

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

**DINÂMICA DA MISTURA ÉTNICA EM
COMUNIDADES REMANESCENTES DE
QUILOMBO BRASILEIRAS**

Marcelo Rizzatti Luizon

Ribeirão Preto
2007

Marcelo Rizzatti Luizon

**DINÂMICA DA MISTURA ÉTNICA EM
COMUNIDADES REMANESCENTES DE
QUILOMBO BRASILEIRAS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor

Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

**Ribeirão Preto
2007**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Luizon, Marcelo Rizzatti.

Dinâmica da mistura étnica em comunidades remanescentes de quilombo Brasileiras / Marcelo Rizzatti Luizon ; orientador Aguinaldo Luiz Simões. – Ribeirão Preto, 2007.

115 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética.) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Mistura étnica. 2. Comunidades remanescentes de quilombo. 3. Marcadores informativos de ancestralidade. 4. Genética de populações humanas. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Rizzatti Luizon

Dinâmica da mistura étnica em comunidades remanescentes de quilombo
Brasileiras

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor
Área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A toda minha família, sem dúvida o bem mais precioso que possuo.
Em especial aos meus pais e irmãos, pela força que sempre me transmitem,
que me mantêm firme em minha caminhada.

Agradeço imensamente.

Agradecimentos

Ao Dr. Aguinaldo Luiz Simões, pela oportunidade, confiança, amizade, e pela contribuição para o meu crescimento científico.

Às Profas. Dras. Ana Angélica Leal Barbosa, Kiyoko Abé Sandes, Sandra Mara Bispo Sousa e Iliada Rainha de Souza pela grande colaboração neste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e, dessa forma, contribuir com minha formação.

Ao professores e funcionários do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelos ensinamentos e acolhida.

Ao Prof. Mark D. Shriver, da Universidade da Pennsylvania, por ter compartilhado seus dados, o que permitiu enriquecer o nosso trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de Doutorado para a realização desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica e do Bloco C deste Departamento, pela agradável convivência durante estes anos.

Às amigas Maria e Ana Lúcia, pela atenção que sempre me dispensaram na discussão das dúvidas sobre a parte laboratorial do trabalho.

Aos amigos Cláudia, Celso e Sandra pela ajuda nas análises estatísticas, nas discussões e na revisão do texto.

À Yara pelo companheirismo durante todos estes anos, pela ajuda na revisão do texto e pela diagramação desta Tese.

Resumo

LUIZON, M. R. **Dinâmica da mistura étnica em comunidades remanescentes de quilombo Brasileiras.** 2007. 115 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Apesar da intensa mistura étnica na formação da população Brasileira, pequenos grupos isolados ainda podem ser encontrados, principalmente representados pelas tribos indígenas e comunidades remanescentes de quilombo. As comunidades de Barra (BA), São Gonçalo (BA) e Valongo (SC) apresentam diferentes histórias demográficas de formação. Os AIMs (Marcadores Informativos de Ancestralidade) são capazes de revelar essas diferenças pois apresentam grandes diferenciais de frequência (δ) entre os principais grupos populacionais parentais (africanos, ameríndios, europeus) e, por esta razão, constituem polimorfismos com maior poder discriminante em estimativas de mistura étnica. No presente trabalho, foram testados oito AIMs na análise de três remanescentes de quilombo, comparados a duas amostras de população urbana brasileira. Um destes marcadores, o alelo *CYP1A1*2C*, foi testado em sete aldeias de quatro tribos da Amazônia Central Brasileira, completando a análise dos outros sete marcadores previamente realizados nestas populações ameríndias. Os objetivos, além da descrição formal de tais populações, incluíam comparar eventuais diferenças entre as comunidades quilombolas e verificar a eficiência relativa destes marcadores em estudos deste tipo. A comparação das frequências do alelo *CYP1A1*2C* entre os ameríndios e populações mundiais confirma este alelo como um excelente AIM para diferenciar ameríndios de europeus e africanos, informação importante em estimativas de mistura em populações tri-híbridas Brasileiras. As frequências de oito AIMs (FY-Null, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO, PV92 e *CYP1A1*2C*) foram então estimadas nas comunidades remanescentes de quilombo de Barra (n=47), São Gonçalo (n=51) e Valongo (n=25) e nas populações urbanas de Jequié (n=47) e Hemosc (Hemocentro de

Resumo

Santa Catarina, n=25) a partir dos fenótipos determinados por PCR e PCR-RFLP. As análises estatísticas empregaram programas já descritos (GENEPOP, DISPAN, GDA, STRUCTURE, MVSP e ADMIX 2 e 3). As frequências alélicas e genóticas diferenciam todas as comunidades remanescentes e urbanas, fato corroborado pelos valores de F_{ST} ($p < 0,01$) par a par entre elas. Outros valores de F_{ST} mostram similaridades da comunidade de Barra com africanos e da amostra Hemosc com Europeus, o que é confirmado pelas estimativas do componente africano em Barra (95%) e europeu no Hemosc (83%), como também pelas análises de componente principal. Nestas últimas, o *locus* FY foi a variável de maior peso (*loading*) sobre o primeiro componente principal e o PV92 o *locus* de maior peso sobre o segundo componente principal. Este método demonstrou-se particularmente adequado, pois, em ambas as análises, os dois componentes principais explicaram mais do que 95% da variância total. As estimativas dos componentes africano, europeu e ameríndio em São Gonçalo (68%, 22% e 10%) e JQ (52%, 31% e 17%) mostram que os AIMs geram estimativas de contribuição africana maiores do que as obtidas por STRs autossômicos, Y-STRs e marcadores clássicos nas mesmas populações. A estimativa do componente africano em Valongo (68%) foi menor que a obtida a partir dos marcadores clássicos. Isto poderia ser considerado como evidência da maior eficiência destes marcadores na quantificação do componente africano, uma vez que o aumento das estimativas não foi generalizado e, portanto, provavelmente não viciado. Conclui-se que os AIMs seriam mais eficientes para o cálculo da proporção relativa dos diferentes componentes formadores destas populações, pois conduziriam a estimativas mais realistas.

Palavras-chave: Mistura étnica. Comunidades remanescentes de quilombo. Marcadores informativos de ancestralidade.

Abstract

LUIZON, M. R. **Inter-ethnic admixture dynamics in Brazilian quilombo remnant communities.** 2007. 115 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007

In spite of the high degree of inter-ethnic admixture that characterizes the formation of the Brazilian population, small isolated groups, mainly represented by indigenous Amerindian tribes and communities known as quilombo remnants, can still be found. Barra (BA), São Gonçalo (BA) and Valongo (SC) are communities that presented different demographic histories during their formations. The AIMs (Ancestry Informative Markers) are capable of disclosing such differences due to the fact that they present large frequency differentials (δ) between the major ethnic groups that gave origin to the Brazilian population. This provides more reliable information for inter-ethnic admixture estimates. Given that, the present study aimed at establishing the differences regarding inter-ethnic admixture between these three quilombo remnants, which present different demographic histories. The *CYP1A1*2C* allele frequencies were established in four indigenous tribes from the Brazilian Amazon, which are characterized by low admixture degrees with non-Amerindian people (2-3%), and were compared with frequencies obtained in worldwide populations. This comparison evidenced that such allele is extremely useful for setting Amerindians apart from Europeans and Africans, which is an outstanding feature for estimation of admixture proportions in Brazilian tri-hybrid populations. Allele frequencies of eight AIMs (FY-Null, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO, PV92 and *CYP1A1*2C*) were obtained in three quilombo remnant communities, Barra (n=47), São Gonçalo (n=51) and Valongo (n=25), and in urban population samples from Jequié (n=47) and Hemosc (n=25), by means of PCR and PCR-RFLP. Statistical analysis were carried out employing the GENEPOP, DISPAN, GDA, STRUCTURE, MVSP and ADMIX 2 and 3 softwares. Allele and genotype

Abstract

frequencies are able to differentiate all quilombo remnant and urban samples, an aspect corroborated by the pair-wise F_{ST} ($p < 0.01$) values. Other F_{ST} estimates reveal similarities between Barra and Africans and between Hemosc and Europeans, which are supported by the respective African and European admixture estimates in Barra (95%) and Hemosc (83%) and by the Principal Component Analysis. In the latter analysis, the FY locus consisted in the variable with greatest influence (“loading”) over the first component. On the other hand, the variable PV92 exhibited the highest influence over the second component analysis. This method has proven to be very reliable, given that, in both analyses, the first two principal components explained more than 95% of the total variance. African, European and Amerindian inter-ethnic admixture estimates in São Gonçalo (68%, 22% and 10%) and JQ (52%, 31% and 17%) emphasize the fact that the AIMs provides higher African contribution estimates than the ones obtained by means of autosomal and Y-linked STRs and classical markers in the same populations. African contribution estimated in Valongo (68%) was lower than the one obtained by means of classical markers. Taken together, these estimates may be an evidence of higher effectiveness of this set of markers in quantifying the African component, as long as the increase in African contribution was not generalized and, hence, probably unbiased. In conclusion, the AIMs are more effective in estimating the admixture proportions of the different ethnic components that gave origin to these populations, given that they resulted in more reliable estimates.

Keywords: Ethnic admixture. Remnant quilombo communities. Ancestry informative markers.

Índice

INTRODUÇÃO.....	14
População brasileira tri-híbrida	14
Afro-descendentes e Comunidades Remanescentes de Quilombo.....	15
Atualização do Conceito de Quilombo.....	18
Mistura Étnica em Remanescentes de Quilombo.....	20
AIMs e Estimativas de Mistura Étnica.....	22
Desequilíbrio de ligação gerado por fluxo gênico.....	25
Comunidades analisadas neste trabalho	28
HIPÓTESE	30
OBJETIVOS.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
Esquema do trabalho	32
Comunidades Remanescentes de Quilombo	32
Caracterização da População de Barra	32
Caracterização da População de São Gonçalo.....	34
Caracterização da comunidade de Valongo.....	35
Populações urbanas	35
População de Jequié	35
População do Estado de Santa Catarina (HEMOSC).....	36
Tribos indígenas da Amazônia Brasileira.....	37
Tikúna.....	38
Kashinawa	38
Baniwa.....	38
Kanamarí	39
Aspectos Éticos	39
Coleta e conservação do Material.....	41
Amostras da Bahia.....	41
Amostras de Santa Catarina (HEMOSC)	42
Amostras das tribos indígenas	42
AIMs analisados	43
Análise laboratorial.....	45
Extração do DNA Genômico.....	45
Reagentes e Soluções:	45
Procedimento:.....	45
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	46
Reagentes e Soluções:	46
Procedimento:.....	47
Reação de Restrição	48

Índice

Análise do Produto Amplificado	49
Reagentes e Soluções:	49
Procedimento:	50
Coloração com Nitrato de Prata e Secagem do Gel	51
Reagentes e soluções:	51
Procedimento:	52
Análise estatística	53
Frequências Gênicas em Populações Ancestrais	53
Aderência ao equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	54
Desequilíbrio de Ligação entre Loci	55
Diferenciação genética das populações	56
Diversidade gênica	56
Inferência de Estrutura Populacional (<i>Structure</i>)	58
Análises de Componente Principal	58
Estimativas de mistura étnica	59
RESULTADOS	60
Frequências Alélicas e Heterozigose	60
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	64
Desequilíbrio de Ligação	66
Diversidade Interpopulacional (<i>estatísticas F</i>)	67
Coeficiente de Endogamia (F_{IS})	67
Diversidade inter-populacional (F_{ST} e G_{ST})	67
Estrutura populacional	69
Análise de componente principal	73
Estimativas de Mistura Étnica	76
DISCUSSÃO	78
Frequências alélicas e heterozigose	78
equilíbrio de Hardy-Weinberg	84
Desequilíbrio de Ligação entre <i>Loci</i>	86
<i>Estatística F</i> e diversidade inter-populacional	87
Coeficiente de endogamia (F_{IS})	87
Diversidade inter-populacional (F_{st})	89
Estrutura Populacional	90
Análises de Componente Principal	91
Estimativas de Mistura Étnica	93
CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	98
ANEXO	105

