULAÇÕES DO CHACO
ARGENTINO EM 15 LOCOS STR

Shaiane Goulart Crossetti

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR, INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR.

Orientadora: Dr.^a Sidia M. Callegari-Jacques

Co-orientadora: Dr.^a Mara H. Hutz

Porto Alegre

2007

Dedico esta dissertação às populações
Nativas Americanas.

Agradecimentos

Agradeço a Sidia Maria Callegari-Jacques, que há mais de quatro anos me ensina com muita dedicação os caminhos da pesquisa científica. Possuo uma grande admiração tanto pelo lado profissional como pelo seu caráter e personalidade que a tornaram uma excelente orientadora.

À minha co-orientadora Mara Helena Hutz que me ajudou e apoiou integralmente no desenvolvimento desse trabalho. Considero-a não *co*, mas sim minha segunda orientadora, cuja presença foi fundamental nos momentos de dificuldade.

Aos financiadores do projeto e a todos aqueles que o tornaram possível, em especial ao pesquisador Darío Demarchi que cedeu as preciosas amostras de DNA para este estudo.

Ao professor Francisco Mauro Salzano que sempre se mostrou disposto a esclarecer as minhas pequenas e as grandes dúvidas que lhe trazia. E que sempre me auxiliou pacientemente nas inúmeras vezes que solicitei bibliografias antigas, sem a sua ajuda eu não teria tido acesso a inúmeros conhecimentos.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial às professoras Maria Catira Bortolini e Loreta Brandão de Freitas pelas importantes sugestões feitas na elaboração do projeto e durante o seminário de meio de curso, e ao professor Aldo M. de Araújo pela oportunidade de dividir minha primeira experiência didática durante o curso e por suas críticas sempre bem colocadas.

À equipe do laboratório de DNA do Instituto Geral de Perícias onde os primeiros experimentos foram realizados, em especial ao Paulo Eduardo Raimann que me ensinou todo o procedimento laboratorial para este estudo e ao chefe do Laboratório de Perícias Fábio P. N. Leite.

À professora Karen Luisa Haag, Daniel Graichen e Ana Arend do laboratório de Evolução Molecular que me receberam como “membro honorário do laboratório”. Nunca ajudei nas atividades laborais, mas sempre estive presente nos melhores momentos, como os encontros de amigos secretos e nas jantadas da turma.

Às minhas companheiras de laboratório Júlia Pasqualini Genro, Fabiana Kohlrausch, Verônica Marques Zembrzuski, Marília e Angélica, cuja convivência foi sempre tranqüila e agradável.

À Janaína Pacheco Jaeger e à Ana Paula Guimarães que dividem a sala e a bagunça dos meus *papers* comigo. Obrigada pelas conversas *out science* que me distraíram nos momentos mais estressantes.

Aos colegas da minha antiga sala e companheiros de bangalô Vanderlei Guerreiro Junior e Luciane Rodrigues e também à Andréa Marrero e Tábita Hunemeier.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos encontros com a turma do mestrado (temos que fazer um no final de março!) e pelas poucas, mas providenciais partidas de sinuca e boliche.

Ao Elmo pela dedicação ao programa e disposição em ajudar sempre.

Agradeço principalmente à minha família, aos meus pais que me apoiaram em todas as minhas decisões e que ligaram quase todas as semanas perguntando sobre o andamento da dissertação. Aos meus irmãos que souberam compreender a minha ausência e em especial ao Biel que me ajudou a verificar tabelas de frequências gênicas entre os feriados de natal e o ano-novo e que ajudou na tradução do resumo deste trabalho durante a última semana de suas férias escolares.

Ao Jeferson Badaraco, meu colega e meu amor, que esteve ao meu lado durante o curso de graduação e de mestrado, com quem divido todos os momentos da minha vida. Concluimos juntos mais uma etapa, tua presença, teu carinho e amor foram e são essenciais para mim.

Financiadores

Instituto do Milênio (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Programa de Apoio a Grupos de Excelência - PRONEX

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS

SumárioThe table of contents is empty because none of the paragraph styles selected in the Document Inspector are used in the document.

1 Resumo

1 Resumo

As seqüências microssatélites ou *Short Tandem Repeats* (STR) são caracterizadas por alta taxa de mutação e heterozigosidade, herança codominante e ampla distribuição nos genomas. Somada a estas características, a fácil detecção dos polimorfismos (técnicas automatizadas de PCR e eletroforese capilar), justificam a ampla utilização destes marcadores em áreas como: forense, testes de ascendência, antropologia, genética da conservação e principalmente em estudos evolutivos em humanos.

O Gran Chaco, no período da conquista espanhola, foi um refúgio de povos caçadores-coletores remanescentes, mas ainda em período anterior, seus habitantes sofreram influências culturais de povos das regiões sub-andina, amazônica e dos pampas, tornando esta região um importante ponto de estudo cultural e genético.

Este trabalho tem como objetivo o estudo da diversidade em 15 STRs em 128 indivíduos de três tribos ameríndias do Gran Chaco (**Wichí** e **Toba**, das províncias argentinas de Chaco e Formosa, e **Pilagá**, de Formosa) pertencentes a duas das principais famílias lingüísticas da região, Mataco e Guaykurú.

A amplificação dos 15 microssatélites (D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, CSF1PO, TH01, TPOX, VWA, FGA), todos compostos por motivos tetranucleotídicos, foi realizada com o uso do kit AmpFI STR Identifiler™ de acordo com as especificações do fabricante. Após a amplificação dos fragmentos, foi realizada eletroforese capilar e *softwares* específicos de análises foram usados para medir o tamanho dos fragmentos e identificação dos alelos.

Todas as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 15 STRs, e o número médio de alelos por loco assim como a heterozigosidade média estão dentro do intervalo encontrado em outras populações nativo-americanas.

Os resultados das análises das diferenças nas distribuições genótípicas das populações, análises de estruturação populacional e das relações genéticas através da distância D_A indicam que:

- (1) As relações genéticas entre as populações estudadas correspondem à afiliação lingüística e localização geográfica.
- (2) Os Wichí da província de Chaco são geneticamente distintos das outras populações, mas ainda preservam similaridade genética com os Wichí de Formosa.
- (3) As populações Toba do Chaco e de Formosa, apesar de separadas por cerca de 230 km, são indistinguíveis geneticamente.
- (4) Os Toba da província de Formosa são similares aos Pilagá, que pertencem ao mesmo grupo lingüístico, o Guaykurú, e aos Wichí de Formosa, que pertencem a outro grupo lingüístico (Mataco). Esta similaridade poderia ser consequência de aspectos sócio-demográficos desta etnia.

Análises de variância molecular e valores G_{ST} foram determinados em três grupos populacionais geograficamente determinados: Gran Chaco, Amazônia e Savana/Floresta sub-tropical. Os valores estimados indicam que o Gran Chaco pode ser considerado geneticamente homogêneo, se os índios Ayoreo do Paraguai não são considerados. No entanto, não é possível afirmar que esta homogeneidade prevalece nas populações do Gran

Chaco como um todo, já que esta é uma região bastante extensa que foi habitada por diferentes culturas que mudaram ao longo do tempo. Um maior número de populações, de línguas e locais diferentes do Chaco, devem ser avaliadas.

2 Abstract

2 Abstract

The microsatellite sequences or *Short Tandem Repeats (STR)* are characterized by high mutation rate and heterozygosity, codominant inheritance and ample distribution in the genomes. Added to these features, the easy detection of polymorphism (automated techniques of PCR and capillary electrophoresis), justify the wide use of these markers in areas such as: forensics, ascendance tests, anthropology, conservation genetics and mainly on human evolution studies.

During the period of the Spanish conquest, the Gran Chaco was the refuge of several remaining hunter-gatherer groups, which had suffered cultural influence of people from the sub-Andean, Amazon and pampas' regions in previous periods, making this zone an important spot for cultural and genetic studies.

The objective of this investigation is the study of the diversity in 15 STR *loci* in 128 individuals from three Amerindian tribes of the Gran Chaco (**Wichí** and **Toba**, from the Argentinean provinces of Chaco and Formosa, and **Pilagá**, from Formosa). These tribes belong to two of the main linguistic families of the region: Mataco and Guaykurú.

The amplification of the 15 *STRs* (D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, CSF1PO, TH01, TPOX, VWA, FGA), all of them composed by tetranucleotide motives, was made with the AmpFI STR Identifiler™ kit according to the specifications of the manufacturer. After the amplification, the fragments were submitted to capillary electrophoresis and specific softwares were used to measure the size of the fragments and to identify the alleles.

All populations are in Hardy-Weinberg equilibrium for all of the 15 STR loci. The mean number of alleles per locus and the mean heterozygosity are within the interval found for other Native American populations.

The results of the analyses of the differences on the genotypic distributions of the populations, analysis of population structure and D_A genetic distance indicate that:

(1) The genetic relations between the studied populations correspond to the linguistic affiliation and geographic location.

(2) The Wichí from the Chaco province are genetically distinct from the other populations, but still preserve genetic similarity with the Wichí from Formosa.

(3) The Toba populations from Chaco and Formosa, despite being separated by about 230km (142.6 miles), are genetically indistinguishable.

(4) The Toba from Formosa province are similar to the Pilagá, that belong to the same linguistic group, the Guaykurú, and to the Wichí from Formosa, which belong to another linguistic group (Mataco). This similarity could be consequence of the socio demographic aspects of this ethnic group.

Analyses of molecular variance were performed and G_{ST} ' values were determined in three geographic groups of populations: Gran Chaco, Amazon, and Savannah and Sub-tropical forest. The results indicated that the Gran Chaco region is genetically homogeneous, if the Ayoreo from the Paraguayan Chaco are not considered. However, it is not possible to affirm that genetic homogeneity in the Chaco's populations is a general trait. This region is geographically extensive and culturally diverse, and the number of populations evaluated until now is small.

3 Introdução

3 Introdução

.1 Microssatélites

Os microssatélites são seqüências simples pertencentes à classe do DNA repetitivo, encontrados em maior ou menor abundância nos genomas de todos os organismos e organelas conhecidos, inclusive cloroplastos (Chambers e MacAvoy, 2000; Petit *et al.*, 2005).

Eles são segmentos pequenos de DNA nos quais uma pequena seqüência de um a seis nucleotídeos (nt) está repetida de quatro a cerca de 60 vezes (Goldstein e Pollock 1996). Existem divergências quanto ao número mínimo e máximo de nucleotídeos que compõem um motivo de repetição; Schlotterer e Tautz (1992) e Sainudiin *et al.* (2004) definem os motivos de DNA como tendo entre dois e cinco pbs (pares de bases). Já Chambers e MacAvoy (2000) apóiam uma definição estrita, dois 2 a 6 nt, para o tamanho das unidades, estando de acordo com os estudos iniciais deste tipo de seqüência (Litt e Luty 1989; Tautz 1989; Weber e May 1989) e sugerem que o tamanho mínimo total do arranjo de microssatélite é de oito nucleotídeos, por exemplo, quatro repetições de um motivo dinucleotídico ou duas de um motivo tetranucleotídico.

Estas seqüências foram observadas pela primeira vez por Birnboim e Straus, em 1975, e foram denominadas *polypirimidine stretches*. Mais tarde, outras nomenclaturas foram atribuídas a este tipo de seqüência, como *Simple Sequence Repeat* (SSR) e *Short Tandem Repeat* (STR). O termo microssatélite foi cunhado por M. Litt e J. A. Luty em 1989, remetendo ao termo minissatélite, e neste mesmo ano estes pesquisadores, além de Tautz (1989) e Weber e May (1989), propuseram a utilização destas seqüências como marcadores moleculares.

Características como a alta taxa de mutação (Weber e Wong 1993; Ellegren 2000), heterozigosidade geralmente acima de 0,6 (Goldstein e Pollock 1996), herança codominante e ampla distribuição nos genomas fizeram com que os microssatélites fossem amplamente aplicados em estudos de mapeamento genético e análises de ligação, identificação individual (Edwards *et al.*, 1991) e na investigação das relações populacionais (Bowcock *et al.*, 1994). São ferramentas vantajosas para inferências evolutivas e de genética populacional em áreas tão diversas como a Forense Molecular, Testes de Ascendência, Antropologia Molecular, Genética da Conservação e principalmente em estudos evolutivos em humanos (Sainudiin *et al.*, 2004).

A fácil detecção dos polimorfismos, devida à sua estrutura simples e às técnicas automatizadas de PCR e eletroforese capilar empregadas, é outro fator importante que explica a ampla utilização destes marcadores (Goldstein e Pollock 1996; Bennett *et al.*, 1998).

3.1.2 Características moleculares

A explicação da excepcional variação de alelos microssatélites é tradicionalmente atribuída ao tipo de mecanismo mutacional que predomina nestas seqüências, conhecido como DNA *slippage* (“escorregamento”) (Levinson e Gutman 1987). Este mecanismo acontece quando uma das fitas de DNA microssatélite forma uma alça, originando o mau pareamento, durante a síntese de DNA. Desta forma pode haver perda ou ganho de uma ou mais unidades de repetição (Chambers e MacAvoy, 2000).

O modelo mais simples e popular proposto para explicar a evolução dos microssatélites é o modelo clássico *Stepwise Mutation Model* (SMM) de Ota e Kimura (1973), no qual, uma mutação consiste em uma unidade de repetição ganha, resultando em uma expansão, ou perda, resultando em uma contração. No entanto, vêm sendo observadas mutações que mudam o tamanho das repetições em mais de uma unidade (Xu *et al.*, 2000; Harr *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002). Di Rienzo *et al.* (1994) propuseram o modelo mutacional *two-phase* (TPM) para microssatélites. Este modelo pressupõe que mudanças no tamanho alélico são predominantemente *single-phase* (uma unidade de repetição), com a rara ocorrência de grandes mudanças (mais de uma unidade de repetição). Tanto SMM quanto o TPM pressupõem taxa de mutação constante, independente do tamanho do alelo (Sainudiin *et al.*, 2004).

No geral, seqüências microssatélites com muitas repetições mostraram altas taxas de mutação em observações diretas de transmissão alélica (Brohede *et al.*, 2002). A explicação tradicional é a de que a oportunidade para *slippage* aumenta em proporção ao número de unidades repetidas (Levinson e Gutman, 1987). Investigações detalhadas vêm mostrando que este aumento na taxa de mutação com o aumento do tamanho alélico não é linear, mas exponencial (Primmer *et al.*, 1996b; Brinkmann *et al.*, 1998; Brohede *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos sugerem que a probabilidade de contração aumenta em microssatélites longos em diversos organismos, tais como levedura (Wierdl *et al.*, 1997); mosca (Harr *et al.*, 2000) e humanos (Xu *et al.*, 2000). Outros autores afirmaram que os STRs humanos possuem tendência à expansão quando comparados aos de chimpanzés

(Amos *et al.*, 1996), e que os de andorinhas também mostram tendência à expansão (Primmer *et al.*, 1996a).

Resumindo, existem pelo menos três conjuntos de características qualitativas contrastantes nos modelos evolutivos para STR. O primeiro opõe os modelos *one-phase* e *two-phase*. O segundo é a taxa de mutação considerada proporcional (ao tamanho) vs taxa uniforme. E o terceiro considera a ausência ou presença de tendência mutacional, no qual o tipo de mutação pode depender do tamanho do microssatélite (Sainudiin *et al.*, 2004). Sainudiin *et al.* (2004) testaram diversos modelos evolutivos dos STRs usando dados de repetições CA em locos homólogos em humanos e chimpanzés, e concluíram que o modelo que melhor explica a distribuição alélica por eles estudada é um modelo *one-phase*, com taxa de mutação que depende de forma linear ao tamanho do alelo.

O cenário evolutivo dos STRs pode ser ainda mais complexo; os microssatélites nascem de regiões de “simplicidade críptica” de no mínimo oito nucleotídeos (Messier *et al.*, 1996). Este número mínimo é apoiado pelo estudo da abundância de STRs no genoma de *Saccharomyces cerevisiae* realizado por Rose e Falush (1998), onde STRs com tamanho menor que 8 nt ocorriam ao acaso ao longo do genoma, porém acima deste tamanho, conforme as seqüências aumentavam, tornavam-se mais comuns (Chambers e MacAvoy 2000). À medida que os STRs vão crescendo vão se tornando menos estáveis, adquirindo uma maior tendência à perda de muitas unidades (Schlotterer 1998). O ciclo de vida dos microssatélites parece refletir um balanço entre crescimento por *slippage* e degradação através do acúmulo de imperfeições (Zhu *et al.*, 2000).

.2 Microssatélites no estudo evolutivo humano

Muitos estudos da evolutivos em humanos foram realizados através da investigação da variação de microssatélites.

No trabalho clássico de Bowcock *et al.* (1994), foram elaboradas árvores a partir de 30 locos STRs (repetições CA) dos cromossomos 13 e 15 em dez indivíduos de 14 populações. Nestas árvores os indivíduos se reuniram de acordo com sua origem geográfica, formando grupos por continentes e subgrupos populacionais. Através destas árvores também foi possível observar que as populações africanas divergiam primeiro das demais, apoiando a hipótese da origem “out of Africa”. Outros trabalhos envolvendo outros marcadores microssatélites também corroboraram esta hipótese (Jorde *et al.*, 1997; Calafell *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 2002). Além das comparações entre populações humanas, Bowcock *et al.* (1994) avaliaram 10 microssatélites humanos homólogos a chimpanzés, gorilas e orangotangos, porém não foram obtidas árvores bem estruturadas, mostrando que estes marcadores não são adequados para comparações entre gêneros.

Uma alta diversidade em populações africanas humanas foi descrita por Bowcock *et al.* (1994) e posteriormente confirmada por Jorde *et al.* (1997) que estudaram 60 STRs distribuídos em 14 cromossomos, em três grupos continentais. Segundo este trabalho, populações africanas possuem, em média, diversidade 20% maior que populações asiáticas e europeias, e através da comparação destas diversidades de microssatélites e daquela obtida com mtDNA foi sugerida uma expansão recente a partir de ancestrais africanos (Jorde *et al.*, 1997, 2000).

Calafell *et al.* (1998) avaliaram a diversidade de quatro grupos continentais, incluindo o americano, em 45 microssatélites dinucleotídicos nos cromossomos nove, 10 e 11. Na

pesquisa foram consideradas 10 populações representadas por números amostrais grandes, variando de 84 a 128 cromossomos por população. Os resultados apoiaram aqueles achados por Jorde *et al.* (1997): os africanos mostraram maior diversidade, seguidos por europeus e asiáticos e uma menor diversidade foi observada em populações indígenas americanas.

Trabalhos envolvendo um grande número de marcadores STR e de populações vêm sendo realizados, porém o número de populações nativo-americanas envolvidas em geral é baixo.

Buscando investigar a estruturação da população humana, Rosenberg *et al.* (2002) estudaram 377 microssatélites em 1056 indivíduos do *human diversity cell line panel* do Centro de Estudo do Polimorfismo Humano – CEPH, de 52 populações espalhadas pelo mundo, sendo que cinco são nativo-americanas. Os pesquisadores identificaram seis grupos genéticos principais, dos quais cinco representam as grandes regiões continentais e os subgrupos muitas vezes correspondem a populações individuais; o sexto grupo foi formado por indivíduos de populações isoladas do noroeste paquistanês. Dois parâmetros importantes foram estimados: a variação entre os grupos, de apenas 3-5%, e a variação intrapopulacional, que consistiu de 93-95% da variação genética, mostrando que as diferenças genéticas entre populações são relativamente pequenas quando comparadas com a variação dentro das populações.

Os mesmos dados foram analisados de maneira diferente por Zhivotovsky *et al.* (2003). Usando escalonamento multidimensional dos valores F_{ST} de cada par de populações, os resultados corroboraram os do estudo anterior, mostrando que as populações de mesma região geográfica agruparam-se, e as posições das populações dentro de alguns grupos

corresponderam bem àquelas predefinidas a grupos regionais específicos. Ramachandran *et al.* (2005) expandiram o número de marcadores usados nos trabalhos anteriormente citados, passando de 377 para 783 STRs em 53 populações (duas foram adicionadas e os Suruí não foram estudados). A determinação do padrão de distribuição das heterozigosidades desses dados foi consistente com um modelo de um efeito fundador serial que começou em uma única origem, a África, sendo a América do Sul um dos últimos lugares alcançados pelas populações migrantes.

Serre e Paabo (2004) compararam as sub-estruturas populacionais obtidas a partir de dois esquemas de amostragem e dois padrões de agrupamento: frequências alélicas correlacionadas entre as populações; e não-correlacionadas, utilizando dados genotípicos de 20 microssatélite autossômicos. Quanto à amostragem, o primeiro esquema foi baseado em populações, sendo 89 indivíduos de 15 populações; e o segundo, baseado na localização geográfica, onde 90 indivíduos de 52 populações espalhadas pelo mundo foram avaliados. Os autores constataram que se a amostragem é baseada em indivíduos e geografia em vez de populações, o modelo de isolamento por distância e variação gradual em escala mundial são representações mais adequadas da diversidade genética do que agrupamentos continentais. Já Rosenberg *et al.* (2005) avaliaram o efeito de *design* do estudo variando um a um os fatores: tamanho das amostras, número de locos usados, dispersão das amostras populacionais e correlação ou não das frequências alélicas entre as populações, a partir dos dados de 993 marcadores autossômicos, sendo 783 STRs e 210 inserções/deleções, em 1048 indivíduos. Eles concluíram que a dispersão das amostras tem uma influência relativamente pequena no grau de agrupamento das populações; no entanto

o número de locos e o tamanho das amostras têm uma grande relação direta com a formação de grupos populacionais.

Além de serem utilizados para estimar distâncias genéticas, tempo de divergência e estruturação populacional, os microssatélites foram anteriormente empregados como indicadores de crescimento ou declínio populacional (Reich e Goldstein, 1998; Jin *et al.*, 2000; Zhivotovsky *et al.*, 2000). Zhivotovsky *et al.* (2000) avaliaram o conjunto de dados de 29 STRs dinucleotídicos, 22 trinucleotídicos e 21 tetranucleotídicos em 14 populações, para determinar o quanto estas exibiam sinais de expansão. Os autores estimaram uma expansão recente de no máximo 60.000 anos atrás na África, Ásia e Europa, sugerindo que os períodos de expansão populacional destes grupos foram similares. As estimativas sugerem também a ausência de uma expansão significativa no tamanho das populações da Oceania e América do Sul, que seria explicada por suas expansões tardias ou uma combinação entre crescimento lento e efeito *bottleneck*.

.3 Microssatélites no estudo de populações nativo-americanas

O uso de marcadores microssatélites no estudo de populações nativo-americanas vem fornecendo informações importantes sobre a história e características demográficas destes povos. Na questão do povoamento do continente americano, ênfase vem sendo dada ao uso de YSTRs (microssatélites do cromossomo Y). No estudo de Zegura *et al.* (2004), 63 marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e dez YSTRs foram avaliados em 588 índios de 18 populações nativo-americanas. Os resultados destas avaliações sugerem uma única entrada recente dos ancestrais destes povos. Bortolini *et al.* (2003) por outro lado, ao

analisarem oito SNPs e seis YSTRs de 438 indivíduos de 24 populações indígenas, obtiveram resultados consistentes com a ocorrência de duas principais migrações, sendo que a segunda migração foi restrita à América do Norte. Para a América do Sul o estudo envolveu 23 populações, sendo que a diversidade de microssatélites e a presença de uma linhagem Y específica indicam que certas populações estiveram isoladas desde o início da colonização e que o processo de tribalização teve um começo precoce. O período de entrada dos povos ancestrais também foi calculado (~14.000 anos atrás) e está de acordo com as atuais evidências arqueológicas.

Hutz *et al.* (2002) descreveram as informações de 15 microssatélites autossômicos em cinco populações indígenas brasileiras. A partir destes dados e os de populações européias, africanas e asiáticas previamente estudadas, foram gerados dendrogramas que agruparam as tribos ameríndias e as colocaram próximas ao ramo asiático. Neste trabalho, os autores ressaltaram a necessidade de investigação de um número maior de populações nativo-americanas, visto que nos estudos de comparação global que relataram uma baixa variabilidade para o grupo americano (Calafell *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 2002; Zhivotovsky *et al.*, 2003; Serre e Paabo, 2004; Ramachandran *et al.*, 2005; Rosenberg *et al.*, 2005), a diversidade foi estudada em um número muito pequeno de populações (duas a cinco) que dificilmente expressam toda a diversidade existente neste continente.

Hutz *et al.* (2002) constataram ainda que a baixa variabilidade não é uma característica universal em índios americanos; das cinco populações avaliadas, apenas os Suruí possuem uma baixa variabilidade, e, portanto, não foram encontrados indicativos de ocorrência de *bottleneck* durante a colonização do continente.

Kohlrausch *et al.* (2005) mediram a diversidade dos mesmos 15 microssatélites avaliados por Hutz *et al.* (2002) em 198 indivíduos pertencentes a outras quatro populações indígenas sul-americanas, entre estas a da tribo Aché, cuja maior afinidade genética a povos Gê ou Tupi ainda é polêmica. A árvore gerada através das informações das nove populações (quatro do estudo de Kohlrausch *et al.* (2005) e cinco do estudo de Hutz *et al.* (2002)), indica uma maior proximidade genética entre Aché e Gês. Os Ache, juntamente com Ayoreo e Suruí, mostrou níveis mais baixos de heterozigosidade, o que segundo os autores está de acordo com a etno-história e o grau de isolamento destas tribos. A distância genética e as análises de diversidade sugerem que a distância geográfica foi o fator preponderantemente atuante no estabelecimento das relações genéticas observadas entre as nove populações consideradas.

Salzano e Callegari-Jacques (2006) analisaram dois conjuntos de dados, um composto por 404 STRs e o outro formado por haplótipos derivados de RFLPs de 2-9 sítios obtidos considerando 17 locos autossômicos, em sete populações nativas (Cheyenne, Pima, Maya, Colombianos, Ticuna, Karitiana e Suruí) e também populações da África (Yoruba), Ásia (Han) e Europa (franceses e dinamarqueses) como populações controle. Os dois conjuntos de dados forneceram basicamente os mesmos resultados. A variabilidade interpopulacional foi quase idêntica, a distribuição da heterozigosidade mostrou a mesma graduação (os Yoruba apresentaram os maiores valores e os Suruí os menores) e as relações interpopulacionais vistas nos dendrogramas *neighbor-joining* foram similares. Os dados dos microssatélites sugeriram heterogeneidade entre as cinco populações nativo-americanas que estariam correlacionadas com suas estruturas populacionais (heterozigosidades médias estatisticamente significantes). No entanto, apesar de os dados haplotípicos apresentarem a

mesma gradação de valores de heterozigosidade média, algumas diferenças não foram estatisticamente significantes, provavelmente devido ao pequeno número de locos considerados. Considerando os dados de microssatélites, os autores observaram que a diferença genética entre cinco populações nativo-americanas foi bem maior que aquela encontrada entre a ameríndia mais diversa (Maya) e a africana Yoruba, concluindo que mesmo com alguma perda de diversidade genética durante o povoamento do continente, a diferenciação dentro do continente e a história recente podem ter condicionado estas grandes diferenças na variabilidade das populações.