Lista de Tabelas

TABELA 1: Mistura étnica em comunidades afro-derivadas Brasileiras.....	21
TABELA 2. Estimativas de mistura africana (Afr), européia (Eur) e ameríndia (Amer) obtidas a partir de diferentes conjuntos de AIMs em populações Americanas.	23
TABELA 3: Localização citogenética, enzimas de restrição, seqüência dos <i>primers</i> e condições de PCR dos oito AIMs analisados.	44
TABELA 4: Condições de PCR para os AIMs analisados. Quantidade em µl suficiente para uma reação.	45
TABELA 5. Frequências alélicas dos oito AIMs e diversidade genética (H_S) nas comunidades remanescentes de quilombo, populações urbanas e ameríndias analisadas. As frequências se referem ao alelo <i>CYP1A1*2C</i> e aos alelos *1 dos demais <i>loci</i>	60
TABELA 6. Diferenciação das frequências gênicas e genotípicas entre os pares de populações analisadas. Os valores significativos ($p < 0,05$) após a correção de Bonferroni ($\alpha_{Bonf.} < 0,007$) estão destacados em negrito.....	63
TABELA 7. Diversidade genética (H_S) obtidas a partir dos AIMs FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO entre diferentes populações mundiais.	64
TABELA 8. Probabilidade de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson, 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores significativos antes da correção de Bonferroni estão destacados em itálico e sublinhado e os valores significativos após a correção ($\alpha_{Bonf.} < 0,0005$) estão destacados em negrito ...	65
TABELA 9. Valores de F_{IS} e seus intervalos de confiança (IC) para as populações analisadas. Valores significativos em negrito, pois seus IC não incluem o valor zero.	67
TABELA 10. Valores de F_{ST} e intervalos de confiança (IC) para diferentes conjuntos e pares de populações. Valores significativos em negrito, pois seus IC não incluem o valor zero.	68
TABELA 11. Valores de F_{ST} e intervalos de confiança (IC) entre as populações analisadas e populações mundiais. Valores significativos em negrito, pois seus IC não incluem o valor zero.....	69
Tabela 12. Características dos componentes principais baseados nas frequências alélicas de seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO).	74
Tabela 13. Pesos (<i>loadings</i>) das variáveis na resolução dos componentes principais na análise baseada em seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO).	74
Tabela 14. Características dos componentes principais baseados nas frequências alélicas de sete AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO e PV92).	75
Tabela 15. Pesos (<i>loadings</i>) das variáveis na resolução dos componentes principais na análise baseada em sete AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO e PV92).	75
TABELA 16. Contribuição dos componentes africano, europeu e ameríndio obtidos a partir dos oito AIMs para as comunidades remanescentes de quilombo e populações urbanas analisadas.	76
Tabela 17. Frequências (%) do alelo <i>CYP1A1*2C</i> em populações mundiais.	79
TABELA 18. Comparação das contribuições africana, européia e ameríndias obtidas a partir dos oito AIMs com marcadores previamente analisados nas comunidades de São Gonçalo e Valongo e na população urbana de Jequié.	93

Lista de Figuras

FIGURA 1. Principais rotas do tráfico de escravos para o Brasil. Crédito: Antonio Sérgio Bento Moreira.....	16
FIGURA 2. Esquema apresentando dois modelos extremos de mistura; isolamento híbrido (HI) e fluxo gênico contínuo (CGF; modificado de Pfaff <i>et al.</i> , 2001).....	26
FIGURA 3. Localização das comunidades remanescentes de quilombo (Barra, São Gonçalo e Valongo) e das populações urbanas (Jequié e Florianópolis, ou Hemosc) analisadas. Crédito: Antonio Sérgio Bento Moreira ..	33
FIGURA 4. Localização geográfica das aldeias pertencentes às tribos Tikúna, Kashinawa, Baniwa e Kanamarí e número de amostras analisadas.....	37
FIGURA 5. Comparação das frequências dos AIMs entre as comunidades remanescentes de quilombo de São Gonçalo, Barra e Valongo, as populações urbanas de Jequié e HEMOSC, e as tribos da Amazônia Brasileira, Tikúna, Baniwa, Kashinawa e Kanamarí.	62
FIGURA 6. (A) Estrutura populacional nas comunidades remanescentes de quilombo e nas populações urbanas, em comparação com populações parentais Africanas, Européias e Ameríndios da Amazônia Brasileira, obtido a partir de sete AIMs (com exceção do CYP1A1). Foram admitidas $k = 3$ populações, 30.000 interações para o período <i>burn-in</i> e 100.000 interações para as estimativas dos parâmetros. (B) Proporção de associação de cada população a cada um dos três <i>clusters</i>	71
FIGURA 7. Agrupamento dos indivíduos (círculos) das comunidades de (A) Barra, Valongo e São Gonçalo e de (B) Jequié e do HEMOSC, de acordo a contribuição dos grupos étnicos parentais: africano, europeu e ameríndio.	72
FIGURA 8. Componentes principais obtidos a partir de seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO) que relacionam as frequências alélicas das populações analisadas com populações mundiais. Populações africanas e européias (Parra <i>et al.</i> , 2001; Tomás <i>et al.</i> , 2002), afro- e euro-americanas (Parra <i>et al.</i> , 1998), euro-brasileiros (Zembrzusi <i>et al.</i> , 2006), e populações indígenas da América do Norte (dbSNP, PSU-ANTH) e da Amazônia Brasileira (Luizon <i>et al.</i> , 2007a).....	73
FIGURA 9. Componentes principais obtidos a partir da adição do <i>locus</i> PV92 aos seis AIMs da Figura 8, que relacionam as frequências alélicas das populações analisadas com populações mundiais. Populações africanas e européias (Parra <i>et al.</i> , 2001; Tomás <i>et al.</i> , 2002), afro- e euro-americanas (Parra <i>et al.</i> , 1998), euro-brasileiros (Zembrzusi <i>et al.</i> , 2006), e populações indígenas da América do Norte (dbSNP, PSU-ANTH) e da Amazônia Brasileira (Luizon <i>et al.</i> , 2007a).....	75

INTRODUÇÃO

POPULAÇÃO BRASILEIRA TRI-HÍBRIDA

A população Brasileira é resultado do processo de mistura entre Ameríndios, Europeus, Africanos e, mais recentemente, indivíduos de outras nacionalidades. Os Ameríndios autóctones representavam uma população de aproximadamente 2,4 milhões de indivíduos (IBGE, 2000) quando a colonização Européia se iniciou, em 1500, com a chegada de aproximadamente 500.000 Portugueses, quase todos homens (Ribeiro, 1995). O tráfico de escravos começou na metade do século XVI e, até 1855, aproximadamente 4 milhões de Africanos foram trazidos ao Brasil (IBGE, 2000). Eles eram oriundos de diferentes regiões Africanas sub-saarianas, predominantemente de regiões hoje pertencentes a Angola, Congo e Moçambique (Curtin, 1969). Dessa maneira, a população Brasileira tri-híbrida inicial se originou da mistura entre homens Europeus e mulheres Ameríndias ou Africanas. Por fim, aproximadamente 6 milhões de imigrantes chegaram ao Brasil entre 1820 e 1975, em sua maioria Portugueses e Italianos (70%), e números reduzidos de Espanhóis, Alemães, Sírios, Libaneses e Japoneses (IBGE, 2000).

Graus variáveis de contribuição ameríndia, européia e africana foram observados em indivíduos auto-declarados como brancos, de quatro diferentes regiões brasileiras. Tais indivíduos, aleatoriamente selecionados a partir de casos de paternidade, foram analisados quanto a marcadores informativos de ancestralidade do DNAm (Alves-Silva *et al.*, 2000),

cromossomo Y (Carvalho-Silva *et al.*, 2001) e autossômicos (Parra *et al.*, 2003).

A contribuição diferencial dos grupos parentais também pode ser evidenciada por outros estudos envolvendo marcadores de DNAm e do cromossomo Y em populações de diferentes regiões brasileiras (Ferreira *et al.*, 2006; Marrero *et al.*, 2005; Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2007).

Apesar da intensa mistura étnica na formação da população Brasileira, pequenos grupos isolados ainda podem ser encontrados, principalmente representados pelas aldeias Ameríndias e comunidades Afro-derivadas remanescentes de quilombos, que conservam muitas características de suas populações ancestrais.

AFRO-DESCENDENTES E COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBO

Apesar da discussão quanto aos números totais, cerca de 9 a 13 milhões de africanos foram trazidos para as Américas (Matoso, 1982). Os 4 milhões de escravos que o Brasil teria recebido a partir da metade do século XVI (Curtin, 1969) foram introduzidos para trabalhar como escravos nas lavouras de cana-de-açúcar e café, além da mineração de ouro (Calmon, 1959). O período do tráfico de escravos pode ser dividido em quatro grandes ciclos, caracterizados por rotas que apresentam diferentes origens geográficas na África e locais de desembarque no Brasil (Figura 1).

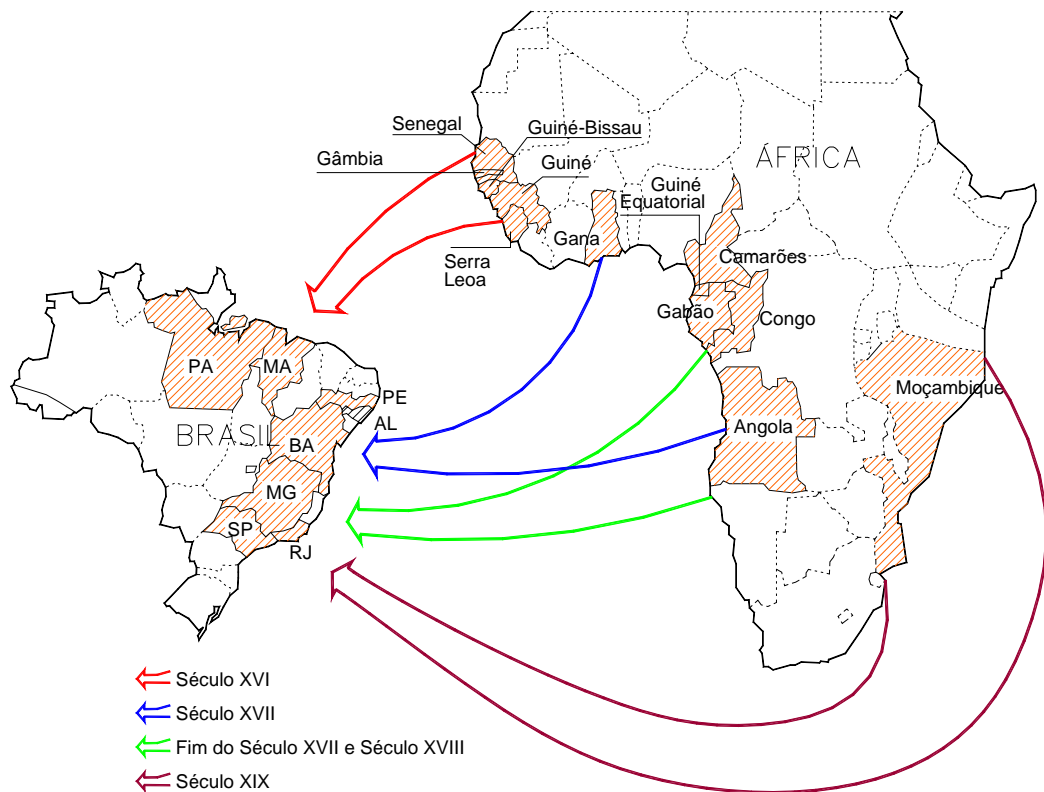


FIGURA 1. Principais rotas do tráfico de escravos para o Brasil. Crédito: Antonio Sérgio Bento Moreira.

No século XVI (ciclo da Guiné), os escravos eram trazidos em sua maioria de Serra Leoa, Senegal, Guiné, Guiné Bissau e Gâmbia, e chegavam nos estados do Pará, Maranhão e Bahia para trabalhar na cultura da cana-de-açúcar (Goulart, 1975; Matoso, 1982; Viana, 1988). No século XVII (ciclo do Congo e de Angola), os africanos eram trazidos do Congo, Gabão, Angola, Gana, Guiné Equatorial e Camarões, e chegavam à Bahia, Pernambuco e Alagoas, nesta que foi a principal rota de tráfico por 300 anos (Matoso, 1982). No final do século XVII e começo do XVIII (ciclo da Costa da Mina), os africanos eram trazidos do Congo e de Angola.

A partir de 1850 o tráfico de escravos foi proibido, entretanto os mesmos eram trazidos ilegalmente a Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo

(Goulart, 1975; Matoso, 1982; Salzano, 1986). No século XIX, o Brasil recebeu escravos de diferentes localidades, como Costa da Mina, Congo e principalmente de Moçambique (Goulart, 1975; Matoso, 1982).

A distribuição dos africanos no território brasileiro foi bastante heterogênea (Viana, 1988). Os estados que receberam os maiores contingentes foram o Rio de Janeiro (38%), Bahia (25%), Pernambuco (13%), São Paulo (12%), Maranhão (7%) e Pará (5%).

Durante o período da escravidão no Brasil, os africanos que conseguiam escapar se refugiavam com outros em igual situação em áreas afastadas dos centros de colonização ou em locais de difícil acesso, escondidos e fortificados, no meio das matas. Os núcleos se transformaram em aldeias, dedicando-se à economia de subsistência e, às vezes, ao comércio. Esta fuga representou uma das mais importantes formas de resistência à escravidão. A palavra quilombo (*kilombo*), que possui origem banto e significa acampamento ou fortaleza, foi usada pelos portugueses para designar estas comunidades formadas por escravos fugidos do cativoiro.

O Quilombo dos Palmares foi a maior manifestação de rebeldia e organização política, militar e econômica contra o escravismo na América Latina. Organizado por quilombolas no território atualmente pertencente ao estado de Alagoas, teve início aproximadamente em 1630, perdurou por quase cem anos e, durante esse longo período, desestabilizou regionalmente o sistema escravista. Paradoxalmente, não existem documentos escritos pelos palmarinos durante a sua existência. Certamente seguiam, como em outros quilombos, a tradição africana de comunicação oral (Moura, 2004).