3.4 O Gran Chaco e suas culturas indígenas

3.4.1 Características geográficas

O nome Chaco provém, aparentemente, do vocábulo Quéchuá *chacú*, que significaria “território de caça” (Steward e Faron, 1959; Hernández, 1992). Trata-se de uma vasta região plana que se estende por aproximadamente 850 mil quilômetros quadrados, abrangendo territórios da Bolívia, Argentina, do Paraguai e Brasil, limita-se com os Pampas ao sul do rio Salado, com a região andina a oeste, com o planalto de Chiquitos e Valesco a noroeste, e com os rios Paraguai e Paraná a leste (Carvalho, 1992). A região pode ser dividida em Chaco Boreal, formado pelos territórios do Paraguai e Bolívia, Chaco Central, entre os rios argentinos Pilcomayo e Bermejo, e Chaco Austral, na região do rio Salado, também na Argentina.

Ao longo desta extensa região o clima varia de árido a semi-árido, com duas estações bem características, a de seca e a de chuva. As temperaturas aumentam do sul para o norte e as chuvas diminuem do leste para oeste (Riveros, 2000). Porém, a seca fica atenuada pela presença de muitos lagos e pântanos remanescentes das inundações da estação anterior (Carvalho, 1992; Goicoechea *et al.*, 2001).

A vegetação dominante é a floresta aberta e seca, com cactáceas e bromeliáceas (Riveros, 2000). Na parte ocidental encontra-se uma floresta rala, as áreas mais secas são caracterizadas por savana e estepe arbustiva, e existem matas ciliares ao longo dos rios. A intensa exploração de madeira, para a extração do tanino, e a difusão da criação de gado contribuíram substancialmente para a degradação da vegetação original (Carvalho, 1992).

O pouco declive do terreno para sudeste explica a tortuosidade dos rios. Dos muitos que se originam nos Andes, apenas os rios Pilcomayo, Bermejo e Salado atravessam a região e deságuam nos rios Paraguai e Paraná, porém têm leito instável. O Pilcomayo abre-se em dois ramos em Estero Patiño, e o Bermejo tomou, a partir de 1868, uma direção mais setentrional, despejando suas águas no rio Teuco (Métraux, 1946). Esses rios têm sido um elemento vital para a instalação de numerosas tribos ao longo do tempo, é justamente nas zonas ao redor dos ramos abandonados de rios e arroios que têm sido localizados restos das culturas primitivas (Hernández, 1992).

3.4.2 Os primeiros Chaquenses

O Chaco se caracteriza pela escassez de investigações arqueológicas, especialmente no que se refere a possíveis períodos acerâmicos antigos, anteriores às influências amazônicas ou andinas (Hernández, 1992). São as áreas mais periféricas, nem sempre inundáveis, que fornecem algumas evidências arqueológicas sobre o povoamento antigo e as influências culturais pré-colombianas na região (Carvalho, 1992).

Acredita-se que o período inicial de povoamento da região chaquense aparentemente foi bem mais tardio que aquele de outras regiões da América do Sul (Miller, 1979). O Chaco teria permanecido, até o sétimo ou sexto milênio a.C., como uma extensa região pantanosa, lacustre e inabitável. Somente após a dessecação holocênica, ocorrida tardiamente na região, foi possível a chegada dos primeiros habitantes, que provavelmente aconteceu a partir do Planalto brasileiro ou, anteriormente, a partir das regiões andinas e peri-andinas que circundam a região (Hernández, 1992).

Os povos do Chaco eram nômades coletores, caçadores e pescadores, que agrupavam-se em bandos pequenos constituídos de poucas famílias. Vestiam mantos de couro pintado e viviam em cabanas frágeis. Não conheciam a tecelagem nem a fabricação de cestos, mas eram hábeis na confecção de bolsas trançadas, que são feitas até hoje. (Métraux, 1946; Carvalho, 1992; Goicoechea *et al.*, 2001).

3.4.3 A diversidade cultural

Dados arqueológicos, históricos e etnográficos sobre o período anterior à chegada dos espanhóis registram a presença de três tipos culturalmente diferenciados de populações

indígenas no Chaco argentino: (1) os chaquenses típicos, integrados pelos grupos pertencentes às famílias lingüísticas Guaykurú e Mataco; (2) as culturas “andenizadas”, formada pelos representantes da família lingüística Lule-Vilela; e (3) as culturas amazônicas, representadas pelos povos pertencentes às famílias lingüísticas Tupi-Guarani e Arawak (Hernández, 1992). Existiam ainda os Chiquito, os Zamuco e os Guató que habitavam o Chaco Boreal.

Tanto do ponto de vista cultural quanto econômico, o Chaco é uma zona de transição entre a planície da bacia amazônica, a planície Argentina e a zona sub-andina. As culturas residentes de todas essas regiões se misturaram no Chaco, produzindo um novo tipo de civilização. Os contatos freqüentes com povos dos Andes contribuíram para a difusão na área de alguns traços andinos, como uso de ornamentos de prata, o uso do tear e de objetos de madeira como bacias, raspadores, colheres e facas (Métraux, 1946; Hernández, 1992).

Os dados quanto à totalidade dos grupos do Chaco na época da conquista espanhola são imprecisos, estimando-se que 50.000 pessoas habitavam o Chaco argentino (Hernández, 1992).

A região foi uma zona de refúgio de tribos muito primitivas, muitas atualmente desaparecidas (Pericot y Garcia, 1964). Por exemplo, os indivíduos da etnia Guató, viviam na região pantanosa do alto Paraguai, eram ribeirinhos e possuíam canoas. Estavam reduzidos a uma centena de indivíduos no princípio do século XIX e na metade deste mesmo século já estavam praticamente extintos. Os Zamuco formam uma importante família em uma área pequena da zona norte do Chaco. Suas divisões são mal conhecidas, pois muitos de seus grupos estão extintos. Os Ayoreo são importantes representantes atuais deste grupo lingüístico. Os Chiquitos, por sua vez, distribuía-se desde o Paraguai até o

sudeste da Bolívia, como consequência da conquista espanhola suas numerosas tribos foram reunidas em missões. Em 1766 contavam 24.000 indivíduos, porém este número foi extremamente reduzido após a expulsão dos jesuítas (Pericot y Garcia, 1964). Em períodos pré-Hispânicos, o Chaco ocidental e central argentino estiveram povoados por grupos Lule-Vilela. Com a conquista, todos eles foram rapidamente concentrados em missões religiosas e prontamente extintos (Hernández, 1992). Os Chiriguano, pertencentes à grande família lingüística Tupi-Guarani, viviam principalmente em território paraguaio de onde migraram, possivelmente pouco antes da conquista espanhola, até a Bolívia e dali até o atual território argentino. Durante este processo “guaranizaram” os Chané e provavelmente outros grupos Mataco, que ocupavam anteriormente essas terras (Hernández, 1992). Os Chané constituem o ramo mais austral da grande família lingüística Arawak. Sabe-se que seus povoados eram extensos e há vestígios de que teriam um calendário lunar de doze meses e uma complexa organização social (Steward e Faron, 1959; Hernández, 1992).

3.4.4 Os chaquenses típicos – Guaykurú e Mataco

A família Guaykurú é a família mais importante desta área. Seu território estende-se ao longo do rio Paraguai e do baixo Paraná, sendo que a principal região por eles habitada situa-se entre os rios Pilcomayo e Bermejo (Pericot y Garcia, 1964).

No Chaco argentino, os grupos que compõem esta família são os Pilagá (ou Kom-pi), que antes da chegada dos espanhóis habitavam o Chaco central em ambas as margens do rio Pilcomayo; o grupo Guaykurú, que foi rapidamente exterminado depois da conquista, e cujo habitat era junto ao rio Paraná, ao norte da atual província de Formosa; os Toba, que

provavelmente se assentavam no curso médio do rio Bermejo; os Mocoví (ou Mocobí ou Mok'oit), que se localizavam no noroeste da atual província de Santiago del Estero e Santa Fé; e o grupo Abipón, que habitava as margens setentrionais do rio Bermejo no braço inferior, mas está atualmente desaparecido. Também pertenciam a família Guaykurú os Payaguá, os Mbayá e os Caduevo que viviam mais afastados desta região central (Hernández, 1992).

Muitos dos grupos Guaykurú, que possuem alta estatura e robustez, foram conhecidos em tempos hispânicos como *frentones*, como os Toba e Pilagá, por causa do costume que tinham de raspar a parte anterior da cabeça, com o que certamente adquiriam um aspecto físico peculiar. Os Toba (que na língua guarani significa *frentón* –testa grande) se denominavam Kom, Ntakbit ou Ntakewit. Eram belicosos assim como os Mocoví e os Abipón; possivelmente esses três grupos tenham participado de violentos enfrentamentos na área chaquense, inclusive antes do contato com os espanhóis. Posteriormente, os três grupos protagonizaram um significativo capítulo na história de resistência indígena frente à conquista e à colonização (Miller, 1979).

A economia dos grupos da família Guaykurú foi fundamentalmente coletora e caçadora. A coleta era basicamente tarefa feminina, que colhiam principalmente os frutos de *chañar* (*Gourlica decorticans*), de mistol (*Zizyphus mistol*), de algarroba (*Prosopis alba* e *Prosopis nigra*), de tusca (*Acacia moniliformis*) e frutas de cactos. O mel, figos de *tuna*, cernes de palmeiras fermentados, diversas raízes, feijões e arroz selvagem eram coletados pelos homens. Eles também praticavam a caça da avestruz, do tapir, veado, pecari, iguana, tatu e jaguar. Utilizavam diversos métodos para capturar suas presas, sendo um deles o incêndio da pradaria ou monte, a partir do qual conseguiam desalojar os animais de seus

esconderijos e facilitar a caça. Era comum, por sua vez a prática de chamados de animais e de disfarçar-se com plumas para que pudessem se aproximar dos animais até o momento do tiro da flecha sem que estes fossem advertidos. O gado, ovelhas, cabras, cavalos e outros pequenos animais introduzidos pelos espanhóis proliferaram nos Pampas e aumentaram o suplemento de carne (Steward e Faron, 1959; Hernández, 1992).

A pesca, de igual ou maior importância que a caça, era feita também de diversas formas, individual ou coletiva, com arpões, lanças e flechas, ou com redes amarradas a varas, mas toxinas/drogas para peixes, tão comum em outros lugares da América do Sul, não eram empregadas. Os rios Pilcomayo, Bermejo, Salado e Paraguai proviam as melhores pescarias. Na estação chuvosa, eles inundam formando lagoas onde os peixes ficam encalhados na estação seca subsequente. A pesca sazonal foi um suplemento vital na alimentação, índios que habitavam os interiores áridos viajavam para estes rios durante os grandes períodos de pesca que duravam de dois a três meses (Steward e Faron, 1959).

Os Guaykurú viviam em pequenas aldeias, a vestimenta era composta por um curto manto de peles que utilizavam durante o inverno. Vários grupos Guaykurú já haviam adquirido em épocas pré-hispânicas certos ornamentos corporais de origem amazônicas. Já conheciam o tear de lã andino, com o qual confeccionavam os ponchos, mas baseando-se no antigo modelo do manto de peles. Não foram ceramistas - as cerâmicas conhecidas atualmente parecem ser produto de influências andinas e amazônicas (Hernández, 1992).

Quanto à organização familiar, sabe-se que a poliginia era permitida e prestigiada, alguns grupos praticavam o casamento por compra e outros (Toba) deviam provar ao pai da noiva suas qualidades de caçador e pescador. Organizavam-se em grupos plurifamiliares que constituíam bandos com território reconhecido, conselho de anciões, *shamans* e

grandes caciques carismáticos, às vezes de caráter permanente, outras vezes circunstancial (Hernández, 1992).

Apesar dos índios do leste e sul chaqueño terem adotado o cavalo e formado bandos montados, não se tornaram criadores de gado. As centenas de animais que escaparam dos ranchos espanhóis e se tornaram selvagens foram caçados como as presas tradicionais. A introdução do cavalo ocorrida no século XVIII, no entanto, revolucionou a economia e a vida social e política, especialmente entre os povos Guaykurú (Métraux, 1946; Steward e Faron, 1959). Os bandos Guaykurú montados eram os Abipón, Mocoví, Mbayá e alguns Toba. No entanto os Guaykurú Pilagá não se tornaram cavaleiros. Após adquirirem cavalos, eles começaram uma expansão para o sul que possivelmente abrangeu centenas de quilômetros. Durante este processo entraram em contato com índios caçador-coletores ao longo da borda oeste do Chaco. Eles também entraram em conflito com os espanhóis, cujas cidades e estâncias ao longo do rio Paraguai eram continuamente saqueadas (Métraux, 1946; Steward e Faron, 1959). A aquisição dos cavalos possibilitou maior mobilidade, índios do Chaco leste estendendo-se muito mais em busca de novas terras para coleta e caça.

Na família lingüística Mataco nenhum grupo adotou o cavalo. Dos dez grupos que habitaram o Chaco argentino (central nor-ocidental), os Vejoz, Guisnay, Maká, Mlbalá, Matará, Toconé, Mataguay, Mataca ou Wichí, Chorote ou Yofuaja, Chulupi ou Nivaklé, apenas estes três últimos sobrevivem neste território (Steward e Faron, 1959).

O fato de compartilhar habitat dentro de uma mesma unidade ecológica e terem sido submetidos a influências culturais alóctones similares, fez com que o estilo de vida dos grupos da família lingüística Mataco tenham muitos pontos em comum com a de seus vizinhos, os Guaykurú (Hernández, 1992).

Entre os indivíduos de língua Mataco, a atividade econômica preponderante foi a coleta, mas também praticavam a caça e a pesca, com métodos similares aos anteriormente descritos para os outros grupos chaquenses Guaykurú. Em termo de vestuário, disponibilidade de utensílios, armamento ou instrumentos de caça e pesca, e também sua organização social, as semelhanças encontradas entre esses povos e os grupos Guaykurú são muito marcantes (Hernández, 1992).

Apesar das incursões iniciais de missões jesuíticas e depois das franciscanas, o Gran Chaco permaneceu virtualmente inacessível aos europeus até as primeiras décadas do século passado, tornando-se um refúgio para alguns dos grupos caçadores-coletores remanescentes da América do Sul (Demarchi *et al.*, 2001). A campanha militar mais intensa, cujo emblema era a incorporação e a “disciplina” de povos nativos, iniciou no final do século XIX. O centro oeste do Chaco argentino continuou por mais algum tempo em mãos indígenas. Porém a absorção de mão de obra indígena em atividades econômicas, como engenhos de açúcar, extração de madeira, cultivo do algodão e mais tarde na expansão ferroviária, foi triunfante (Hernández, 1992). Hoje em dia os índios do Chaco argentino, entre eles os Mataco e os Guaykurú, vivem em reservas. No inverno a maioria procura emprego em plantações de cana ou vivem nas periferias das cidades. Esta variedade de contatos com a povos não indígenas está destruindo as culturas nativas do local (Métraux, 1946).

4 Justificativa e objetivos

4 **Justificativa e objetivos**

O Gran Chaco vem sendo chamado de “the melting pot” de populações (Goicoechea *et al.*, 2001). As diferentes influências da bacia do Amazonas, da região sub-andina e do Pampa argentino fazem desta região uma área extremamente atrativa ao estudo da genética de populações.

Salzano e Callegari-Jacques (1988), através do estudo de marcadores clássicos, sugeriram que o Chaco poderia ser uma possível área de dispersão ou convergência de povos.

Muitas questões de interesse antropológico envolvem processos que ocorreram em um período relativamente curto, durante o qual a deriva genética e migração podem ter ocorrido, porém, em geral, poucas mutações são acumuladas. Estas pequenas mudanças são mais facilmente detectadas usando marcadores microssatélites que marcadores bialélicos, nos quais as mutações acumulam-se lentamente através do tempo (Sahoo e Kashyap 2005). Portanto, marcadores STR são os marcadores escolhidos para este estudo, pois ele envolve populações muito próximas, que compartilham a mesma etnicidade e falam línguas próximas.

A investigação da estrutura genética e dos processos evolutivos usando marcadores microssatélites nestas populações é mais uma fonte de informação que deve ser somada ao conhecimento atual sobre os ameríndios.

Este trabalho tem como objetivo o estudo da diversidade em 15 locos microssatélites em três tribos ameríndias do Chaco: Wichí, Pilagá, e Toba.

Manuscrito em preparação

Autosomal STR genetic variability in the Chaco native population: homogeneity or heterogeneity?

Shaiane Goulart Crossetti¹, Paulo Eduardo Raimann³, Dario A. Demarchi, Francisco Mauro Salzano¹, Mara Helena Hutz¹, Sidia Maria Callegari Jacques^{1,2}

¹ *Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil*

² *Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, 91509-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

³ *Laboratório de Perícias do Instituto Geral de Perícias, Rio Grande do Sul*

No. of text pages+bibliography: 12 + 4; no. of figures: 3; no. of tables: 4.

Abbreviated title: AUTOSOMAL STRs IN CHACO POPULATIONS

KEY WORDS: genetic diversity; South American gene geography; STR

Grant sponsor : Institutos do Milênio; Grant sponsor: Programa de Apoio a Grupos de Excelência; Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul; Grant sponsor: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (scholarship to S. G. Crossetti)

Correspondence to:

Sidia Maria Callegari-Jacques, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax number: 55 (51) 3316-7311. E-mail addresses: sidia.jacques@ufrgs.br;

shaiane.crossetti@ufrgs.br

Abstract

To investigate population structure and variation in the Gran Chaco's indigenous population, data from 15 short tandem repeats (STR) were determined in 128 individuals from three tribes of the Argentinean part of the Gran Chaco. The results of STR genotypic distribution differences, structure population analysis, and MDS plot for D_A distance, indicate that (1) the Wichí individuals from the Chaco province are genetically distinct from other populations, but still preserve considerable genetic similarity with the Wichí from Formosa; (2) the Toba populations are genetically indistinguishable, and (3) Toba subjects from Formosa are similar to the Pilagá (of the same linguistic group - Guaykurú) and to the Wichí from Formosa (who speak a Mataco language). This similarity could be a consequence of historical socio-demographic aspects of this ethnic group. G_{ST} ' values and AMOVA analyses considering three south American regions indicated that the Gran Chaco region is genetically homogeneous, if the Ayoreo Amerindians (settled at the Paraguayan Chaco) are not considered. But it would be precipitated to assert that the genetic homogeneity in the Chaco's populations is a rule, placing the Ayoreo as an exception. This region is geographically extensive and culturally diverse, and the number of populations evaluated until now is small.

The Gran Chaco is a vast lowland plain of central South America that extends through northern Argentina, southeastern Bolivia, northwestern Paraguay and into a small area of southwestern Brazil. Located approximately between latitudes 17° and 33° South and longitudes 65° and 60° West, this area has a typical wet-dry seasonal type climate, the temperatures rising from south to north and rainfall increasing from west to east. Open dry woodland and large areas with grass ground cover are the predominant vegetation of the Chaco (Riveros, 2000).

Culturally as well as ecologically, the Chaco is a transitional zone between the tropical plains of the Amazon Basin and the pampas of Argentina (Métraux, 1946; Carneiro da Cunha, 1992). Scholars generally agree that the initial period of settlement in the Chaco region was apparently more delayed than the other regions of South America (Miller, 1979). Both the Andean cultures of the northwest and the Amazonian ones from the northeast, that penetrated through the course of the Paraguay and Parana rivers, affected in permanent and, probably, simultaneous ways the first human contingents of the area (Hernández, 1992). These old contingents of inhabitants frequently have been characterized as gatherers, fishers and hunters, grouped in small nomad bands of few families.

Archaeological, historical and ethnographic data suggest the presence of three culturally differentiated pre-Hispanic native populations in the Argentinean Chaco: the typical Chaco people (Guaykurúan and Matacoan linguistic families), the Andean-like cultures (Lule-Vilela family) and the Amazonian cultures (Arawak and Tupi-Guarani families) (Hernández, 1992).

As the ecological conditions delayed the arriving of the first inhabitants of the Chaco territory, the same happened to the Europeans in the XVI century. The initial interest for the land in establishing a connection between this region and Peru was soon abandoned after some failed attempts. The European penetration into the Chaco in centuries XVI and XVII was slow, marked by a few military campaigns and the settlement of Jesuitic and later Franciscan missions.

During the XIX century a slow but systematic advancement of the Argentinean Army and European immigrants from the central Chaco toward the Pilcomayo River, the major river of the area, was observed (Métraux, 1946). However even nowadays the demographic density of this region remains low. The Gran Chaco area has remained virtually inaccessible to Europeans until the first decades of the last century, being the refuge of some of the last hunter-gatherer groups remaining in South America (Demarchi *et al.*, 2001). The Chaco colonization involved many movements of people, natives and, later, colonists, which probably contributed for the genetic diversity of the region.

Studies of blood group and protein genetic systems had reported a relative genetic homogeneity between the populations of the Gran Chaco (Salzano and Callegari-Jacques, 1988; Goicoechea *et al.*, 2001). The same was observed in studies with molecular markers such as mtDNA, Y chromosome and autosomal short tandem repeats (STR) (Cerna *et al.*, 1993; Demarchi *et al.*, 2001; Dejean *et al.*, 2004; Demarchi and Mitchell, 2004; Cabana *et al.*, 2006). However, results obtained from anthropometric traits indicate substantial genetic differentiation among Chaco populations (Demarchi and Marcellino, 1998; Demarchi *et al.*, 1998).

Dejean *et al.* (2004) used four dinucleotide STRs of the HLA region to study three Chaco tribes (Wichí, Chorote and Toba) and found a relative low genetic variation among these groups. Eight STRs were investigated in a samples of a Wichí population of the Salta province (Argentinean Chaco) and in individuals of two Patagonian populations (Mapuche and Tehuelche) by Sala *et al.* (1998). The Wichí proved to be more genetically differentiated from the other two and exhibited the highest dissimilarity with European populations. Sala *et al.* (1999) studied the same samples, for 13 autosomal STRs and nine Y chromosome STRs (YSTRs), but, as in the early study, no inferences could be made about the variation of the Chaco region as only one population was evaluated.

We herein report the allelic frequencies for 15 STR *loci* in three Chaco Argentinean tribes, Wichí, Pilagá and Toba, which belong to the two major linguistic groups (Mataco and Guaykurú) of the region, and use these and previous reported data to evaluate the genetic diversity of the Chaco region.

Subjects and Methods

Populations

The Wichí (or Mataco), Toba and Pilagá, belong to the typical Chaco cultural group. Their antique way of life was nomadic and based on hunting, and gathering. Nowadays they live in settlements, working at plantations in agricultural zones or at urban peripheries.

The Wichí belong to the Mataco linguistic family, whereas the Toba and Pilagá are Guaykurú-speaking tribes, these two families compose the still hypothetical Macro-

Waikurúan cluster (Campbell, 1997).

The present Wichí population in Argentina is about 35,400 individuals distributed across the provinces of Salta, Chaco, and Formosa. The Pilagá inhabit the province of Formosa and number approximately 4,000 persons, whereas the today Toba population is about 46,000 and live in settlements in the provinces of Chaco, Formosa and Salta (ECPI, 2005).

DNA extractions from whole blood and old plasma samples were previously performed using QIAmp blood (Qiagen) and Isoquick blood (Orca Research) kits (Demarchi *et al.*, 2001). The DNA samples were obtained from 128 unrelated individuals from different settlements of the Gran Chaco region of northeastern Argentina (Central Chaco). The location and the number of individuals per sample were as follow: Pilagá (geographic coordinates: 24°12'W, 59°48'S; n=25), Wichí-For (24°W, 62°S; n=29), and Toba-For (26°12'W, 58°12'S; n=23) from the province of Formosa (For) and Wichí-Ch (25°42'W, 61°S; n=25) and Toba-Ch (26°W, 60°30'S; n=26) from the province of Chaco (Ch). The sampling locations are shown in Figure 1.

Laboratory analysis

The samples were amplified by PCR using the commercial AmpFISTR Identifiler kit (Applied Biosystems, Foster City, California) at the following *loci*: D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, CSF1PO, TH01, TPOX, VWA and FGA. Amplifications were performed in a GeneAmp PCR System 9600 thermocycler (Applied Biosystems) following the instructions provided in the kit user manual, with the recommended DNA concentration (1.0–2.0 ng). Electrophoresis of the

amplified fragments, mixed with formamide and GS500 LIZ as an internal size standard, was performed in a 310 ABI PRISM™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommended protocol (the time of injection of some amplified fragments were changed from 5s to 10s). The GeneScan™ version 3.2.1 analysis software was used to track lanes and measure fragment sizes, while the Genotyper™ version 2.5.2 software was employed to automatically designate alleles by comparison with locus-specific allelic ladders.

Statistical analysis

The two Wichí populations were initially interpreted as independent mating systems, and considered separate populations since they are isolated by hundreds of kilometers. The same approach was used for the two Toba populations.

Allele frequencies were obtained using the software CONVERT (Glaubitz, 2004). Gene diversity estimates were calculated as described in Nei (1987), using the DISPAN software (Ota, 1993). In order to identify statistically significant differences between populations' genotype frequencies, an estimate of the P-value for a log-likelihood (G) based exact test was obtained using the GENEPOP v.3.1 program (Raymond and Rousset, 1995). The general significance level used was 0.05 and the Benjamini and Hochberg (1995) correction for multiple testing was applied.

Genetic distances between populations were evaluated by the D_A distance (Nei *et al.*, 1983) developed for study of gene differences of closely related local populations (Takezaki and Nei, 1996), using the POPTREE program (Takezaki, 2001). A plot using

Nonmetric Multidimensional Scaling (MDS) was obtained using the SPSS® v.8 for Windows™ package.

Population genetic structure was investigated using analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), as implemented in the program ARLEQUIN v.3.01 (Excoffier *et al.*, 2005), and the approach of Pritchard *et al.* (2000). In this case, the STRUCTURE v.2.1 program (Falush *et al.*, 2003) was used, with K (the number of potential groups) varying from 1 to 8, and 100,000 MCMC repetitions.

Data from the Paraguayan Chaco Ayoreo Amerindians previously investigated for the same 15 STR systems (Kohlrausch *et al.*, 2005) were also used for genetic distance and population structure analyses.