A maior parte dos quilombos originados durante o período da escravidão teve uma formação heterogênea dependendo da região geográfica e dos grupos fundadores. Por exemplo, como relatado para o próprio Quilombo dos Palmares: “Além das fugas sistemáticas de escravos, contribuía para aumentar sua população o ingresso de índios, “salteadores”, fugitivos da justiça e elementos de outras etnias ou camadas que se sentiam oprimidos pelo sistema escravista” (Moura, 2004).

ATUALIZAÇÃO DO CONCEITO DE QUILOMBO

Os grupos que hoje são considerados remanescentes de comunidades de quilombos se constituíram a partir de uma grande diversidade de processos, que incluem as fugas com ocupação de terras livres e geralmente isoladas, mas também as heranças, doações, recebimento de terras como pagamento de serviços prestados ao Estado, a simples permanência nas terras que ocupavam e cultivavam no interior das grandes propriedades, bem como a compra de terras, tanto durante a vigência do sistema escravocrata quanto após a sua extinção. Exemplos incluem o caso do quilombo Frechal, no Maranhão, localizado a cem metros da casa grande, ou casos onde o quilombo esteve na própria senzala, representado por formas de produção autônoma dos escravos que poderiam ocorrer, sobretudo em épocas de decadência de ciclos econômicos, fossem agrícolas ou de mineração (Carvalho, 2002).

Portanto, não se deve imaginar que estes grupos camponeses negros tenham resistido em suas terras até os dias de hoje porque ficaram isolados, à margem da sociedade. Pelo contrário, sempre se relacionaram intensa e

assimetricamente com a sociedade brasileira, resistindo a várias formas de violência para permanecerem em seus territórios ou, ao menos, em parte deles (Carvalho, 2002).

Conforme registros junto a Fundação Cultural Palmares (2007), 1.000 comunidades remanescentes dos quilombos estão espalhadas por todos os estados brasileiros. As maiores concentrações destas comunidades estão nos estados da Bahia e Maranhão.

O direito à titulação dos territórios que as comunidades remanescentes de quilombos historicamente reconhecem como seus está previsto no artigo no 68 do Ato das Disposições Constitucionais Transitórias da Constituição Federal de 1988, sob o enunciado: “Aos remanescentes das comunidades de quilombos que estejam ocupando suas terras é reconhecida a propriedade definitiva, devendo o Estado emitir-lhes os títulos respectivos” (Carvalho, 2002).

O Decreto no 4.887, de 20 de novembro de 2003, em seu artigo 2º, considera os remanescentes das comunidades dos quilombos, “os grupos étnico-raciais, segundo critérios de auto-atribuição, com trajetória histórica própria, dotados de relações territoriais específicas, com presunção de ancestralidade negra, relacionada com a resistência à opressão histórica sofrida” (Fundação Cultural Palmares, 2007). A legislação também estabelece o conceito de terra ocupada por quilombos, que seriam aquelas “utilizadas para a garantia de sua reprodução física, social, econômica e cultural”. O processo de demarcação de terras quilombolas é de competência

do INCRA (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária). Neste caso, a terra é propriedade coletiva de toda a comunidade.

MISTURA ÉTNICA EM REMANESCENTES DE QUILOMBO

Apesar do processo de miscigenação existente, as comunidades afro-brasileiras constituem-se em um grande estoque dos genes africanos fundadores da população brasileira, os quais são importantes para o estudo da origem e caracterização não só dos negros brasileiros, como de toda a população do Brasil (Arpini-Sampaio *et al.*, 1999).

A contribuição genética dos grupos europeu, africano e ameríndio foi estimada em muitas comunidades remanescentes de quilombos, a partir de vários tipos de marcadores genéticos (Tabela 1). Embora exista uma predominância do componente africano na maioria destas comunidades, graus variáveis de ancestralidade européia e ameríndia são observados a depender da região, do tipo do marcador analisado e da história demográfica da população.

A maioria destes marcadores genéticos utilizados previamente, excetuando-se os bialélicos do cromossomo Y e do DNAm, apresentam freqüências polimórficas tanto nas populações híbridas como naquelas representativas das populações ancestrais. Entretanto, existem marcadores genéticos que exibem diferenciais de freqüência alélica (δ) superiores a 30% entre quaisquer duas populações parentais, primeiramente chamados de PSAs (do inglês *Population-Specific Alleles*; Shriver *et al.*, 1997), e atualmente

denominados por AIMs (do inglês *Ancestry Informative Markers*; Bonilla *et al.*, 2004).

TABELA 1: Mistura étnica em comunidades afro-derivadas Brasileiras.

Comunidades	Marcador	Contribuição (%)			Referências
		Europeu	Africano	Ameríndio	
Norte					
Trombetas-PA	Clássico	27	62	11	(1)
Trombetas-PA	Clássico	23,8	56,4	19,8	(2)
Trombetas-PA	STR/VNTR	32,5	57,6	9,9	(3)
Trombetas-PA	DNAmt	7	80	13	(3)
Trombetas-PA	STR-Y	13	84	3	(3)
Cametá-PA	Clássico	18	49,6	32,3	(4)
Cametá-PA	Clássico	17,9	48	34,1	(2)
Cametá-PA	STR/VNTR	24,2	53,4	22,4	(3)
Cametá-PA	DNAmt	17	59	24	(3)
Cametá-PA	STR-Y	54	28	18	(3)
Pacoval-AM	Clássico	27,4	44,3	28,3	(5)
Curiaú-AM	Clássico	26,4	73,6	0	(5)
Curiaú-AM	DNA-Y	37	57	6	(6)
Curiaú-AM	DNAmt	0	53	47	(6)
Nordeste					
Muquém-AL	Clássicos	14	73	13	(7)
Quilombo-AL	Clássicos	30	64	6	(7)
Cajueiro-MA	Clássicos	32,6	67,4	0	(8)
Cajueiro-MA	STR/VNTR	26,2	48,8	25	(3)
Cajueiro-MA	DNAmt	17	59	24	(3)
Cajueiro-MA	STR-Y	24	78	0	(3)
Mimbó-PI	Clássicos	22	61	17	(9)
Sítio Velho-PI	Clássicos	16	72	12	(9)
São Gonçalo-BA	Clássicos/STR	32,39	53,49	14,12	(10)
São Gonçalo-BA	STR-Y	40,28	59,72	0	(10)
Sul					
Paredão-RS	Clássicos	18,1	79,1	2,8	(4)
Paredão-RS	Clássicos	19,8	80,2	0	(2)
Paredão-RS	STR/VNTR	38	49,2	12,8	(3)
Paredão-RS	DNAmt	15	58	27	(3)
Paredão-RS	STR-Y	35	65	0	(3)

Referências: (1) Schneider *et al.*, 1997; (2) Bortolini *et al.*, 1995; (3) Bortolini *et al.*, 1999; (4) Bortolini *et al.*, 1992; (5) Guerreiro *et al.*, 1999; (6) Ribeiro-dos Santos *et al.*, 2002; (7) Pedrosa 1998; (8) Bortolini *et al.*, 1998; (9) Arpini-Sampaio *et al.*, 1999; (10) Sousa 2001; (11) Silva Jr. *et al.*, 1999.

A precisão nas estimativas de mistura étnica é diretamente dependente do valor de δ dos marcadores utilizados, portanto os AIMs são os marcadores ideais para estimativas eficazes de mistura populacional (Parra *et al.*, 1998;

Parra *et al.*, 2001), e na detecção de associações alélicas entre *loci* não ligados (Pfaff *et al.*, 2001). O nível destas associações pode explicar as diferentes histórias de mistura étnica experienciadas por diferentes populações, assim como o seu grau de estrutura genética.

AIMS E ESTIMATIVAS DE MISTURA ÉTNICA

Os AIMS já foram empregados em estimativas de mistura étnica em populações das Américas do Norte, Central e do Sul (Tabela 2). As estimativas de contribuição gênica européia em populações Afro-americanas dos EUA variaram de 3,5% (Gullah) a 22,5% (New Orleans). O baixo nível de contribuição européia entre os Gullah corrobora evidências históricas, culturais e antropológicas prévias que indicam seu maior isolamento (Parra *et al.*, 2001).

A mistura africana foi preponderante nestas populações Afro-americanas, enquanto a mistura Ameríndia praticamente não foi considerada (Parra *et al.*, 1998, Parra *et al.*, 2001). Por outro lado, a mistura Européia é preponderante nas estimativas de Mexicanos-americanos e Porto-riquenhos, denominados como Hispânicos (Salari *et al.*, 2005, Choudhry *et al.*, 2006), e a ancestralidade Ameríndia é maior dentre os Mexicanos (Martinez-Marignac *et al.*, 2007) e quase completa dentre os Nativos Americanos do México (Bonilla *et al.*, 2005) e da Amazônia Brasileira (Luizon *et al.*, 2007a).

TABELA 2. Estimativas de mistura africana (Afr), européia (Eur) e ameríndia (Amer) obtidas a partir de diferentes conjuntos de AIMs em populações Americanas.

Populações	mistura (%)			Refs.*
	Afr	Eur	Amer	
Jamaica		6,8		(1)
Afro-americanos (EUA)		11,6 a 22,5		(1)
Afro-americanos de Gullah (EUA)		3,5		(2)
Afro-americanos (Carolina do Sul, EUA)		11,8		(2)
Afro-americanos (Columbia, EUA)		17,7		(2)
Hispânicos (San Luis Valley, Colorado)	3,2	62,7	34,1	(6)
Mexicanos-americanos	3,4	44,9	51,7	(7)
Mexicanos-americanos (San Francisco)	3,7	45,4	51	(11)
Mexicanos	5	30	65	(12)
Porto-riquenhos	16,2	65,5	18,3	(7)
Porto-riquenhos (NY city)	29,1	53,3	17,6	(8)
Porto-riquenhos	21,3	65,5	18,3	(11)
Afro-caribenhos (Tobago)	94,0	4,6	1,4	(9)
Argentinos	1,7	80,2	18,1	(4)
Argentinos (La Plata)	6,5	67,6	25,9	(12)
Colombianos (Antioquia)	6	79	16	(5)
Tlapa (Nativos Americanos, México)			~98	(10)
Indígenas da Amazônia Brasileira			~98	(13)
Brasileiros brancos (S, N, NE e SE)	13 a 32			(14 ^a)
Brasileiros brancos, intermediários e negros	31 a 51			(14 ^b)
Euro-brasileiros (RS) (n=101 e 102)	2 a 6			(3)

Referências: (1) Parra *et al.*, 1998; (2) Parra *et al.*, 2001; (3) Zembrzuski *et al.*, 2006; (4) Seldin *et al.*, 2007; (5) Bedoya *et al.*, 2006; (6) Bonilla *et al.*, 2004a; (7) Salari *et al.*, 2005; (8) Bonilla *et al.*, 2004b; (9) Miljkovic-Gacic *et al.*, 2005; (10) Bonilla *et al.*, 2005; (11) Choudhry *et al.*, 2006; (12) Matinez-Marignac *et al.*, 2007; (13) Luizon *et al.*, 2007; (14) Parra *et al.*, 2003. ^aAuto-declarados e ^bQueixadinha (MG).

No Brasil, a ancestralidade genômica africana foi estimada em 173 indivíduos da comunidade rural de Queixadinha (MG) a partir dos nove AIMs descritos por Parra *et al.* (1998). Estes indivíduos também foram classificados quanto ao fenótipo conforme a cor da pele, forma do nariz e dos lábios e cor e forma dos cabelos. Os resultados indicam que, no Brasil, a cor da pele é um pobre indicador de ancestralidade genômica africana (Parra *et al.*, 2003). Por outro lado, a análise de 34 AIMs em amostras de afro-americanos e afro-caribenhos revelou correlações significantes entre as

estimativas de ancestralidade individual e a pigmentação da pele (Shriver *et al.*, 2003).

Dentre homens Brasileiros auto-declarados como brancos os índices de mistura africana foram maiores no Sudeste e menores no Sul (Parra *et al.*, 2003), e corroboram dados de mtDNA obtidos nestas mesmas amostras (Alves-Silva *et al.*, 2000). No entanto, em Euro-brasileiros da região Sul classificados de acordo com a cor da pele e outras características morfológicas, a contribuição Africana foi bem inferior em comparação com o estudo anterior (Zembrzuski *et al.*, 2006; Tabela 2).

Tais estimativas de mistura obtidas a partir dos AIMS em populações Brasileiras foram inicialmente realizadas utilizando-se freqüências parentais ameríndias de somente 10 indivíduos Karitiana, Suruí, Tikuna (Parra *et al.*, 2003). Os dados disponíveis para ameríndios Sul-americanos também eram restritos às tribos Pehuenche, Tikuna e Quechua (Shriver *et al.*, 1997; Collins-Schramm *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2002).