Results and Discussion

Number of alleles and heterozygosity

Allele frequency distributions for the 15 STRs investigated in the five Chaco populations are shown in Table 1. All populations were in Hardy-Weinberg equilibrium, the only exception being the Pilagá for the D19S433 locus. The most frequent allele was the same in the five samples studied, for five systems: *CSFIPO* (*12), *D5S818* (*11), *D18S51* (*14), *TH01* (*7), and *vWA* (*16).

Considering the five samples as a whole, 117 different alleles were detected, with a range of five (TH01) to 12 alleles per locus (FGA), the modal number being seven alleles

(in five *loci*) (Table 1). The mean \pm SE number of alleles per locus varied from 4.7 ± 0.96 in the Wichí-Ch to 6.5 ± 1.3 in the Pilagá and the average heterozygosity ranged between 0.70 ± 0.11 (Wichí-Ch) and 0.79 ± 0.08 (Pilagá) (Table 2).

Genetic affinities and structure of Gran Chaco populations

Seven of ten pairwise differences in genotypic distribution for Argentinean Chaco populations were statistically significant after controlling for multiple testing. The exceptions were the differences between Toba-For and Toba-Ch ($p=0.513$), between Toba-For and Wichí-For ($p=0.436$) and Toba-For and Pilagá ($p=0.075$).

The structure of the Chaco population was evaluated by the Pritchard *et al.* (2000) clustering method using an admixture model, and a maximum of $K=8$ groups to allow for sub-structuring. The highest estimate of the probability of the observed data given the number of groups [$\Pr(\text{genotypic data} | K)$] was obtained for $K=4$. Figure 2 shows the individual estimated membership in each of the four inferred clusters. There is a clear separation of the Ayoreo sample but heterogeneity among the Argentinean Chaco populations is observed as well. The average individual membership scores in the four inferred clusters are presented in Table 3 for each sample. The highest mean score (0.91) of the Ayoreo individuals was observed for cluster *A*, which could be considered as an “Ayoreo cluster”, as all other populations had average scores below 0.04 in this cluster. The Wichí had relatively high scores in the *B* cluster (Wichí-Ch: 0.77, Wichí-For: 0.53). The highest Toba-Ch average score was 0.56 in cluster *C*, whereas this value for Toba-For was 0.39 only. It should also be noticed that a 0.32 average membership score for Toba-For individuals were observed in the *D* cluster, which has the highest score average for the

Pilagá sample (0.57). As a matter of fact, none of the B, C or D clusters is a clear “tribe characteristic cluster”, in the sense of cluster *A*; however, in each sample high membership scores are observed preferentially in one of the clusters. The exception is Toba-For, where the average scores are more similar in these three clusters.

The genetic D_A distance between populations can be graphically observed in Figure 3. Toba-For and Toba-Ch plot close together, near Pilagá and Wichí-For, while Wichí-Ch and Ayoreo are more isolated. The genetic relationships among these populations correlate with the language affiliation and geographical localization. The first MDS dimension separates the Ayoreo from the other groups while the second axis separates the populations that speak Mataco (positive values) and Guaykurú (negative values) languages.

The Ayoreo isolated position is easily understood, as this population is geographically (Paraguayan Chaco) and linguistically (Zamuco linguistic stock) distant from the other tribes, but that is not the case of Wichí-Ch. Demarchi *et al.* (2001) studied mtDNA haplogroup frequencies in the same samples studied herein. In a neighbor-joining dendrogram based on Reynolds F_{ST} distance, using these, and two other Chaco populations (Wichí from the Salta province, and Chorote), almost all Mataco speakers separated from Guaykurú speakers. The exception was Wichí-Ch which was placed in the Guaykurúan group. This population also presented the longest branch of the tree. These authors pointed out that Wichí-Ch was the most geographically isolated population studied, living in a region called *El Impenetrable* (The Inaccessible). This geographic isolation could explain the lowest values of the mean number of alleles per locus and average heterozygosity observed for this sample in the present study of 15 autosomal STRs data. Their position in

the MDS plot depicts their genetic distance, probably generated by genetic drift, from the other Chaco populations.

On the other hand, the highest values of the mean number of alleles per locus, average heterozygosity and private alleles obtained for Pilagá could be explained by admixture effects. To check for this possibility, we performed a new analysis including 175 Afro-Americans and 196 Euro-Americans from the United States (data from Budowle *et al.*, 1999), using 13 STR *loci* studied in these samples. In the clustering technique proposed by Pritchard *et al.* (2000), the highest Pr (genotypic data | K) was obtained for $K=3$, as expected. The average membership scores of Pilagá individuals in the Euro-Americans group was 0.27 and 0.19 in the Afro-Americans, a clear indication of admixture. Previous indications of non-indian admixture in this population based on ApoB (Demarchi *et al.*, 1999) and Y chromosome polymorphism data (Demarchi and Mitchell, 2004) have also been published.

The results of STRs genotypic distribution differences, structure population analysis (Figure 2, Table 3) and MDS plot for D_A distance (Figure 3), indicate that (1) the Wichí individuals from the Chaco location are genetically distinct from the other populations, but still preserve considerable genetic similarity with the Wichí from Formosa; (2) the Toba populations are genetically indistinguishable, and (3) Toba persons from Formosa are similar to the Pilagá (of the same linguistic group - Guaykurú) and to the Wichí people from Formosa (who speak a Mataco language). This proximity could be the consequence of historical socio-demographic aspects of this ethnic group, as its warlike characteristic with assimilation of women of defeated peoples, and the acquisition of the

horse which became an advantage in the battles, improved the displacement of these ancient nomads, and therefore, the intensification of contacts with other peoples.

Considering the 13 STRs for which data from the literature were available, gene diversity coefficients H_S , H_T and G_{ST}' were calculated for the Chaco population and compared with those for the Amazonian Forest Amerindian populations and for Native Americans that live in the Savannah and the Sub-tropical forest of South America (Table 4). The Argentinean Chaco populations (present study) have the highest average gene diversity within population ($H_S = 0.70$) and the lowest among populations gene differentiation coefficient ($G_{ST}' = 0.03$). This value was lower than those obtained using four HLA STR polymorphisms ($G_{ST}'=0.06$; Dejean *et al.*, 2004) or mtDNA haplogroups ($G_{ST}'=0.06$; Demarchi *et al.*, 2001). This variation could be attributed to the differences in the type and/or number of markers. Nevertheless, as noted by Demarchi *et al.* (2001), the G_{ST}' of the Argentinean Chaco was lower than that observed in any other region of South America.

When the Ayoreo tribe was included to consider the Gran Chaco region, H_S remains high (0.68), but the differentiation among populations shows a considerable increase ($G_{ST}'=0.06$), being higher than the Amazonian value ($G_{ST}'=0.05$) but lower than that for the Savannah and Sub-tropical forest ($G_{ST}'=0.08$) populations.

Due to excess of missing data in some systems, the analyses of molecular variance (AMOVA) were performed using only 11 STR *loci* in common with the study of Hutz *et al.* (2002). Four geographic regions were considered: (1) the Argentinean Chaco, encompassing the three populations studied (Toba-Ch and Toba-For were assembled, as

were the Wichí populations); (2) the Gran Chaco, including the three Argentinean Chaco tribes plus the Ayoreo of Paraguay; (3) the Amazon, represented by Gavião, Suruí, Waiwai, and Zoró; and (4) the Savannah and Sub-tropical forest, including the Aché, Guarani, Kaingang, and Xavante population. The results are presented at Table 4. The percent of variation among populations of the Argentinean Chaco was the lowest one (1.8%). For the Gran Chaco, a four times higher estimate was obtained (7.1%), which was higher than that for the Amazonian populations (4.1%) but somewhat lower than that for the Savannah and Sub-tropical forest (9.0%). This Gran Chaco among populations percent of variation is also higher than that reported by Demarchi *et al.* (2004) (4.5%) using data of five YSTRs from the same samples studied herein as well as the data from the Wichí and Toba from the Salta province, Ayoreo, Chorote and Lengua. The lack of-agreement could be partly explained by differences in the analysis methodology, as these authors considered different populations of the same tribe separately. When we used the same approach, the variation among population decreased to 6.4%, still higher than that observed in the Amazon. The genetic variability of the Chaco regions seem to be highly affected by the Ayoreo group. When this tribe is not considered in the analyses, the region presents a low differentiation among the populations.

Our results agree with those of Cabana *et al.* (2006), which obtained a much higher mtDNA HVS I differentiation in Gran Chaco populations as a whole than when only the Argentinean tribes (Central Chaco) were considered. Other investigations also indicated the Gran Chaco to be genetically homogeneous, if the Ayoreo Amerindians were not considered (Salzano and Callegari-Jacques, 1988; Demarchi *et al.*, 1998; Goicoechea *et al.*,

2001 and Cabana *et al.*, 2006). The genetic uniqueness of the Ayoreo has already been reported (Dornelles *et al.*, 2004; Kohlrausch *et al.*, 2005).

The data presented here points out the proximity between the Mataco and Guaykurú speakers, which would imply in an intense gene flow through large geographic distances. Language does not seem to be a gene flow barrier in this region. The old way of life of these peoples, related with the ecological conditions of the region, gave raise to migrations practically seasonally. In a region where food is scarce, the probability of contact between small nomadic groups of different origins would be high in places where water and other supplies were more easily found. But it would be precipitated to assert that the genetic homogeneity in the populations of the Chaco is a rule, placing the Ayoreo as exception. This region is geographically extensive and culturally diverse, and the number of populations evaluated until now is small.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Fabio Pereira das Neves Leite from Laboratório de Perícias, Instituto de Perícias do Estado do Rio Grande do Sul, for technical support in the laboratory. Our research program was approved by the Brazilian Ethics National Committee (Resolution 123/98).

LITERATURE CITED

- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. 1995 Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc (Ser B)* 57:289-300.
- Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, and Keys KM (1999) Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat *loci* in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *J Forensic Sci* 44:1277-1286.
- Cabana GS, Merriwether DA, Hunley K, and Demarchi DA (2006) Is the genetic structure of Gran Chaco populations unique? Interregional perspectives on native South American mitochondrial DNA variation. *Am J Phys Anthropol* 131:108-119.
- Campbell L (1997) *American Indian Languages: The Historical Linguistics of Native America*. Oxford: Oxford University Press.
- Carneiro da Cunha M (1992) *História dos Índios no Brasil*. São Paulo: Companhia das Letras.
- Cerna M, Falco M, Friedman H, Raimondi E, Maccagno A, Fernandez-Vina M, and Stastny P (1993) Differences in HLA class II alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina. *Hum Immunol* 37:213-220.
- Dejean CB, Crouau-Roy B, Goicoechea AS, Avena SA, and Carnese FR (2004) Genetic variability in Amerindian populations of Northern Argentina. *Genet Mol Biol* 27:489-495.
- Deka R, Shriver MD, Yu LM, Heidreich EM, Jin L, Zhong Y, McGarvey ST, Swarup Agarwal S, Bunker CH, Miki T, Hundrieser J, Yin SJ, Raskin S, Barrantes R, Ferrell RE, and Chakraborty R (1999) Genetic variation at twenty three microsatellite loci in sixteen human populations. *J Genet* 78:99-121.
- Demarchi DA, Colantonio SE, and Marcellino AJ (1998) Population structure in the Gran Chaco and the uniqueness of the Ayoreo [abstract]. *Am J Hum Biol* 10:120-121.

- Demarchi DA, and Marcellino AJ (1998) Dermatoglyphic relationships among South Amerindian populations. *Hum Biol* 70:579-596.
- Demarchi DA, and Mitchell RJ (2004) Genetic structure and gene flow in Gran Chaco populations of Argentina: evidence from Y-chromosome markers. *Hum Biol* 76:413-429.
- Demarchi DA, Marcellino AJ, Basualdo MA de, Colantonio SE, Stefano GF de, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Carnese FR, Goicoechea AS, Dejean CB, Guevara AG, and Crawford MH (1999) Apolipoprotein B signal peptide polymorphism distribution among south Amerindian populations. *Hum Biol* 71:995-1000.
- Demarchi DA, Panzetta-Dutari GM, Motran CC, Basualdo MA de, and Marcellino AJ (2001) Mitochondrial DNA haplogroups in Amerindian populations from the Gran Chaco. *Am J Phys Anthropol* 115:199-203.
- Dornelles CL, Battilana J, Fagundes NJ, Freitas LB, Bonatto SL, and Salzano FM (2004) Mitochondrial DNA and Alu insertions in a genetically peculiar population: the Ayoreo Indians of Bolivia and Paraguay. *Am J Hum Biol* 16:479-488.
- ECPI (2005) Encuesta Complementaria de Pueblos Indígenas: Ministerio de Economía y Producción / Secretaría de Política Económica - Instituto Nacional de Estadística y Censos. <http://www.indec.mecon.gov.ar>.
- Excoffier L, Laval LG, and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier L, Smouse PE, and Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Falush D, Stephens M, and Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567-1587.

- Gené M, Fuentes M, Huguet E, Piqué E, Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Corbella J, and Moreno P (1998) Quechua Amerindian population characterized by HLA-DQa, YNZ22, 3'APO B, HUMTH01, and HUMVWA31A polymorphisms. *J Forensic Sci* 43(2):403-405.
- Gené M, Huguet E, Moreno P, Fuentes M, Corbella J, and Mezquita J (1996) Aymara and Quechua Amerindian populations characterized by HumTH01 and HumVWA STR polymorphisms. *Adv Forens Haemogenet* 6:537-539.
- Gené M, Moreno P, Borrego N, Piqué E, Xifró A, Fuentes M, Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Turbón D, Corbella J, and Huguet E (2000) Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQa. *Int J Legal Med* 113(2):126-128.
- Glaubitz JC (2004) CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol Ecol Notes* 4:309-310.
- Goicoechea AS, Carnese FR, Dejean C, Avena SA, Weimer TA, Estalote AC, Simoes ML, Palatnik M, Salamoni SP, Salzano FM and Callegari-Jacques SM (2001) New genetic data on Amerindians from the Paraguayan Chaco. *Am J Hum Biol* 13: 660-667.
- González-Andrade F, Sánchez-Q D, and Martínez-Jarreta B (2006) Genetic analysis of the Amerindian Kichwas and Afroamerican descendents populations from Ecuador characterized by 15 STR-PCR polymorphisms. *Forensic Sci Int* 160(2-3):231-235.
- Guarino FD, Federle L, Van Oorschot RAH, Briveno I, Bernal JE, Papiha SS, Schanfield MS, and Mitchell RJ (1999) Genetic diversity among five Native American tribes of Colombia. In SS Papiha, R Deka and R Chakraborty (eds.): *Genomic Diversity: Applications in Human Population Genetics*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 33-51.
- Hernández I (1992) *Los Indios de Argentina*. Madrid: Mapfre.

- Hutz MH, Callegari-Jacques SM, Almeida SE, Armbrorst T, and Salzano FM (2002) Low levels of STRP variability are not universal in American Indians. *Hum Biol* 74:791-806.
- Kohlrausch FB, Callegari-Jacques SM, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Hill K, Hurtado AM, Salzano FM, and Hutz MH (2005) Geography influences microsatellite polymorphism diversity in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 126:463-470.
- Métraux A (1946) *Ethnography of the Chaco*. In JH Steward (ed.): *Handbook of South American Indians*. Washington: Government Printing Office.
- Miller E (1979) *Los Tobas Argentinos. Armonía y Disonancia en una Sociedad*. México: Siglo XXI.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Univ Press.
- Nei M, Tajima F, and Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol* 19:153-170.
- Ota T (1993) *DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis*. University Park: Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University.
- Pritchard JK, Stephens M, and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-59.
- Raymond M, and Rousset F (1995) GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*:248-249.
- Riveros F (2000) *The Gran Chaco*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Crop and Grassland Service, Plant Production and Protection Division. <http://www.fao.org/ag/AGP/agpc/doc/Bulletin/GranChaco.htm>.
- Sala A, Penacino G, Carnese R, and Corach D (1999) Reference database of hypervariable genetic markers of Argentina: application for molecular anthropology and forensic casework. *Electrophoresis* 20:1733-1739.
- Sala A, Penacino G, and Corach D (1998) Comparison of allele frequencies of eight STR loci from Argentinian Amerindian and European populations. *Hum Biol* 70:937-947.

- Salzano FM, and Callegari-Jacques SM (1988) South American Indians A Case Study in Evolution. Oxford: Clarendon Press.
- Takezaki N (2001) <http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/Programs.html>.
- Takezaki N, and Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144:389-399.
- Tourret N, López Camelo J, and Vidal-Rioja L (1999) Allele frequencies of six STR loci in Argentine populations. *J Forensic Sci* 44(6):1265-1269.
- Zabala Fernández WM, Borjas-Fajardo L, Fernández Salgado E, Castillo C, Socca L, Portillo MG, Sánchez MA, Delgado W, Morales-Machin A, Layrisse Z, and Pineda Bernal L (2005) Use of short tandem repeats loci to study the genetic structure of several population from Zulia state, Venezuela. *Am J Hum Biol* 17(4):451-459.

TABLE 1. Allele frequencies for the 15 STRs studied in five Native populations of Argentinean Chaco (highest frequencies in bold).

Systems and alleles	Pilagá	Toba-Ch	Toba-For	Wichí-Ch	Wichí-For
CSF1PO					
*9	0.021	0	0.022	0.022	0.095
*10	0.125	0.174	0.304	0.065	0.191
*11	0.292	0.239	0.196	0.283	0.310
*12	0.500	0.544	0.413	0.630	0.405
*13	0.063	0.044	0.044	0	0
*14	0	0	0.022	0	0
N	24	23	23	23	21
D2S1338					
*16	0.020	0.019	0	0	0
*17	0.280	0.154	0.152	0.022	0.143
*18	0.240	0.077	0.130	0.326	0.191
*19	0.120	0.135	0.174	0.217	0.095
*20	0.020	0.135	0.044	0	0.071
*21	0	0	0	0	0.024
*22	0.080	0.019	0.130	0.044	0.286
*23	0.220	0.462	0.326	0.391	0.119
*24	0	0	0	0	0.071
*25	0.020	0	0.044	0	0
N	25	26	23	23	21
D3S1358					
*12	0	0	0	0.060	0
*13	0.020	0	0	0	0
*14	0.080	0	0.022	0	0.035
*15	0.320	0.769	0.587	0.380	0.535
*16	0.360	0.154	0.239	0.360	0.259
*17	0.200	0.058	0.109	0.180	0.138
*18	0.020	0.019	0.044	0.020	0.035
N	25	26	23	25	29
D5S818					
*7	0.160	0.115	0.109	0	0.086
*9	0.120	0.173	0.196	0.280	0.207
*10	0.100	0	0	0.020	0.035
*11	0.420	0.577	0.609	0.360	0.500
*12	0.160	0.115	0.087	0.340	0.155
*13	0.040	0.019	0	0	0.017
N	25	26	23	25	29

TABLE 1 (cont.). Allele frequencies for the 15 STRs studied in five Native populations of Argentinean Chaco (highest frequencies in bold).

Systems and alleles	Pilagá	Toba-Ch	Toba-For	Wichí-Ch	Wichí-For
D7S820					
*8	0.083	0	0.044	0	0.019
*9	0.021	0.046	0.022	0.024	0.019
*10	0.333	0.250	0.239	0.143	0.148
*11	0.167	0.364	0.283	0.476	0.426
*12	0.208	0.182	0.326	0.119	0.204
*13	0.188	0.114	0.087	0.214	0.167
*14	0	0.046	0	0.024	0.019
N	24	22	23	21	27
D8S1179					
*10	0.060	0.019	0.087	0.020	0.069
*11	0.140	0.250	0.152	0.100	0.155
*12	0.040	0.115	0.065	0.100	0.069
*13	0.280	0.365	0.239	0.300	0.379
*14	0.340	0.173	0.304	0.240	0.155
*15	0.120	0.058	0.152	0.240	0.172
*16	0.020	0.019	0	0	0
N	25	26	23	25	29
D13S317					
*8	0.020	0.058	0.044	0	0.017
*9	0.220	0.365	0.239	0.300	0.379
*10	0.060	0.077	0.022	0.120	0.052
*11	0.200	0.077	0.196	0.340	0.241
*12	0.180	0.289	0.239	0.200	0.172
*13	0.200	0.115	0.217	0.040	0.103
*14	0.060	0.019	0.044	0	0.035
*15	0.060	0	0	0	0
N	25	26	23	25	29
D16S539					
*8	0.020	0	0.044	0	0
*9	0.180	0.346	0.217	0.140	0.121
*10	0.200	0.192	0.261	0.320	0.345
*11	0.240	0.154	0.109	0.220	0.207
*12	0.220	0.250	0.283	0.140	0.172
*13	0.140	0.039	0.087	0.180	0.155
*14	0	0.019	0	0	0
N	25	26	23	25	29

TABLE 1 (cont.). Allele frequencies for the 15 STRs studied in five Native populations of Argentinean Chaco (highest frequencies in bold).

Systems and alleles	Pilagá	Toba-Ch	Toba-For	Wichí-Ch	Wichí-For
D18S51					
*10	0	0	0.022	0	0
*11	0	0	0	0.026	0
*12	0.229	0.064	0.087	0	0.127
*13	0.104	0.149	0.239	0.237	0.109
*14	0.313	0.319	0.304	0.605	0.291
*15	0.188	0.149	0.087	0	0.127
*16	0.063	0.085	0.065	0.026	0.127
*17	0.021	0.170	0.152	0.079	0.109
*18	0	0.043	0.022	0	0.055
*19	0.021	0.021	0.022	0	0.055
*20	0.063	0	0	0.026	0
N	24	23	23	19	27
D19S433					
*10	0.020	0	0	0	0
*12	0.020	0.289	0.109	0.080	0.086
*12.2	0.020	0	0	0	0
*13	0.140	0.096	0.152	0.200	0.103
*13.2	0.220	0.327	0.174	0.280	0.362
*14	0.240	0.115	0.304	0.080	0.155
*14.2	0.080	0	0	0	0
*15	0.160	0.115	0.217	0.200	0.241
*15.2	0.080	0.039	0.022	0.100	0.035
*16	0.020	0.019	0.022	0.060	0.017
N	25	26	23	25	29
D21S11					
*27	0.020	0.019	0.022	0	0
*28	0.041	0.039	0	0.020	0.035
*29	0.163	0.212	0.174	0	0.035
*30	0.225	0.154	0.217	0.400	0.310
*31	0.041	0.039	0.065	0	0.035
*31.2	0.225	0.269	0.370	0.200	0.207
*32.2	0.225	0.231	0.109	0.300	0.276
*33.2	0.061	0.039	0.044	0.080	0.103
N	24	26	23	25	29

TABLE 1 (cont.). Allele frequencies for the 15 STRs studied in five Native populations of Argentinean Chaco (highest frequencies in bold).

Systems and alleles	Pilagá	Toba-Ch	Toba-For	Wichí-Ch	Wichí-For
FGA					
*18	0	0.039	0	0	0
*19	0.120	0.115	0.022	0	0
*20	0.020	0	0.022	0	0.103
*21	0.160	0.019	0.022	0	0.017
*22	0.060	0	0.022	0	0.035
*23	0.120	0.077	0.196	0.250	0.172
*23.2	0	0.058	0	0	0
*24	0.200	0.173	0.152	0.104	0.035
*25	0.200	0.289	0.391	0.417	0.293
*26	0.100	0.231	0.174	0.188	0.310
*27	0.020	0	0	0.042	0.017
*28	0	0	0	0	0.017
N	25	26	23	24	29
TH01					
*6	0.220	0.231	0.239	0.300	0.276
*7	0.560	0.712	0.674	0.660	0.638
*8	0.040	0	0	0	0
*9	0.060	0	0.022	0.020	0
*9.3	0.120	0.058	0.065	0.020	0.086
	25	26	23	25	29
TPOX					
*8	0.460	0.462	0.435	0.260	0.362
*9	0.080	0	0.022	0	0
*10	0.020	0	0.022	0.060	0.052
*11	0.380	0.327	0.370	0.520	0.328
*12	0.040	0.212	0.152	0.160	0.259
*13	0.020	0	0	0	0
N	25	26	23	25	29
VWA					
*14	0.040	0	0	0	0
*15	0.040	0	0.065	0	0.035
*16	0.320	0.500	0.478	0.540	0.483
*17	0.280	0.365	0.261	0.420	0.362
*18	0.280	0.115	0.174	0.040	0.103
*19	0.040	0	0.022	0	0.017
*20	0	0.019	0	0	0
N	25	26	23	25	29

TABLE 2. Number of alleles (in parentheses those present in that population only) in 15 STRs and average heterozygosity (Het.) in five Native populations of Argentinean Chaco.

Locus	Pilagá	Toba-Ch	Toba-For	Wichí-Ch	Wichí-For	South American Indians ^a	
						Range	No. of samples
CSF1PO	5	4	6	4	4	3 – 7	18
D2S1338	8	7	7	5	8	3 – 10	5
D3S1358	6 (1)	4	5	5	5	2 – 7	16
D5S818	6	5	4	4	6	3 – 8	17
D7S820	6	6	6	6	7	3 – 8	17
D8S1179	7	7	6	6	6	4 – 9	16
D13S317	8	7	7	5	7	4 – 8	20
D16S539	6	6	6	5	5	4 – 6	10
D18S51	8	8	9 (1)	6	8	4 – 12	15
D19S433	6 (1)	5	5	5	5	4 – 5	5
D21S11	7	7	6	5	6	3 – 12	15
FGA	9	7	8	5	9	5 – 13	15
TH01	4	3	3	3	3	2 – 7	17
TPOX	6	3	5	4	4	3 – 6	15
VWA	6	4	5	3	5	3 – 10	22
Mean no. of alleles	6.5	5.5	5.9	4.7	5.9		
± SE	± 1.30	± 1.64	± 1.51	± 0.96	± 1.68		
Mean Het.	0.79	0.72	0.74	0.68	0.75		
± SE	± 0.019	± 0.037	± 0.027	± 0.027	± 0.024		

(a) Sources: Gené *et al.* (1996), Gené *et al.* (1998), Sala *et al.* (1998), Deka *et al.* (1999), Guarino *et al.* (1999), Sala *et al.* (1999), Tourret *et al.* (1999), Gené *et al.* (2000), Hutz *et al.* (2002), Zabala Fernández *et al.* (2005), González-Andrade *et al.* (2006), and Kohlrausch *et al.* (2005).

TABLE 3. Analysis of population structure: average individual membership score in each of the four inferred clusters for six Chaco populations.

Population	Sample size	Average membership in the inferred cluster			
		A	B	C	D
Ayoreo	45	0.912	0.026	0.028	0.035
Pilagá	25	0.012	0.177	0.246	0.566
Toba-Ch	26	0.019	0.246	0.557	0.178
Toba-For	23	0.036	0.253	0.387	0.324
Wichí-Ch	25	0.033	0.766	0.072	0.129
Wichí-For	29	0.027	0.529	0.171	0.273

TABLE 4. Estimates of genetic diversity based on 13 autosomal STRs in 14 Native South American populations.