No intuito de gerar freqüências parentais para estimativas de mistura na população brasileira, a distribuição de freqüências de sete AIMS selecionados por Parra *et al.* (1998) e Shriver *et al.* (2003) foi investigada em 309 indivíduos de quatro tribos indígenas da Amazônia Brasileira. Como salientado por Parra *et al.* (2003), quando empregados em análises de populações miscigenadas, os valores de δ dos AIMS deste conjunto não permitem a discriminação de europeus e ameríndios (Luizon *et al.*, 2007).

Por outro lado, um dendrograma *Neighbor-Joining* separou africanos e europeus dos ameríndios com um alto suporte estatístico (valor de *bootstrap*

= 0,989). A baixa diversidade ($G_{ST} = 0,042$) entre Nativos norte-americanos e ameríndios da Amazônia Brasileira corrobora os achados prévios de ausência de variação intra-étnica para os AIMs (Tomás *et al.*, 2002). Portanto, apesar dos efeitos da deriva genética, as frequências alélicas médias apresentadas podem ser usadas como parentais em estimativas de mistura em populações urbanas brasileiras (Luizon *et al.*, 2007a).

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO GERADO POR FLUXO GÊNICO

O desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *Linkage Disequilibrium*) entre genes proximalmente ligados pode ser causado pela existência de LD na população fundadora, o qual ainda não teve tempo de dissipar-se devido a uma baixa frequência de recombinação. No entanto, O LD também pode surgir como um artefato da mistura de sub-populações que diferem em suas frequências alélicas (Hartl & Clark, 2007). A estratificação existe quando a população foi formada pela mistura entre sub-populações, e quando as proporções de mistura variam entre os indivíduos (Hoggart *et al.*, 2003).

O fluxo gênico entre populações geneticamente distintas gera desequilíbrio de ligação (ALD, do inglês *admixture linkage disequilibrium*) entre os *loci* (ligados e não ligados) que possuem frequências alélicas diferentes.

O efeito da dinâmica da mistura no padrão de LD foi avaliado por simulações de dois modelos extremos de mistura: (1) isolamento híbrido (HI, do inglês *Hybrid Isolation*), no qual a mistura ocorre em uma única geração

e, (2) fluxo gênico contínuo (CGF, *Continuous Gene Flow*), no qual a mistura ocorre a uma taxa paulatina a cada geração (Figura 2; Pfaff *et al.*, 2001).

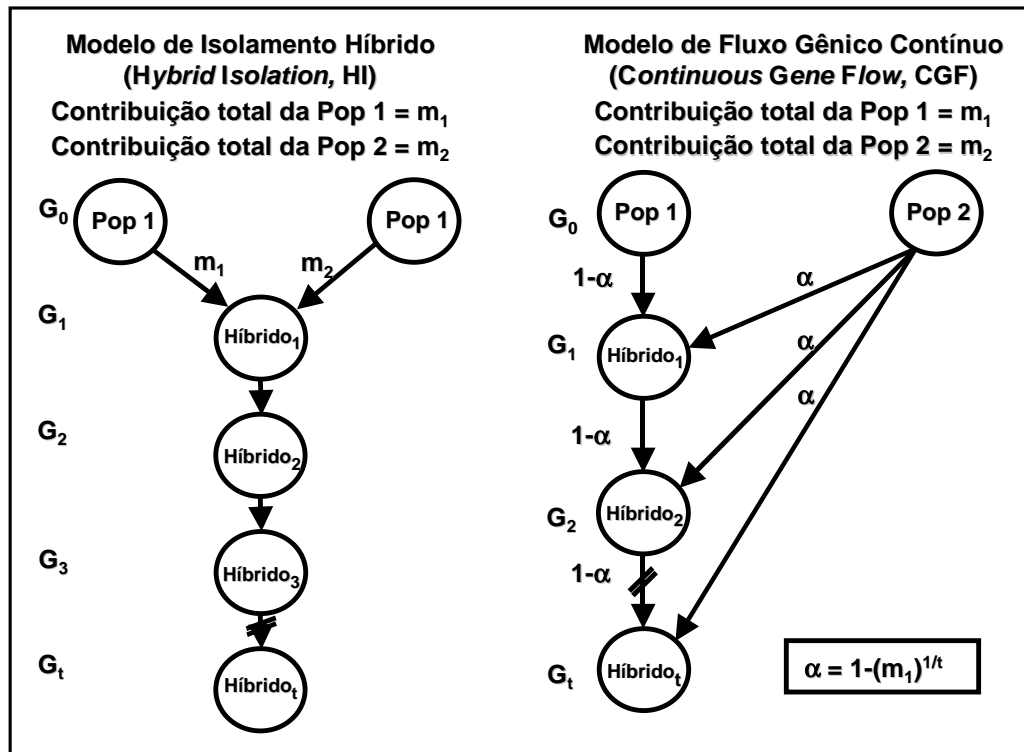


FIGURA 2. Esquema apresentando dois modelos extremos de mistura; isolamento híbrido (HI) e fluxo gênico contínuo (CGF; modificado de Pfaff *et al.*, 2001).

Os padrões de LD em populações Afro-americanas dos EUA (Jackson, MS e da Carolina do Sul) se assemelham aos padrões observados em populações simuladas para CGF, por dois motivos; 1) associação significativa entre os *loci* FY e AT3-I/D, que estão separados por 22cM no cromossomo 1 e são considerados fisicamente ligados. A manutenção de ALD ao longo de segmentos cromossômicos relativamente grandes (>10cM) é característico de um padrão CGF de mistura, mas não de um padrão HI; 2) Associações significantes entre muitos pares de *loci* não ligados também foram detectadas, como observado nos resultados de simulação CGF, mas não nas simulações de populações HI (Pfaff *et al.*, 2001).

Um alto nível de LD entre os *loci* ligados (FY e AT3-I/D) e não ligados foi observado em populações Afro-americanas dos EUA (Parra *et al.*, 1998 e 2001), o que sugere a presença de estrutura genética nas mesmas. No entanto, este LD não foi observado para os Gullah nem mesmo entre os *loci* ligados, o que sugere a ausência total de estrutura populacional inferida a partir destes *loci* (Parra *et al.*, 2001).

Uma considerável estrutura genética foi observada na população de São Tomé (Golfo da Guiné), estimada a partir de oito PSAs autossômicos. O LD significativo entre 33% dos pares de *loci* não ligados pode ter sido acarretado pela contribuição gênica Portuguesa ($10,7\% \pm 0,9\%$) nesta população. A mistura recente teve um importante papel nestes valores, como pode ser observado pela remoção de indivíduos com pais ou avós portugueses ou de Cabo-Verde da amostra, que reduziu os níveis de miscigenação ($6,5\% \pm 0,8\%$) e de LD significativos (11% dos pares de *loci* não ligados; Tomás *et al.*, 2002).

A ausência de estrutura genética, avaliada por AIMs em uma população mexicana de ancestralidade predominantemente Nativo-americana da cidade de Tlapa, é consistente com a homogeneidade étnica da mesma. A adição de indivíduos denominados Mestizos à amostra não produziu mudança considerável nas estimativas de mistura, mas representou um grande efeito na estrutura populacional (Bonilla *et al.*, 2005).

Conforme exposto nos tópicos anteriores, dado os diferenciais de frequência alélica (δ) superiores a 30% entre populações parentais, os AIMs são os marcadores ideais para estimativas eficazes de mistura étnica (Parra

et al., 1998; Bonilla *et al.*, 2005; Miljkovic-Gacic *et al.*, 2005) e na detecção de estrutura populacional (Pfaff *et al.*, 2001; Choudhry *et al.*, 2006).

COMUNIDADES ANALISADAS NESTE TRABALHO

A comunidade rural de São Gonçalo (SG-BA) é considerada um remanescente de quilombo pelo seu grau de isolamento geográfico e cultural, e por apresentar predominância de ascendência africana em sua formação, como indicado pela análise de marcadores clássicos e STRs autossômicos e ligados ao cromossomo Y (Sousa, 2001). A comunidade Afro-derivada de Barra (BR-BA) apresenta baixa taxa de migração e alta frequência de casamentos consangüíneos, características que mantêm a estrutura de semi-isolado (Abé-Sandes, 2002).

A análise de marcadores bialélicos do cromossomo Y revela um menor grau de diversidade genética na comunidade de BR em comparação com SG (Abé-Sandes *et al.*, 2004), provavelmente explicado pela presença de haplogrupos típicos de Europeus nesta última. Estes resultados divergentes são devidos, provavelmente, às diferentes histórias de mistura das duas comunidades, hipótese que pode ser investigada pela análise dos AIMs.

Por outro lado, parâmetros demográficos indicam na comunidade Afro-derivada isolada de Valongo (VAL-SC) um grau de migração muito baixo e um dos mais altos coeficientes de endocruzamento já registrados. Dados históricos indicam a contribuição de quatro casais na formação desta comunidade, sendo sete indivíduos negros e um branco (Souza e Culpi,

1992). Esta predominante contribuição Africana é corroborada por marcadores clássicos (Souza e Culpi, 2005).

No presente estudo, oito AIMS foram investigados nestas três comunidades remanescentes de quilombo com diferentes histórias demográficas, no intuito de estimar as contribuições de cada grupo parental e elucidar a dinâmica do processo de mistura que ocorreu em cada uma delas.

HIPÓTESE

Os conjuntos de marcadores genéticos previamente estudados nas três comunidades remanescentes de quilombo, São Gonçalo, Barra e Valongo, são diferentes e não comparáveis.

Os oito AIMs selecionados para o presente estudo serão capazes de revelar as diferentes histórias de formação destas comunidades, pois apresentam grandes diferenciais de frequência (δ) entre os grupos parentais. Por este motivo, representam uma informação mais incisiva para estimativas de mistura populacional do que a obtida a partir de STRs, apesar destes últimos apresentarem maior heterozigose e, portanto, serem mais informativos na diferenciação populacional.

Portanto, a hipótese do presente trabalho é que a dinâmica do processo de mistura variou em diferentes remanescentes de quilombos brasileiros. A partir dos dados demográficos e genéticos pode-se supor que a comunidade de SG apresente maior estruturação do que a comunidade de BR, decorrentes de sua história recente de mistura étnica. Estas duas comunidades, entretanto, apresentariam maior mistura do que a comunidade de VAL, devido ao maior isolamento desta última.

Adicionalmente, a história de formação destas comunidades sugere que a mistura étnica na formação das populações Afro-derivadas Brasileiras difere do processo de formação das populações Afro-derivadas da América do Norte (EUA), principalmente devido à contribuição ameríndia.

OBJETIVOS

O objetivo geral é levantar as freqüências alélicas de oito AIMS (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO, PV92 e *CYP1A1*2C*) em amostras de três comunidades remanescentes de quilombo, São Gonçalo (BA, $n=51$), Barra (BA, $n=47$) e Valongo (SC, $n=25$), e em amostras de duas populações urbanas, Jequié (BA, $n=47$) e Hemosc (SC, $n=25$), das regiões Nordeste e Sul do Brasil.

As freqüências do alelo *CYP1A1*2C* foram determinadas em quatro tribos indígenas ($n=297$) da Amazônia Brasileira, e comparadas com populações mundiais.

A partir destas será possível:

- Quantificar a mistura étnica nestas comunidades remanescentes e estabelecer comparações com outras populações Afro-derivadas;
- Demonstrar a diferença na dinâmica do processo de mistura étnica das comunidades remanescentes de quilombo, em conjunto com dados demográficos.
- Estimar os diferentes graus de mistura étnica nas populações urbanas de Jequié (região Nordeste) e de Florianópolis (região Sul).

MATERIAL E MÉTODOS

ESQUEMA DO TRABALHO

Neste trabalho foram analisados oito AIMs; seis deles (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO) apresentam valores de $\delta > 50\%$ entre Africanos e Europeus ou Ameríndios, enquanto que PV92 e *CYP1A1*2C* apresentam valores de $\delta > 50\%$ entre Ameríndios e Africanos ou Europeus.

A partir das freqüências alélicas foram verificados; a diferenciação gênica e genotípica das mesmas, a heterozigose, a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, o desequilíbrio de ligação (LD) entre *loci* ligados ou não-ligados, a diversidade genética interpopulacional, a estrutura populacional, realizadas análises de componente principal e de estimativas de mistura étnica.

COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBO

Caracterização da População de Barra

Barra é uma comunidade rural semi-isolada e oficialmente reconhecida como remanescente de quilombo (Fundação Cultural Palmares, 2007). Está localizada a 13°36' de latitude Sul e 41°47' de Longitude Oeste, no município de Rio de Contas (BA; Figura 3). Na comunidade de Barra vivem 179 pessoas, 78 homens e 101 mulheres (dados de 1998) compondo 59 famílias, dos quais 118 indivíduos foram amostrados (Abé-Sandes, 2002).

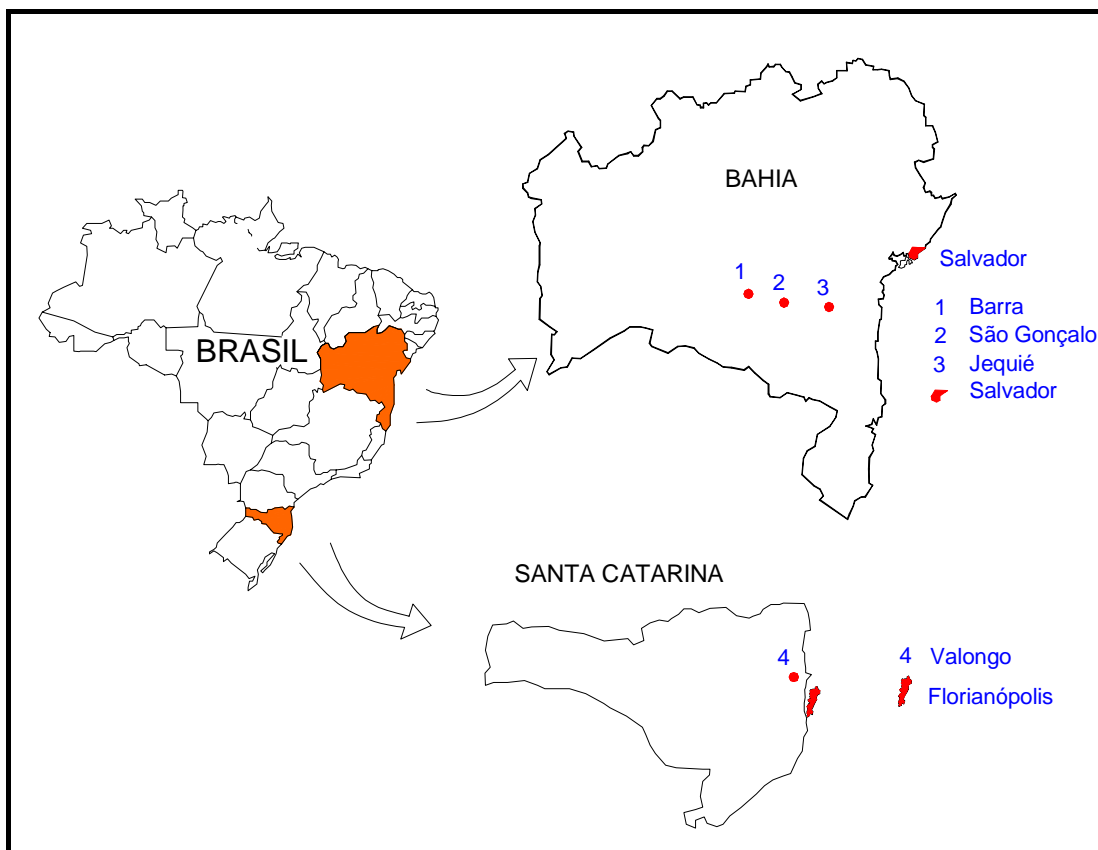


FIGURA 3. Localização das comunidades remanescentes de quilombo (Barra, São Gonçalo e Valongo) e das populações urbanas (Jequié e Florianópolis, ou Hemosc) analisadas. Crédito: Antonio Sérgio Bento Moreira.

A principal atividade desenvolvida na comunidade é a agricultura de subsistência, entremeada por migrações masculinas temporárias principalmente para São Paulo, onde buscam trabalho. Na época das chuvas, estes homens retornam às comunidades e retomam suas atividades na lavoura.

Fatos que explicam como e quando a comunidade de Barra se formou ainda permanecem obscuros. A tradição oral do grupo nos remete a um momento impreciso, relacionado à ação mineradora na região, e segundo Messeder e Martins (1991) esse povoado tem pelo menos 138 anos. Com relação à sua origem, os arraiados relatam que os primeiros habitantes

instalaram-se ali clandestinamente, fugidos das minas próximas, o que permite considerá-la como um remanescente de quilombo.

Caracterização da População de São Gonçalo

A comunidade de São Gonçalo está localizada a 13°45'46" de latitude Sul e 41°02'28" de Longitude Oeste, a 13 Km do perímetro urbano do município de Contendas do Sincorá, a 133 Km da cidade de Jequié (BA; Figura 3). A comunidade é constituída por 194 indivíduos de cor negra, sendo 86 do sexo masculino e 108 do sexo feminino, os quais compõem 44 grupos familiares.

A tradição oral, passada pelo líder da comunidade, refere que a comunidade descende de remanescentes escravos, havendo poucos relatos de casamentos de membros desta vila com pessoas externas à comunidade. Atualmente, a comunidade é considerada oficialmente como remanescente de quilombo pela Fundação Cultural Palmares (2007).

A comunidade é pobre e a agricultura de subsistência é a principal atividade desenvolvida, tendo esta situação agravada devido aos longos períodos de seca. A comunidade possui um poço artesiano. No entanto, grande parte das pessoas se utiliza da água proveniente do rio próximo, fato que vem expondo tais indivíduos a muitos problemas de saúde, dentre os quais infecções gastrintestinais e esquistossomose em índices elevados. Descrição detalhada da comunidade encontra-se em Sousa (2001).

Caracterização da comunidade de Valongo

A comunidade de Valongo ocupa um pequeno vale, de difícil acesso, distante cerca de 20 Km do litoral, uma região chamada de Sertão do Valongo. Parte dela se encontra no município de Porto Belo e a outra parte em Tijucas, no Estado de Santa Catarina, a 27°12'12" de Latitude Sul e 48°44'30" de Longitude Oeste (Figura 03; Souza, 1992).

A comunidade isolada de Valongo foi fundada por volta de 1880 por sete escravos fugidos e alforriados, mais um homem branco, e em 1995 possuía uma população de 74 pessoas de origem predominantemente africana (Souza e Culpi, 2005). A descrição detalhada da comunidade encontra-se em Souza e Culpi (1992).

O coeficiente médio de endocruzamento é alto ($F=0.081$), devido principalmente à grande permanência de parentes na região e a segregação religiosa (eles são Adventistas do Sétimo Dia) e racial (as comunidades vizinhas descendem de Europeus Católicos de origem alemã, italiana e portuguesa). O pequeno tamanho da população efetiva e baixa frequência de migração efetiva (4%) sugerem fortemente a possibilidade de deriva genética (Souza *et al.*, 2005).

POPULAÇÕES URBANAS

População de Jequié

O município de Jequié está localizado a 13°51'27" de Latitude Sul e 40°05'01" de Longitude Oeste, no Sudoeste da Bahia, a 360 Km de Salvador,

nos limites entre a caatinga e a zona da mata. O último censo indicou uma população de 147.115 habitantes, sendo 71.800 homens e 75.315 mulheres (IBGE, 2000).

Entre 1860 e 1880, então um pequeno povoado denominado Boca do Sertão, Jequié crescia às margens do Rio das Contas, o qual era uma importante via de transportes por onde barcos de pequeno porte levavam produtos de subsistência a habitantes de suas margens. Tropeiros chegavam de cidades maiores carregando suas mercadorias em lombos de burros, trabalhando como mascates (Sousa, 2001).

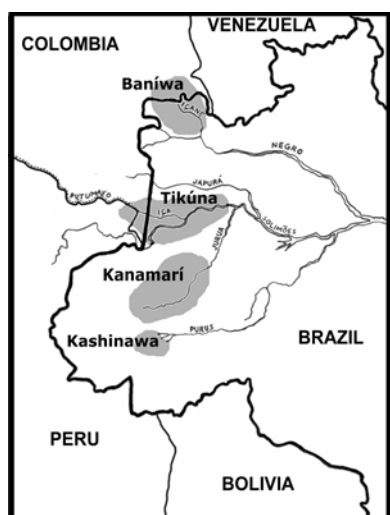
No fim do século XIX, a cidade se desenvolveu a partir da movimentada feira que atraía comerciantes de várias regiões. Segundo relato oral, esta população tem na sua formação a mistura étnica de “índios, negros, italianos e árabes”.

População do Estado de Santa Catarina (HEMOSC)

A amostra constitui-se de material de 58 doadores de sangue do HEMOSC (Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina; <http://www.HEMOSC.org.br/>), de ambos os sexos, com faixa etária entre 26 e 62 anos, a grande maioria da capital do Estado, Florianópolis. Esses indivíduos são voluntários que consentiram que parte de seu sangue fosse também utilizada para fins de pesquisa.

TRIBOS INDÍGENAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

As amostras de sangue venoso foram coletadas no ano de 1976 durante a expedição “Alpha-Hélix” (Neel *et al.*, 1980; Mestriner *et al.*, 1980), destinada à Amazônia oriental brasileira e aprovada segundo processo FUNAI/BSB/4854/75 e autorizações 26/76, 27/76, 74/76 e 75/76. Descrição detalhada encontra-se em Simões (1980). A localização geográfica e o número das amostras selecionadas para o presente estudo estão apresentados na Figura 4.



Tribos	Aldeias	Latitude	Longitude	n
Tikúna	Umariçu	4°17' S	69°55' O	52
	Feijoal	4°15' S	69°35' O	52
	Vendaval	3°30' S	69°27' O	53
	Belém	3°55' S	69°37' O	50
Kashinawa	Canabrava	8°07' S	70°19' O	23
	Paredão	8°07' S	70°19' O	07
Baniwa	Jandu Cachoeira	1°33' N	68°44' O	52
Kanamarí	Três Unidos	6°37' S	69°32' O	34
Total de indivíduos				323

FIGURA 4. Localização geográfica das aldeias pertencentes às tribos Tikúna, Kashinawa, Baniwa e Kanamarí e número de amostras analisadas.

O critério para a seleção dos indivíduos da amostra analisada foi o menor grau de parentesco possível dentro da amostra total. A partir das fichas de coleta, que incluem o número de identificação, o nome do indivíduo, sexo, idade, notas sobre parentesco, mistura com brancos e o nome dos pais e/ou esposos, foi possível excluir primeiramente os filhos e netos da amostra. Em uma segunda triagem foram escolhidos, de maneira aleatória, apenas um indivíduo dentre os que apresentavam irmãos ou o

mesmo sobrenome, o que resultou em uma amostra de 323 indígenas (Mendes Jr., 2001).

Tikúna

Os Tikúna habitam o Estado do Amazonas, mas representantes também podem ser encontrados em território peruano e colombiano. Na época da coleta haviam cerca de 11.000 membros desta tribo em território brasileiro. No entanto, o censo de 1994 indicou 23.000 membros, também em território brasileiro. Embora apresentem contatos com não-indígenas, esta tribo ainda mantém a sua identidade étnica e casamentos com pessoas de fora são raros (Simões, 1980).

Kashinawa

Os Kashinawa habitam o extremo sudoeste do Estado do Amazonas e uma porção do Estado do Acre. Apresentavam cerca de 2.000 indivíduos habitando as margens do Rio Embira e seus tributários na época da coleta (Mestriner *et al.*, 1980). Estimativas de 1994 apontaram 3.387 membros desta tribo em território brasileiro. O grau de aculturação desta tribo é bastante variado (Simões, 1980).

Baniwa

Os Baniwa habitam a região pertencente aos municípios de São Gabriel da Cachoeira e Japurá (AM), noroeste do Estado do Amazonas. Estimativas na época da coleta (1976) indicavam a existência de aproximadamente 1.500

indígenas distribuídos em 16 aldeias, consideradas semi-aculturadas. Em censo realizado em 1995 foram apontados 3.189 indivíduos (Oliveira, 1999).

Kanamari

Os Kanamari são encontrados na região das bacias dos Rios Juruá e Purus, sudoeste do Estado do Amazonas. O censo de 1994 indicava aproximadamente 1.300 indivíduos. Esta tribo apresenta uma longa história de contato com neobrasileiros e praticam agricultura de subsistência (Mohrenweiser *et al.*, 1979).

ASPECTOS ÉTICOS

As amostras analisadas são oriundas de coletas prévias realizadas e detalhadas em outros projetos (Sousa, 2001; Abé-Sandes, 2002; Souza, 1992). As amostras do estado da BA foram fornecidas pela Profa. Sandra Mara Bispo Sousa, do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Jequié, e pela Profa. Kiyoko Abé Sandes, do Departamento de Ciências da Vida da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Campus de Salvador. As amostras do Estado de SC foram cedidas pela Profa. Ilíada Rainha de Souza, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As coletas foram realizadas nas próprias localidades, por meio de visitas domiciliares ou em grupo, onde foi perguntado a cada indivíduo sobre a concordância na participação no estudo, dando a oportunidade de negar a sua participação sem qualquer prejuízo dos benefícios (exames médicos e

tratamentos). Os voluntários assinaram um termo de consentimento e, no caso dos menores, o termo foi assinado pelo responsável. Os termos de consentimento, assim como um coletivo do líder da comunidade, encontram-se em poder das Professoras supracitadas.

O uso destas amostras foi analisado e aprovado em seus aspectos éticos. As amostras de SG, BR e JQ pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UESB, Campus de Jequié, processo nº058/2007. As amostras de VAL e HEMOSC pelo CEP da UFSC, de acordo com o adendo ao projeto no 74/2002. O estudo das populações indígenas da Amazônia Brasileira também foi aprovado pelo CEP do HC-FMRP/USP, processo HCRP no 4610/2001, e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), segundo processo no 25000.097241.2001-83.