Population / Region	Heterozygosity		G _{ST'}	Among populations % of variation*
	Within populations	Total		
Pilagá	0.780 ± 0.0219			
Toba-Ch	0.699 ± 0.0406			
Toba-For	0.732 ± 0.0297			
Wichí-Ch	0.682 ± 0.0289			
Wichí-For	0.736 ± 0.0249			
Argentinean Chaco	0.696	0.718	0.031	0.018
Ayoreo ^a	0.619 ± 0.0326			
Gran Chaco	0.681	0.722	0.057	0.071
Gavião ^b	0.749 ± 0.0233			
Suruí ^b	0.652 ± 0.0313			
Waiwai ^b	0.727 ± 0.0268			
Zoró ^b	0.698 ± 0.0338			
Amazon	0.679	0.713	0.048	0.041
Aché ^a	0.584 ± 0.0414			
Kaingang ^a	0.764 ± 0.0177			
Guarani ^a	0.687 ± 0.0230			
Xavante ^a	0.699 ± 0.0294			
Savannah and Sub-tropical forest	0.667	0.725	0.080	0.090
South America	0.675	0.732	0.078	0.074

* AMOVA analyses using 11 STRs. P<0.0001 for all estimates.

^a Kohlrausch *et al.* (2005), ^b Hutz *et al.* (2002).

LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. Geographic location of the Argentinean Chaco populations.

Fig. 2. Individual's estimated membership fractions in $K=4$ inferred clusters. Individuals of the different Chaco populations labeled below the figure are separated by black vertical lines.

Fig.3. Non-metric multidimensional scaling plot of six Native populations of Gran Chaco based on D_A distances obtained with 15 STR loci. W-Ch: Wichí from the Chaco province, W-For: Wichí from the Formosa province, T-Ch: Toba from the Chaco province, T-For: Toba from the Formosa province, Pil: Pilagá, Ayo: Ayoreo.



FIG.1

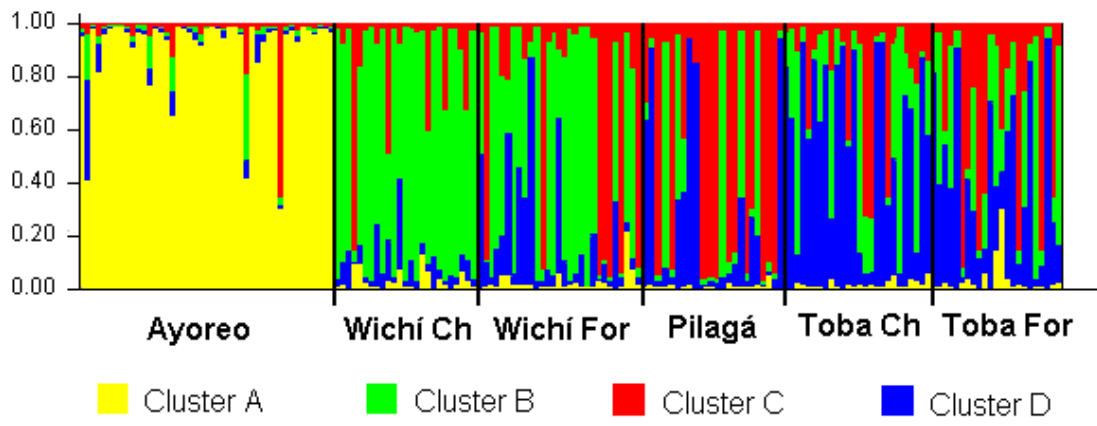


FIG 2.

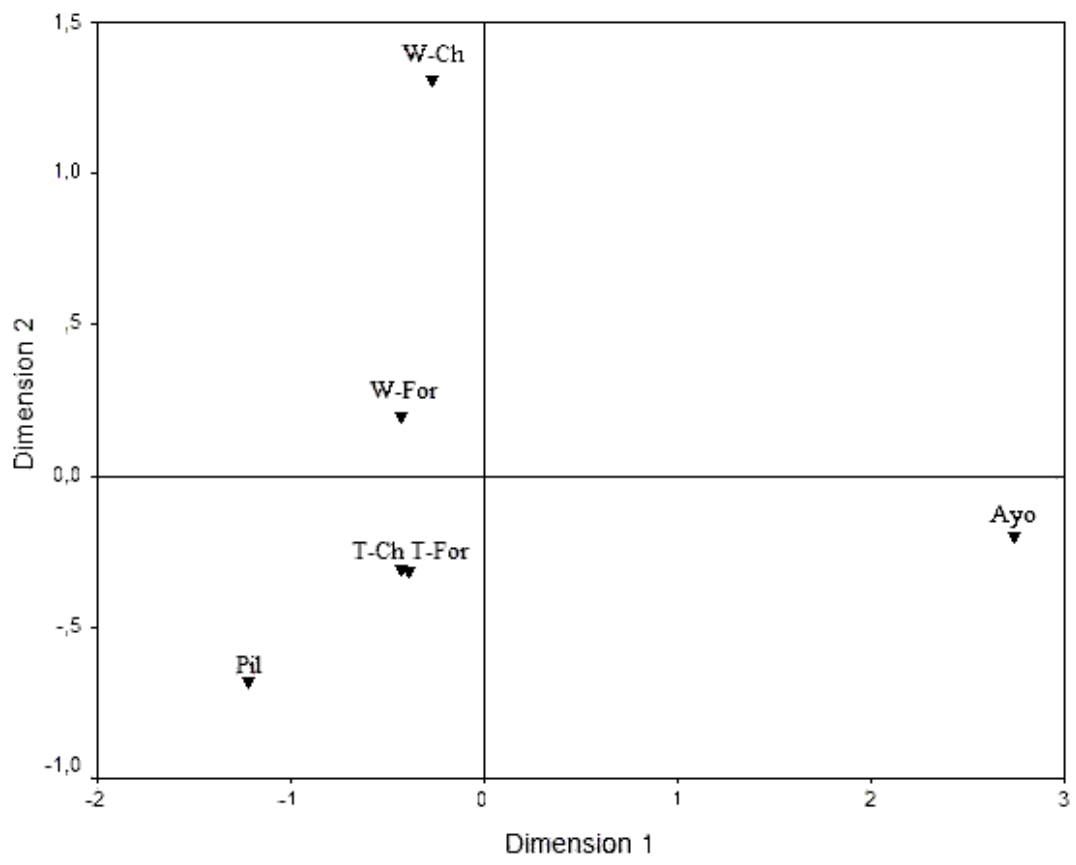


FIG. 3

6 Discussão

A discussão detalhada dos resultados obtidos no presente estudo encontra-se no artigo (capítulo 5). Discutiremos a seguir alguns pontos gerais relacionados ao estudo das populações nativas americanas e as perspectivas de continuidade deste trabalho.

O continente americano, em tempos pré-colombianos, foi povoado por numerosas populações de diversos tipos culturais, desde simples caçadores e coletores nômades até exímios agricultores, que criavam animais, dominavam técnicas rudimentares de metalurgia e alguns chegaram a construir verdadeiros impérios. Após o processo de invasão europeu, o número de indígenas caiu drasticamente e muitas culturas foram extintas já no primeiro século de contato. Dos nativos americanos remanescentes, muitos deles passaram por um intenso processo de aculturação, vivendo hoje nas periferias das cidades ou trabalhando em latifúndios, enquanto outros habitam reservas governamentais. Porém em muitos países o reconhecimento de territórios indígenas ainda é incipiente, e muitas vezes ocorre sob violentos protestos.

Ainda assim, a América continua sendo o berço de uma grande diversidade lingüística e cultural. Certamente muitas diferenças genéticas podem ser, e já foram, detectadas ao longo do continente. Algumas delas são clinais, enquanto outras são mais abruptas. De certa maneira isto é esperado, devido aos movimentos populacionais variados e aos distintos ambientes que estes povos tiveram que enfrentar (Salzano, 2002).

Os padrões de variação genética dos grupos indígenas são mais bem interpretados quando aspectos como demografia, isolamento, movimentos migratórios, relações intertribais, padrões de casamento e afinidades lingüísticas são levados em consideração. No trabalho aqui descrito, foi possível relacionar a variabilidade genética relativamente

baixa da população Wichí da província de Chaco com o isolamento geográfico da mesma. Por outro lado, a alta diversidade obtida na amostra Pilagá seria efeito de mistura com Euro-descendentes, conforme sugerido pela análise de agrupamento (maiores detalhes no capítulo 5, em Results and Discussion).

A similaridade genética dos Toba de Formosa, tanto com populações de mesmo grupo lingüístico como com os Wichí, de outra língua, e a sua posição central no gráfico do escalonamento multidimensional (MDS) poderia ser consequência de aspectos sócio-demográficos históricos que teriam favorecido o contato entre os povos.

A aquisição do cavalo pelos povos Guaykurú, entre eles os Toba, no século XVII desencadeou mudanças culturais profundas. Os cavalos proveram maior mobilidade, índios do Chaco leste puderam se deslocar por áreas muito mais extensas para encontrar novos territórios de coleta e caça. A formação de cavalarias possibilitou o desenvolvimento de novas táticas bélicas contra espanhóis e outros índios. A intensificação dos contatos não amistosos provavelmente gerou um aumento no número de inimigos capturados, os homens das tribos adversárias raramente eram poupados, mas as mulheres e crianças cativas eram incorporadas ao grupo (Steward e Faron, 1959).

Outro aspecto que teria favorecido o contato entre grupos diversos foi a pesca sazonal praticada nos rios Bermejo, Pilcomayo e Salado. Índios que habitavam os interiores áridos viajavam para estes rios durante as grandes estações de pesca, as quais duravam de dois a três meses. Não é claro se, nos tempos pré-colombianos, foram reivindicados direitos de pesca de qualquer tipo. No período pós-hispânico, muitos povos do interior, como os Matacos, mesmo estabelecidos nas margens de rios desafiavam os habitantes permanentes ou obtinham permissão para permanecer e pescar durante a

estação. Índios eqüestres (Guaykurú), incluindo aqueles que talvez tenham previamente pescado pouco, também visitavam estes rios (Steward e Faron, 1959). A concentração de povos em torno das relativamente escassas fontes de alimento teria facilitado o contato tanto amistoso quanto o não amistoso entre as populações.

Os resultados do presente estudo indicam a existência de uma homogeneidade genética no Chaco Central (representado pelas populações Guaykurú – Toba e Pilagá e Mataco - Wichí) concordando com resultados anteriores relativos a marcadores protéicos e moleculares uniparentais e autossômicos (Goicoechea *et al.*, 2001; Demarchi *et al.*, 2001; Demarchi e Mitchell, 2004; Dejean *et al.*, 2004 e Cabana *et al.*, 2006). Semelhanças culturais entre Guaykurú e Mataco foram também apontadas pelos antropólogos, sendo elas explicadas pela proximidade geográfica e influência de povos andinos e amazônicos (Hernández, 1992). Por outro lado a criação de um cluster Macro-Waikurú reunindo línguas das famílias Mataco, Gauykurú, Charrua e Mascoy foi sugerido pelos lingüistas , mas ainda deve ser submetida a testes específicos (Campbell, 1997).

Estas sugestões de outros especialistas vão ao encontro dos resultados de homogeneidade observada pelos geneticistas.

Porém os Ayoreo do Chaco Boreal mostraram-se bem diferenciados geneticamente dos demais nativos do Chaco. Este fato foi observado em informações morfológicas (Demarchi *et al.*, 1998), marcadores protéicos (Salzano e Callegari-Jacques, 1988; Goicoechea *et al.*, 2001) e também em marcadores moleculares autossomos (Kohlrausch *et al.*, 2005) e mtDNA (Dornelles *et al.*, 2004; Cabala *et al.*, 2006). No presente trabalho, os resultados do método de agrupamento de Pritchard *et al.* (2000), do escalonamento multidimensional e das análises de estruturação populacional confirmaram a diferenciação

genética dos Ayoreo e a homogeneidade das populações do Chaco central. Isto pode indicar que a homogeneidade seja relativa a toda a região central chaqueense ou esteja restrita aos grupos Guaykurú e Mataco, já que existem outras tribos na região. Portanto, uma perspectiva futura seria avaliar a diversidade e as relações genéticas em outras famílias lingüísticas. Outra questão que deveria ser levantada é: A homogeneidade observada no Chaco central seria restrita a esta região ou é uma característica de todo Gran Chaco, os Ayoreo seriam o único grupo isolado com características evolutivas próprias? Para responder esta indagação seria necessário incluir outras populações do Chaco Austral e Boreal em um estudo mais abrangente.

Uma outra abordagem que pode ser dada a estes dados, e que já está sendo implementada, é avaliar qual o grau de diferenciação genética entre populações que ou falam a mesma língua ou usam dialetos próximos. Estas populações estão localizadas em três regiões geográficas distintas: o Chaco central (língua Wichí da família Mataco e línguas Toba e Pilagá da família Guaykurú), a amazônica (línguas Aruá e Suruí do ramo Tupi-Mondé) e da floresta subtropical, abrangendo o Mato Grosso do Sul e província de Misiones, Argentina (três dialetos da língua guarani: Mbyá, Ñandeva e Kaiowá), o que propiciaria uma melhor avaliação das relações entre genética, língua e geografia em populações nativa sul-americanas.