A coleta de informações demográficas e de material biológico das populações envolvidas seguiu rigorosamente os preceitos de conscientização e autorização dos participantes e das lideranças das comunidades, aquiescência voluntária e garantia de anonimato dos participantes.

Cada indivíduo foi identificado com um código, e somente o pesquisador saberá o código pertence a cada indivíduo. Além disso, os dados destas pesquisas serão apresentados em termos de populações e nunca em termos individuais.

COLETA E CONSERVAÇÃO DO MATERIAL

Amostras da Bahia

Todo o procedimento de coleta foi realizado em 1999. Uma equipe multidisciplinar, liderada pelas Profas. Ana Angélica Leal Barbosa, Sandra Mara Bispo Sousa e Kiyoko Abé Sandes, todas na época da coleta pertencentes ao DCB/UESB, foi composta para a realização das visitas às comunidades. As visitas preliminares tiveram por objetivo a coleta de dados oficiais sobre as comunidades, sendo posteriormente seguidas pela informação às famílias sobre os objetivos da pesquisa e a aplicação de questionários para caracterização demográfica. Além disso, foram obtidas três medidas da pressão arterial de cada indivíduo e coletadas fezes, material este submetido a análises cujos resultados foram devolvidos aos membros da comunidade, sendo os resultados anormais encaminhados a atendimento médico especializado. As coletas foram realizadas nas próprias localidades, por meio de visitas domiciliares ou em grupo.

De cada indivíduo com idade superior a 3 anos foram coletados de 5 mL de sangue por punção venosa com tubo *VacuTainer*, sendo utilizado EDTA como anticoagulante. Os indivíduos foram devidamente identificados e os tubos de coleta mantidos e transportados em caixas de isopor até a cidade de Jequié, sendo transferidos para geladeira no período de 6-8 horas após a coleta.

Todas as amostras foram processadas em até 24h após a coleta. A amostra total foi homogeneizada, da qual foram recolhidos de 300-500µL de

sangue total em tubo de polipropileno do tipo *ependorf* de 1,5 mL, devidamente etiquetados e mantidos em geladeira para posterior extração de DNA. Uma alíquota de 500µL de plasma separado das hemácias por centrifugação foi recolhida e estocada diretamente a -20°C para análise de proteínas séricas. Os eritrócitos restantes foram glicerolizados em tampão glicerol 40% em Citrato tripotássio 0,1M, KH_2PO_4 0,0345M, K_2HPO_4 0,0344M e estocados a -20°C , para análise das proteínas eritrocitárias.

Amostras de Santa Catarina (HEMOSC)

Uma equipe multidisciplinar liderada pelas Profa. Iliada Rainha de Souza, da UFSC, foi composta para a realização das visitas às comunidades. De cada indivíduo foram coletados 5 mL de sangue por punção venosa com tubo *VacuTainer*, sendo utilizado EDTA como anticoagulante. As amostras de sangue transportadas para o Laboratório de Polimorfismos Genéticos da UFSC foram submetidas à centrifugação, sendo o sobrenadante (plasma) estocado em frascos a -20°C .

Os *buffy coats* (leucócitos já separados por centrifugação, com um pouco de hemácias e plasma) foram congelados a -20°C e, posteriormente, foi realizada a extração de DNA, utilizado no presente trabalho. Parte das hemácias foi glicerolizada (solução de glicerol a 40%), segundo especificações de Mollison (1972) e também estocadas em frascos a -20°C .

Amostras das tribos indígenas

Durante a expedição “Alpha-Helix” em 1976, as amostras de sangue foram coletadas em tubos *VacuTainer* contendo 2,0 mL de anticoagulante

ACD e foram refrigeradas cerca de 12 horas após a coleta. Cerca de três dias após a coleta este material foi processado para estocagem. As amostras foram então centrifugadas (1.500 rpm, durante 10 minutos) e o plasma retirado. As hemácias foram lavadas três vezes em solução salina isotônica, e o sedimento resultante após a última centrifugação foi ressuspensão em igual volume de solução de glicerol a 40% em tampão de estocagem (32,5g de citrato de tripotássio + 6,0g de fosfato dibásico de potássio + 4,7g de fosfato monobásico de potássio + água destilada qsp. 1 litro). As amostras foram então mantidas a -20° C até o presente.

AIMs ANALISADOS

Neste trabalho foram analisados oito AIMs, seis (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO) com valores de $\delta > 50\%$ entre Africanos e Europeus ou Ameríndios (Parra *et al.*, 1998) e dois (PV92 e CYP1A1*2C) com $\delta > 50\%$ entre Ameríndios e Africanos ou Europeus (Shriver *et al.*, 2003; Luizon *et al.*, 2007b; Tabela 3).

Para os AIMs analisados no presente estudo, será denominado de alelo *1 (ex., RB*1) o fragmento correspondente à banda de maior peso molecular observada no gel de poliacrilamida, devido à presença de uma inserção ou inserção *Alu* (para os *loci* AT3-I/D, Sb19.3, APO e PV92) ou à ausência de um sítio de restrição (para os *loci* FY, RB e LPL), seguindo a convenção estabelecida em Parra *et al.* (1998). O alelo CYP1A1*2C é considerado aqui como um AIM (Luizon *et al.*, 2007b). No entanto, para simplificar seu uso durante o texto este alelo será mencionado como CYP1A1.

TABELA 3: Localização citogenética, enzimas de restrição, seqüência dos primers e condições de PCR dos oito AIMs analisados.

<i>locus</i>	Tipo	Localização	Seqüência dos Primers	PCR - Notas	T°C PCR
FY	<i>StyI</i>	1q23.2	AGGCTTGTGCAGGCAGTG GGCATAGGGATAAGGGACT		94/55/72
AT3-I/D	76bp indel	1q25.1	CCACAGGTGTAACATTGTGT GAGATAGTGTGATCTGAGGC	1 min extensão	94/55/72
LPL	<i>PvuII</i>	8p21.3	AGGCTTCACTCATCCGTGCCTCC TTATGCTGCTTTAGACTCTTGTC		94/60/72
RB	<i>BamHI</i>	13q14.2	CAGGACAGCGGCCCGGAG CTGCAGACGCTCCGCCGT	10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	94/60/72
Sb19.3	Inserção Alu	19p12	TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG AAGCACAATTGGTTATTTTCTGAC	1 min desnaturação 2 min pareamento 2 min extensão	94/58/72
APO	Inserção Alu	11q23	AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA	1 min desnaturação 2 min pareamento 2 min extensão	94/55/72
PV92	Inserção Alu	16q23.3	AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG	1 min desnaturação 2 min pareamento 2 min extensão	94/58/72
CYP1A1	<i>BsrDI</i>	15q22	CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC TTCCACCCGTTGCAGGCAGGATAGCC		94/55/72

°Condições de PCR: Após um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, as amostras foram amplificadas por 30 ciclos nas temperaturas de desnaturação/pareamento/extensão especificadas (T°C PCR) para cada *loci*, seguidos por um passo final de extensão por 5 min a 72°C. A menos que indicado em PCR - NOTAS, os passos de desnaturação/pareamento/extensão foram de 30s. A mistura de reação para PCR encontra-se especificada na Tabela 4.

Os *primers* e enzimas de restrição, a localização citogenética e as condições de PCR dos AIMS analisados estão relacionados nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 4: Condições de PCR para os AIMS analisados. Quantidade em μ l suficiente para uma reação.

AIMs	Água	Tampão PCR livre de cloreto	DMSO	MgCl (50 mM)	dNTP (20 mM)	Primers (solução trabalho)	Taq pol
FY	13,75	2,5		1,0	0,25	1,5	0,25
B2300	10,75	2,5	2,5	0,75	0,25 μ l	3,0	0,50
LPL	13	2,5		1,0	0,25	3,0	0,25
AT3	13	2,5		1,0	0,25	3,0	0,25
Sb19.3	13	2,5		1,0	0,25	3,0	0,25
APO	13	2,5		1,0	0,25	3,0	0,25
PV92	13	2,5		1,0	0,25	3,0	0,25
CYP1A1	13	2,5		1,0	0,25	3,0	0,25

ANÁLISE LABORATORIAL

Extração do DNA Genômico

Reagentes e Soluções:

Detergente Nonidet (polyethoxyethanol).

Triton X

Tween 20

Tampão de lise de eritrócitos (Tris/HCl 0,01 M pH 7,6; sacarose 0,32 M; MgCl 5,0 mM; e Triton X-100 1%)

Tampão de lise de leucócitos (Tris/HCl 0,01M pH 8,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; NP-40 0,45%; Tween 20 - 0,45%)

Proteinase K (10 mg/mL)

Procedimento:

A extração de DNA foi realizada a partir de uma adaptação ao método de Higuchi (1989). Aproximadamente 300 μ L de cada amostra foi colocada em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL (tipo *ependorf*), utilizando-se

uma micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, adiciona-se 1,0 mL de tampão de lise de eritrócitos a cada microtubo. Homogeneiza-se a mistura e centrifuga-se o conteúdo dos microtubos a 12.000 giros durante 2 minutos. Retira-se o sobrenadante com o auxílio de um sugador, e acrescenta-se, novamente, 1,0 mL de tampão de lise de eritrócitos ao precipitado avermelhado. Homogeneiza-se e centrifuga-se cada microtubo novamente. Repete-se estes procedimentos até que o precipitado se encontre de cor branca (de 3-4 repetições), indicando a presença de glóbulos brancos (leucócitos) e a ausência de hemácias.

Quando o precipitado adquire esta aparência branca, retira-se o sobrenadante, suspende-se o precipitado em 300 μ L de tampão de lise de leucócitos, e adiciona-se 5 μ L de proteinase K em cada microtubo.

Terminadas estas etapas da extração, as amostras devem ser colocadas em uma estufa a 65°C por um período de 1 hora, e em seguida, em uma estufa a 37°C por um período de aproximadamente 12 horas. Por fim, as amostras devem ser armazenadas em um refrigerador com temperatura aproximada de -4°C

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reagentes e Soluções:

DNA polimerase (Taq): 1 U/ μ L de tampão de estocagem (BIOTOOLS – B & M Labs, AS).

Tampão de estocagem da DNA polimerase: 10 mM de Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 01% Triton x-100, 50% de glicerol (BIOTOOLS – B & M Labs, AS).

dNTP solução estoque: quatro soluções separadas de 100mM de cada base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 8,3 (BIOTOOLS – B & M Labs, AS).

dNTP solução trabalho (20 mM): obtida diluindo-se com água a solução estoque (100mM) de cada dNTP para uma solução única de concentração 20mM (160 μ L de água de MiliQ autoclavada mais 10 μ L da solução estoque de cada dNTP).

Iniciadores (*Primers*) específicos – solução estoque (50 μ M): os *primers* liofilizados (Bio-Synthesis) A e B específicos para cada *locus* foram diluídos em água auto-clavada, e estocados separadamente.

Iniciadores (*Primers*) – solução trabalho (2,5 μ M): 10 μ L do *primer* A, 10 μ L do *primer* B e 180 μ L de água auto-clavada.

Tampão PCR livre de MgCl₂: Tris/HCl 75 mM pH 9.0; KCl 50 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM. (BIOTOOLS – B & M Labs, AS).

MgCl₂: Concentração de 50 mM (BIOTOOLS – B & M Labs, AS).

Procedimento:

Os ensaios da PCR foram realizados em um volume total de 25 μ L. Todos os reagentes (Água, Tampão, dNTP – solução trabalho, *primers* – solução trabalho, MgCl₂ e a Taq DNA polimerase), com exceção do DNA, foram misturados em quantidade específica para cada *locus* (Tabela 4) em um único tubo (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. As seqüências dos *primers* estão na Tabela 3.

Em cada microtubo de 0,5 mL foram pipetados 4 μ L do DNA genômico, previamente extraído. Para cada análise foi usado como controle negativo contendo água no lugar do DNA genômico. Em cada microtubo, sob a amostra, foram pipetados 20 μ L da mistura de reação e uma gota de óleo mineral foi adicionada para evitar a evaporação da mistura de reação durante o processo. O termociclador utilizado foi o MJ Research (Inc PTC-100TM). A este passo seguiu-se o programa correspondente a cada *locus*

(Tabela 3). Após o término da reação de PCR o produto da PCR foi guardado em geladeira (4C°) até sua utilização.

Reação de Restrição

Para a detecção dos SNPs analisados no presente estudo (FY, RB, LPL e CYP1A1) foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. Esta consiste basicamente de um ensaio onde o produto da PCR é posteriormente submetido à ação de endonucleases de restrição. Os *primers* utilizados na PCR flanqueiam a região do gene que contém, ou não, o sítio de restrição específico da enzima utilizada na reação de restrição para cada *locus* (Tabela 3).

O indivíduo pode ser homocigoto para a presença do sítio de restrição da enzima (genótipo *2/*2), heterocigoto (genótipo *1/*2), ou homocigoto para a ausência do sítio de restrição (genótipo *1/*1).

A reação de restrição foi feita em microtubos tipo *ependorf* de 500 µL para cada amostra, ambas as séries contendo 5 µL de DNA previamente amplificado. O controle de reação foi o DNA amplificado de um indivíduo ao qual foi submetido somente água e o tampão comercial específico da enzima. O controle de leitura é o DNA amplificado de um indivíduo de genótipo conhecido.

Em microtubos tipo *ependorf* de 1,5 mL é preparada a mistura de Reação, onde o volume de cada componente utilizado deve ser multiplicado pelo número de amostras a serem utilizadas na reação. A mistura de Reação é constituída por 0,3 µL (3U) da enzima de restrição (10U/µL), 1,0 µL do tampão de reação (específico para cada enzima) e 5,7 µL de água deionizada

autoclavada. O tampão de reação deverá conter as condições de pH e salinidade ótimas para a atividade da enzima de restrição, sendo estas condições específicas para cada enzima. Neste trabalho foram utilizados tampões comerciais que atendiam a estas exigências.

Aplicou-se 7 μ L da mistura de Reação em cada *ependorf* com o auxílio de uma micropipeta e ponteiros estéreis. Com o auxílio de pipetas Hamilton, homogeneiza-se 5 μ L de DNA previamente amplificado de cada indivíduo aos *ependorf* que já contém a mistura de reação. Estes foram então levados a um banho Maria ou ao termociclador, à temperatura de atividade específica para a enzima de restrição utilizada (geralmente 37°C), por um período de 2 horas.

Após este período os tubos são retirados do banho Maria e realiza-se um choque térmico para inativação da enzima com água e gelo e conservam-se os tubos em geladeira, sendo os fragmentos resultantes da reação de Restrição submetidos à eletroforese para detecção da presença ou ausência do sítio de restrição investigado.

Análise do Produto Amplificado

Os produtos amplificados e oriundos das reações de restrição foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) não-desnaturantes a 6% de concentração, exceto para o AIM FY, para o qual foi utilizado PAGE a 10% não-desnaturante.

Reagentes e Soluções:

TEMED: tetrametiletilenodiamina (Pharmacia Biotech).

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1): 29 g de acrilamida; 1 g de bis-acrilamida diluídas em 100 mL de água deionizada.

Solução de EDTA pH 8,0: 186 g de EDTA; 11 de H₂O. Acertar o pH com pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH).

Solução saturada de Persulfato de potássio: 650 mg de persulfato de potássio; 6,5 mL de H₂O.

Tampão TBE 10X (0,9M) pH 8,0: 108 g de Tris (PM=121,1); 53 g ácido bórico; 40 mL de solução de EDTA; H₂O qsp 1L.

Tampão TBE cubas (1X): 100 mL do tampão TBE (10X); 900 mL H₂O.

Tampão de amostra (*Loading buffer*): 900 µL de brofenol; 900 µL xilenocianol; 900 µL TBE; 4,5 mL Ficol 30% diluído em água destilada; 1,8 mL EDTA 0,5 M pH 8,0; 3,6 g sacarose. Misturar tudo até a dissolução completa da sacarose.

Gel não desnaturante 6%: 1,4 mL de glicerol, 12,4 mL de H₂O; 4 mL solução de bis-acrilamida; 2 mL TBE (10x); 15 µL TEMED; 300 µL Solução de persulfato de potássio.

Procedimento:

Os géis não-desnaturantes 6% foram feitos como na receita acima determinada. Os catalizadores da reação de polimerização do gel, TEMED e persulfato de potássio foram adicionados à mistura do gel imediatamente antes de vertê-la em um cassete previamente montado, composto de duas placas de vidro de 12 cm de altura por 16,5 cm de largura, separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos. Logo após, um pente de teflon foi colocado na borda superior, formando poços no gel, onde posteriormente foram aplicadas as amostras de DNA amplificado por PCR ou oriundos das reações de restrição. Aguardou-se a polimerização por cerca de 30 minutos.

Após a polimerização do gel o pente foi retirado e os poços foram lavados com água. O gel polimerizado foi montado em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE cubas (1x), em ambos os pólos (porção superior e inferior). Esta cuba foi conectada a uma fonte de voltagem,

Amershan Pharmacia Biotech (EPS 1001) e ajustada à voltagem constante de 200V, necessária para uma boa separação dos fragmentos amplificados.

Uma pré-corrida de pelo menos 15 minutos foi realizada, onde as cubas com os géis foram ligados às fontes e submetidos à voltagem. A fonte foi desligada e as amostras foram aplicadas nos poços. A eletroforese foi realizada por 1 hora, exceto para o AIM FY, para o qual a eletroforese teve a duração de 1h30 minutos.

Aproximadamente 7 μ L de amostra de DNA amplificado oriundos da PCR ou Reação de restrição, juntamente com 4 μ L de Tampão amostra, foram aplicados nos géis. Para os AIMS que são SNPs (FY, RB e LPL) uma eletroforese prévia era realizada, no intuito de confirmar a amplificação positiva do fragmento de interesse, antes de submetê-lo à ação da enzima de restrição adequada (Tabela 3).

Após a aplicação das amostras as fontes foram novamente ligadas e a eletroforese prosseguiu da maneira descrita acima. Com o término da corrida eletroforética, o gel foi retirado cuidadosamente das placas de vidro e submetido aos procedimentos de coloração e secagem.

Coloração com Nitrato de Prata e Secagem do Gel

Reagentes e soluções:

Solução de nitrato de prata: 10 g nitrato de prata; 100 mL de H₂O. Dissolver a prata em uma parte da água e depois completar com o restante, manter a solução ao abrigo da luz (volume final 100 mL).

Solução fixadora: 160 mL etanol (PA) e 7 mL de ácido acético glacial (PA); 833 mL de H₂O (volume final 1 L).

Solução reveladora: 22,5 g de NaOH; 1 L de H₂O. Dissolver em um agitador o hidróxido de sódio em uma parte da água e depois completar com o restante (volume final 1 L). Na hora da coloração adicionar 1 mL de formaldeído para cada 100 mL da solução.

Procedimento:

A coloração do gel foi feita de acordo com protocolo adaptado de Sanguinetti *et al.* (1994):

Fixação: Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 100 mL de solução fixadora.

Impregnação com Nitrato de prata: adicionou-se 2,0 mL de solução de nitrato de prata, e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água quente por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água.

Revelação: A solução reveladora foi despejada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução foi pré-aquecida em estufa a 65°C, para facilitar a reação de coloração.

Bloqueio da reação: Após ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 100 mL de solução fixadora.

Secagem do gel: Após a leitura, todos os géis passaram por um simples processo de secagem para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram molhadas; uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas; o gel foi colocado sobre a placa com o celofane sem deixar bolhas; o gel foi então bem molhado e coberto com a outra folha de celofane, também com cuidado de não deixar bolhas; este gel foi deixado secando à temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então devidamente identificado e arquivado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Freqüências Gênicas em Populações Ancestrais

A partir de freqüências alélicas de populações parentais disponíveis na literatura foi possível realizar o cálculo da heterozigose e as análises de componente principal.

A média européia ponderada foi obtida a partir das freqüências na Inglaterra, Irlanda, Alemanha (Parra *et al.*, 1998), Portugal (Tomás *et al.*, 2002) e Espanha (dbSNP/NCBI). As freqüências alélicas de República Centro Africana, Nigéria (Benin e Ibadan) (Parra *et al.*, 1998), e Serra Leoa (Mende e Temne) (Parra *et al.*, 2001), foram tomadas para o cálculo da média ponderada Africana; e a média ponderada das freqüências alélicas dos Maias (México) e de indígenas do Sudoeste dos Estados Unidos (representados por uma amostra envolvendo os Pima, Pueblo e Cheyenne; dbSNP/NCBI) foi calculada para os indígenas da América do Norte. As freqüências destes AIMs em indígenas da Amazônia Brasileira foram obtidas em Luizon *et al.* (2007a).

As estimativas de mistura obtidas com o software ADMIX também podem ser calculadas a partir de freqüências alélicas. Entretanto, nesse caso as freqüências parentais européias foram representadas por Portugueses e as africanas pela freqüência observada na cidade de Santana, cidade da Ilha de São Tomé (Tomás *et al.*, 2002), tal como realizado por Parra *et al.* (2003). Esta Ilha serviu como entreposto durante o tráfico negreiro pelo

Atlântico e, por isso, possui uma população teve origem em várias regiões Africanas (Tomás *et al.*, 2002).

No entanto, o cálculo do F_{ST} e as análises do software *Structure* exigem frequências genóticas, que não estão disponíveis na literatura. Esta informação genotípica referente aos AIMS aqui analisados, exceto o CYP1A1, para indivíduos da Nigéria (Africana) e da Espanha e Alemanha foi gentilmente cedida pelo Dr. Mark David Shriver, Professor do Departamento de Antropologia da Universidade da Pennsylvania (Shriver, informação pessoal). Duas amostras aleatórias de 55 indivíduos para cada um daqueles grupos étnicos foram selecionadas com o uso da função aleatório no programa Excel®. Estes genótipos Africanos e Europeus foram admitidos como parentais nas comparações par a par dos valores de F_{ST} e também nas análises do software *Structure*.

Aderência ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Em que:

x_i^2 é a frequência esperada dos homozigotos do alelo i;

$2 x_i x_j$ é a frequência esperada do heterozigoto ij;

$2x_j^2$ é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo j.

A aderência das frequências genóticas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o emprego do programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995a) versão 3.4, disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>. Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterozigotos.

No teste exato de probabilidade, o valor de P corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado.

O segundo e o terceiro são testes mais sensíveis do que o de probabilidade e utilizam uma hipótese alternativa (H1) de excesso ou de deficiência de heterozigotos, respectivamente.

Desequilíbrio de Ligação entre Loci

A análise de associações par-a-par entre *loci* foi realizada utilizando-se o programa GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset, 1995a). A hipótese nula é de que a distribuição genotípica em um *locus* é independente da distribuição em outro *locus*. Esta análise foi aplicada para verificar desvios do esperado pela regra de multiplicação entre pares de *loci* localizados em diferentes cromossomos. A palavra “ligação” neste caso não está relacionada com associação física entre alelos de *loci* de um mesmo cromossomo.

Diferenciação genética das populações

Os testes exatos para diferenciação populacional foram realizados com o uso do programa GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset, 1995a). Este utiliza tabelas de contingência RxC geradas automaticamente para cada *locus*, em que R é o número de populações e C é o número de alelos no *locus*.

Este procedimento compara cada *locus* em pares de populações, para determinar se existem diferenças nas frequências alélicas observadas, onde a hipótese nula testada é a de que a distribuição alélica é idêntica entre as populações (Raymond & Rousset, 1995b).

Diversidade gênica

A diversidade gênica média (\bar{H}_s) com o respectivo erro padrão foi calculada para cada comunidade utilizando o programa DISPAN (Ota, 1993), conforme a equação 8.6 apresentada em Nei (1987):

$$H = \sum_{j=1}^r h_j / r$$

Em que r é o número de *loci* utilizados e h_j , de acordo com a equação 8.1 de Nei (1987), é a heterozigose esperada para cada *locus* na j-ésima população, estimada por:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Em que m é o número de alelos.

Esta medida de heterozigose média é equivalente à proporção média de heterozigotos por *locus* em uma população com padrão de acasalamento aleatório e, também, é igual à proporção de *loci* heterozigotos em um indivíduo escolhido aleatoriamente. O desvio padrão desta estimativa é descrito pela seguinte equação adaptada (Nei, 1987):

$$H = \left[\sum_{j=1}^r h_j - H \right]^2 / (r-1)r^{1/2}$$

As estatísticas F foram obtidas como descrito por Weir (1984), usando o pacote Genetic Data Analysis Package GDA (Lewis & Zaykin, 1997). São definidos 3 parâmetros:

F_{IS} : Coeficiente de endogamia dentro de uma população (déficit de heterozigotos dentro de uma população);

F_{IT} : Coeficiente de endogamia total, dado pela probabilidade de dois alelos tomados ao acaso de todo o conjunto populacional sejam idênticos por descendência (déficit de heterozigotos global);

F_{ST} : Coeficiente de endogamia em um par de populações, dado pela probabilidade de dois alelos tomados ao acaso em duas populações serem idênticos por descendência (déficit de heterozigotos entre populações).

Estes três parâmetros estão relacionados da seguinte maneira:

$$F_{IS} = (F_{IT} - F_{ST}) / (1 - F_{ST})$$

Para testar se os valores de F_{ST} diferiam significativamente de zero, foi realizado o procedimento de *bootstrap* com 1000 replicações. Se os intervalos de confiança de 95% e 99% assim obtidos não incluíam o zero, a estimativa

foi considerada significativamente diferente de zero com $\alpha = 5\%$ ou 1% , respectivamente.

Inferência de Estrutura Populacional (*Structure*)

O programa *Structure* (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>) utiliza um método de agrupamento, baseado no modelo desenvolvido por Pritchard *et al.* (2000), para a inferência de estrutura populacional utilizando dados genotípicos de marcadores não ligados.