O presente trabalho buscou caracterizar a variabilidade genética de cinco populações do Chaco, uma importante área de transição cultural e ecológica do continente. Estes dados, em conjunto com aqueles obtidos por Guarino *et al.* (1999), Hutz *et al.* (2002), Kohlrausch *et al.* (2005), González-Andrade (2006) e outros, podem também contribuir para uma análise de como teria ocorrido o processo de povoamento da América

do Sul. J. L. Lanata (comunicação pessoal) usou um modelo matemático que leva em consideração a existência de “corredores” ambientais e as mudanças temporais no ambiente para simular a dispersão humana neste continente. A conclusão é de que este processo teria características próprias, e seria mais bem compreendido se visto sob a perspectiva de três zonas geográficas - Amazônia, Andes e cone-sul (que inclui o Chaco) - nas quais o processo de povoamento teria ocorrido de maneira distinta, condicionando a diversidade cultural e genética com padrões distintos entre estas regiões. Indicações de que a variabilidade genética na América do Sul não é a mesma nestas três áreas geográficas foram obtidas por S. M. Callegari-Jacques *et al.* (manuscrito submetido à publicação, 2007), usando dados de haplótipos da globina - β .

Apesar da quantidade relativamente grande de dados genéticos atualmente disponíveis para a América do Sul, esta informação é altamente heterogênea em relação às populações e aos tipos de sistemas utilizados (Salzano, 2002). Do início da década 1990 até os dias de hoje, é cada vez maior a aplicação dos marcadores STR em estudos populacionais humanos, muitas vezes de forma heterogênea, envolvendo sistemas distintos e em número variado; os estudos mais antigos empregavam desde um até algumas dezenas e os mais recentes até 783 STRs (ver capítulo 3). Certamente este tipo de metodologia, envolvendo centenas de marcadores espalhados pelo genoma, será amplamente empregada, sendo o primeiro passo no avanço tecnológico em direção daquilo que poderemos chamar de “genômica populacional”.

Contudo, os estudos atuais limitam-se às populações do Centro de Estudo do Polimorfismo Humano (CEPH), um conjunto de pouco mais de 50 populações espalhadas pelo mundo. Neste banco de dados o continente americano é pobremente representado por

apenas cinco populações sendo que três são de nativos sul americanos: Karitiana, Colômbia e Suruí. Deve-se notar porém que os Suruí apresentam uma baixa diversidade genética, associada a um intenso *bottleneck* em decorrência do contato com não-índios. Zago *et al.* (1996), após investigarem seis locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) em cinco populações ameríndias, concluíram que o estudo de um número pequeno de tribos, mesmo que um grande número de indivíduos seja amostrado, pode não ser representativo da variabilidade genética dos nativos americanos, porque a deriva genética e o efeito do fundador em sub-populações pequenas produzem grandes diferenças na distribuição alélica. Logo, para se conhecer a extensão da variabilidade dos ameríndios e ter uma visão adequada da evolução é necessário estudar um número grande de populações.

Neste contexto, o uso dos 15 STRs utilizados no presente estudo é promissor, já que a genotipagem é feita utilizando kit comercial mutiplex, de aplicação forense crescente, o que levará à caracterização genética de um número cada vez maior de populações; atualmente existem seções em revistas da área destinadas apenas a divulgar as frequências destes marcadores. A genotipagem destes sistemas é rápida e requer pouco DNA, podendo ser realizada com sucesso mesmo em amostras antigas e degradadas. Além disto, face à atual dificuldade de obtenção de amostras de indivíduos nativos, que vai desde aspectos da logística (chegar até as aldeias remanescentes) até a recusa dos próprios nativos em fornecer amostras de sangue ou saliva, o emprego deste conjunto de sistemas é uma alternativa atraente. Os genótipos podem ser determinados usando-se quantidades ínfimas de DNA, a partir de material coletado antigo, o que possibilita ampliar o número de populações estudadas para uma melhor avaliação da variabilidade genética do extenso e

diverso continente sul americano, contribuindo para o entendimento do processo evolutivo humano nesta região.

7 Referências Bibliográficas

7 Referências bibliográficas

- Amos W, Sawcer SJ, Feakes RW e Rubinsztein DC (1996) Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nat Genet* 13:390-391.
- Bennett LB, Shriver MD e Bowcock AM (1998) Markers and methods for reconstructing modern human history. *DNA Seq* 8:329-341.
- Birnboim HC e Straus NA (1975) DNA from eukaryotic cells contains unusually long pyrimidine sequences. *Can J Biochem* 53:640-643.
- Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SP, Bau CH, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Hill K, Hurtado AM, Castro-de-Guerra D, Torres MM, Groot H, Michalski R, Nymadawa P, Bedoya G, Bradman N, Labuda D e Ruiz-Linares A (2003) Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet* 73:524-539.
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR e Cavalli-Sforza LL (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457.
- Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Huhne J e Rolf B (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 62:1408-1415.
- Brohede J, Primmer CR, Moller A e Ellegren H (2002) Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Res* 30:1997-2003.
- Cabana GS, Merriwether DA, Hunley K e Demarchi DA (2006) Is the genetic structure of Gran Chaco populations unique? Interregional perspectives on native South American mitochondrial DNA variation. *Am J Phys Anthropol* 131:108-119.
- Calafell F, Shuster A, Speed WC, Kidd JR. e Kidd KK (1998) Short tandem repeat polymorphism evolution in humans. *Eur J Hum Genet* 6:38-49.
- Campbell L (1997) *American Indian Languages: The Historical Linguistics of Native America*. Oxford: Oxford University Press.
- Carvalho SMS (1992) Chaco: Encruzilhada de povos e "melting pot" cultural. In Carneiro da Cunha M (ed.) *História dos índios no Brasil*. Companhia das Letras, São Paulo, pp 457-462.

- Chambers GK e MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126:455-476.
- Dejean CB, Crouau-Roy B, Goicoechea AS, Avena SA e Carnese FR (2004) Genetic variability in Amerindian populations of Northern Argentina. *Genetics and Mol Biol* 27: 489-495.
- Demarchi DA e Mitchell RJ (2004) Genetic structure and gene flow in Gran Chaco populations of Argentina: evidence from Y-chromosome markers. *Hum Biol* 76:413-429.
- Demarchi DA, Panzetta-Dutari GM, Motran CC, Lopez de Basualdo MA e Marcellino AJ (2001) Mitochondrial DNA haplogroups in Amerindian populations from the Gran Chaco. *Am J Phys Anthropol* 115:199-203.
- DiRienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M e Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:3166-3170.
- Dornelles CL, Battilana J, Fagundes NJ, Freitas LB, Bonatto SL e Salzano FM (2004) Mitochondrial DNA and Alu insertions in a genetically peculiar population: the Ayoreo Indians of Bolivia and Paraguay. *Am J Hum Biol* 16:479-488.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA e Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49:746-756.
- Ellegren H (2000) Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet* 24:400-402.
- Goicoechea AS, Carnese FR, Dejean C, Avena SA, Weimer TA, Estalote AC, Simoes ML, Palatnik M, Salamoni SP, Salzano FM e Callegari-Jacques SM (2001) New genetic data on Amerindians from the Paraguayan Chaco. *Am J Hum Biol* 13:660-667.
- Goldstein DB e Pollock DD (1996) A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. <http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat/microdist.html>.
- González-Andrade F, Sánchez-QD e Martínez-Jarreta B (2006) Genetic analysis of the Amerindian Kichwas and Afroamerican descendents populations from Ecuador characterized by 15 STR-PCR polymorphisms. *Forensic Sci Int* 160(2-3):231-235.
- Guarino FD, Federle L, Van Oorschot RAH, Briveno I, Bernal JE, Papiha SS, Schanfield MS e Mitchell RJ (1999) Genetic diversity among five Native American tribes of

- Colombia. In Papiha SS, Deka R e Chakraborty (eds.) *Genomic Diversity: Applications in Human Population Genetics*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp. 33-51.
- Harr B e Schlotterer C (2000) Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide underrepresentation. *Genetics* 155:1213-20.
- Harr B, Todorova J e Schlotterer C (2002) Mismatch repair-driven mutational bias in *D. melanogaster*. *Mol Cell* 10:199-205.
- Hernández I (1992) *Los indios de Argentina*. MAPFRE, Madrid.
- Huang QY, Xu FH, Shen H, Deng HY, Liu YJ, Liu YZ, Li JL, Recker RR e Deng HW (2002) Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am. J. Hum Genet* 70:625-634.
- Hutz MH, Callegari-Jacques SM, Almeida SE, Armbrorst T e Salzano FM (2002) Low levels of STRP variability are not universal in American Indians. *Hum Biol* 74:791-806.
- Jin L, Baskett ML, Cavalli-Sforza LL, Zhivotovsky LA, Feldman MW e Rosenberg NA (2000) Microsatellite evolution in modern humans: a comparison of two data sets from the same populations. *Ann Hum Genet* 64:117-134.
- Jorde LB, Rogers AR, Bamshad M, Watkins WS, Krakowiak P, Sung S, Kere J. e Harpending HC (1997) Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3100-103.
- Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ, Dixon ME, Ricker CE, Seielstad MT e Batzer MA (2000) The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. *Am J Hum Genet* 66:979-988.
- Kohlrausch FB, Callegari-Jacques SM, Tsuneto LT, Petzl-Erler,ML, Hill K, Hurtado AM, Salzano FM e Hutz MH (2005) Geography influences microsatellite polymorphism diversity in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 126:463-470.
- Levinson G e Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4:203-21.
- Litt M e Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:397-401.

- Messier W, Li SH e Stewart CB (1996) The birth of microsatellites. *Nature* 381-383.
- Métraux A (1946) Ethnography of the Chaco. In Steward J (ed.) *Handbook of South American Indians*, vol. 1. Government Printing Office, Washington, pp 197-224.
- Miller E (1979) *Los Tobas argentinos. Armonía y disonancia en una sociedad*. Siglo XXI, México.
- Ota T e Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res* 22:201-204.
- Pericot y Garcia L (1964) *El hombre americano - Los pueblos de America*. Historia de America. Salvat, Barcelona,
- Petit RJ, Deguilloux MF, Chat J, Grivet D, Garnier-Gere P e Vendramin GG (2005) Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. *Mol Ecol* 14:885-890.
- Primmer CR, Moller AP e Ellegren H (1996a) A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol Ecol* 5:365-378.
- Primmer,CR, Saino N, Moller AP e Ellegren H (1996b) Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nat Genet* 13:391-393.
- Pritchard JK, Stephens M, e Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-59.
- Ramachandran S, Deshpande O, Roseman CC, Rosenberg NA, Feldman MW e Cavalli-Sforza LL (2005) Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15942-15947.
- Reich DE e Goldstein DB (1998) Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8119-8123.
- Riveros F (2000) *The Gran Chaco*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Crop and Grassland Service, Plant Production and Protection Division. <http://www.fao.org/ag/AGP/agpc/doc/Bulletin/GranChaco.htm>.
- Rose O e Falush D (1998) A threshold size for microsatellite expansion. *Mol Biol Evol* 15:613-615.
- Rosenberg NA, Mahajan S, Ramachandran S, Zhao C, Pritchard JK e Feldman MW (2005) Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human

population structure. PLoS Genet 1(6):epub70. <http://genetics.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pgen.0010070>.

Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA e Feldman MW (2002) Genetic structure of human populations. *Science* 298:2381-2385.

Sahoo S e Kashyap VK (2005) Influence of language and ancestry on genetic structure of contiguous populations: a microsatellite based study on populations of Orissa. *BMC Genet* 6(1):epub4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/6/4>

Sainudiin R, Durrett RT, Aquadro CF e Nielsen R (2004) Microsatellite mutation models: insights from a comparison of humans and chimpanzees. *Genetics* 168:383-395.

Salzano FM (2002) Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc* 74:223-263.

Salzano FM e Callegari-Jacques SM (1988) South American Indians a case study in evolution. Clarendon Press, Oxford.

Salzano FM e Callegari-Jacques SM (2006) Amerindian and NonAmerindian autosome molecular variability-a test analysis. *Genetica* 126:237-242.

Schlotterer C (1998) Genome evolution: are microsatellites really simple sequences. *Curr Biol* 8:R132-R134.

Schlotterer C e Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20:211-215.

Serre D e Paabo S (2004) Evidence for gradients of human genetic diversity within and among continents. *Genome Res* 14:1679-685.

Steward JH e Faron LC (1959) Native people of South America. McGraw-Hill, New York,

Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17:6463-6471.

Weber JL e May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-396.

Weber JL e Wong C (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2:1123-1128.

Wierdl M, Dominska M e Petes TD (1997) Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* 146:769-779.

- Xu X, Peng M e Fang Z (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet* 24:396-399.
- Zago MA, Silva Junior WA, Tavella MH, Santos SE, Guerreiro JF e Figueiredo MS (1996) Interpopulational and intrapopulational genetic diversity of Amerindians as revealed by six variable number of tandem repeats. *Hum Hered* 46:274-289.
- Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA e Hammer MF (2004) High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol Biol Evol* 21:164-175.
- Zhivotovsky LA, Bennett L, Bowcock AM e Feldman MW (2000) Human population expansion and microsatellite variation. *Mol Biol Evol* 17:757-767.
- Zhivotovsky LA, Rosenberg NA e Feldman MW (2003) Features of evolution and expansion of modern humans, inferred from genomewide microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 72:1171-1186.
- Zhu Y, Queller DC e Strassmann JE (2000) A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *J Mol Evol* 50:324-338.