A opção *Use Pop Info Selection* FLAG foi habilitada no intuito de determinar de forma mais precisa os clusters que representam os indivíduos sabidamente pertencentes a populações consideradas parentais: Africana (55 Nigerianos) e Européia (55 Espanhóis e Alemães) e Ameríndios da Amazônia Brasileira (55 indivíduos aleatoriamente selecionados dentre os 309 genotipados por Luizon *et al.*, 2007a). Na opção *Ancestry Model* foi selecionado *Use Population Information*. As análises foram realizadas com $K = 3$ como parâmetro predefinido para o número de populações assumidas como parentais, com 30.000 interações para o período *burn-in* e 100.000 interações adicionais para obter as estimativas dos parâmetros.

Análises de Componente Principal

O programa MVSP (Multivariate Statistical Package for Windows, version 3.1, acessado em <http://www.kovcomp.com/mvsp/>) foi utilizado para a obtenção de Análises de Componente Principal relacionando as populações remanescentes de quilombo e as urbanas analisadas com populações africanas, européias, afro-americanas e euro-americanas (Parra

et al., 1998) e também com populações Ameríndias dos EUA (dbSNP) e da Amazônia Brasileira (Luizon *et al.*, 2007a).

Devido ao número diferente de freqüências alélicas disponíveis na literatura para comparação, foram realizadas duas análises: (1) com seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO) e (2) adicionando-se o *locus* PV92 aos seis primeiros AIMs.

Estimativas de mistura étnica

As estimativas das proporções étnicas foram obtidas segundo o método de identidade gênica (Chakraborty, 1985) a partir do programa ADMIX 2 e 3.

A estimativa foi primeiro realizada admitindo-se um modelo tri-híbrido de mistura, no qual as freqüências de Portugueses foram utilizadas como parental européia, da cidade de Santana (Ilha de São Tomé) como parental africana (Tomás *et al.*, 2002) e a freqüência média de sete aldeias da Amazônia Brasileira como parental ameríndia (Luizon *et al.*, 2007a), utilizando o programa ADMIX 3. Nos casos onde houve inconsistência com alguma das populações consideradas como parentais, a mesma foi retirada e a estimativa foi refeita somente com as duas outras populações parentais, utilizando o programa ADMIX 2.

O método de identidade gênica foi escolhido para permitir a comparação com as estimativas de mistura obtidas a partir de marcadores clássicos, STRs autossômicos e ligados ao cromossomo Y nas mesmas amostras de São Gonçalo e Jequié (Sousa, 2001).

RESULTADOS

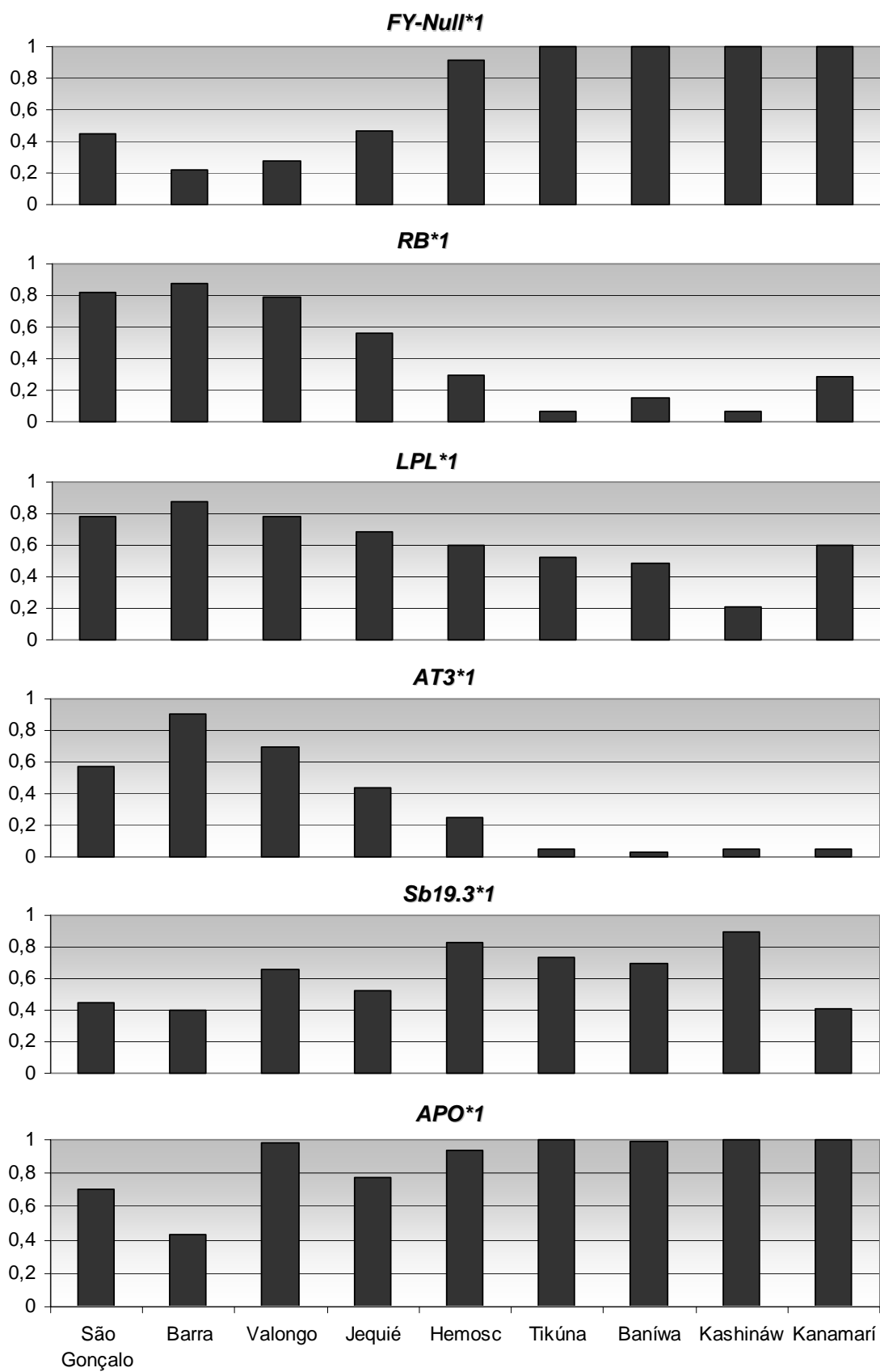
FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E HETEROZIGOSE

O presente trabalho apresenta resultados gerados a partir da freqüência alélica de oito AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO, PV92 e CYP1A1) em três comunidades remanescentes de quilombo, duas populações urbanas e em quatro tribos indígenas da Amazônia Brasileira. Para estas últimas, as freqüências dos primeiros sete marcadores são aquelas já anteriormente publicadas (Luizon *et al.*, 2007a).

Em todas estas populações foram observados os dois alelos previamente identificados para os AIMs analisados (Tabela 5 e Figura 5), com exceção do alelo *CYP1A1*2C*, ausente na comunidade de Valongo. As freqüências deste alelo nas tribos indígenas da Amazônia Brasileira foram superiores a 80%.

TABELA 5. Freqüências alélicas dos oito AIMs e diversidade genética (H_s) nas comunidades remanescentes de quilombo, populações urbanas e ameríndias analisadas. As freqüências se referem ao alelo *CYP1A1*2C* e aos alelos *1 dos demais loci.

	FY	RB	LPL	AT3	Sb19.3	APO	PV92	CYP1A1	$H_s \pm$ Desvio padrão
S. Gonçalo	43/96	82/100	80/102	58/102	45/100	70/100	15/102	18/102	0,388 \pm 0,036
Barra	21/94	82/94	82/94	85/94	38/94	40/92	30/94	3/94	0,308 \pm 0,056
Valongo	11/40	38/48	28/36	35/50	33/50	49/50	27/50	0/50	0,317 \pm 0,067
Jequié	44/94	53/94	64/94	41/94	49/94	73/94	31/94	9/90	0,427 \pm 0,039
HEMOSC	33/36	14/48	30/50	12/48	38/46	45/48	14/50	4/46	0,303 \pm 0,051
<i>Tikúna</i>	289/290	28/398	193/370	19/392	292/396	391/392	368/386	344/374	0,170 \pm 0,063
Umariacú	42/84	2/102	55/96	4/102	82/102	97/98	95/98	92/98	0,140 \pm 0,061
Feijoal	62/62	15/104	63/98	9/96	72/100	102/102	99/102	94/98	0,178 \pm 0,064
Vendaval	70/70	2/98	35/92	1/100	61/100	98/98	85/92	74/90	0,182 \pm 0,073
Belém	73/74	9/94	40/84	5/94	77/94	94/94	89/94	84/88	0,162 \pm 0,056
<i>Baniwa</i>	92/92	14/92	45/92	3/92	63/90	91/92	78/92	78/88	0,218 \pm 0,065
<i>Kashináwa</i>	50/50	4/60	9/44	3/60	50/56	60/60	50/60	40/50	0,170 \pm 0,048
<i>Kanamari</i>	62/62	19/66	36/60	3/66	27/66	66/66	53/58	61/66	0,223 \pm 0,074



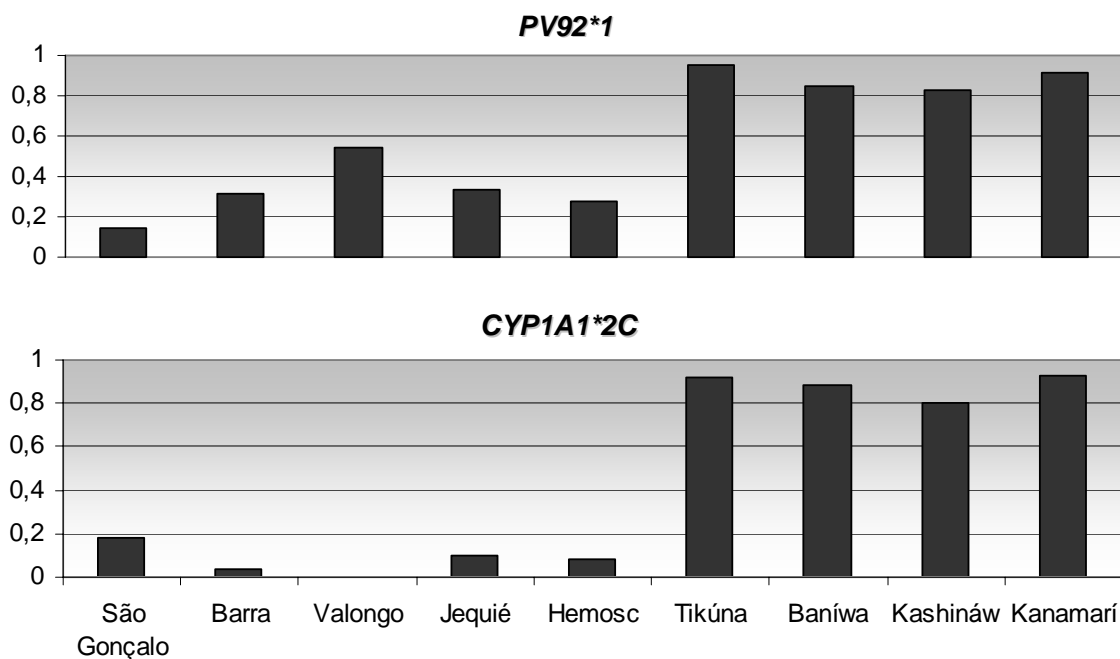


FIGURA 5. Comparação das freqüências dos AIMs entre as comunidades remanescentes de quilombo de São Gonçalo, Barra e Valongo, as populações urbanas de Jequié e HEMOSC, e as tribos da Amazônia Brasileira, Tikúna, Baniwa, Kashinawa e Kanamarí.

A comparação das freqüências alélicas e genotípicas entre as três comunidades remanescentes de quilombo e as duas amostras urbanas par a par, pelo teste exato de Fisher, revela diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) quando considerados todos os *loci*, exceto entre São Gonçalo e Jequié para as freqüências genotípicas (Tabela 6).

Dentre as comparações envolvendo as populações ameríndias, destaques para a diferenciação entre Vendaval e Feijoal e Belém dentre as aldeias da tribo Tikúna, com relação às freqüências alélicas, e a não diferenciação da tribo Baniwa das demais aldeias analisadas (Tabela 6).

TABELA 6. Diferenciação das frequências gênicas e genotípicas entre os pares de populações analisadas. Os valores significativos ($p < 0,05$) após a correção de Bonferroni ($\alpha_{\text{Bonf.}} < 0,007$) estão destacados em negrito.

Populações	Gênica	Genotípica	Populações	Gênica	Genotípica
Umariacú x Feijoal	0,0382	0,1044	Belém x SG	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x Vendaval	0,0023	0,0039	Belém x JQ	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x Belém	0,5727	0,6086	Belém x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x BAN	0,0024	0,0012	Belém x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x KASH	< 10^{-4}	0,0001	Belém x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x KAN	< 10^{-4}	< 10^{-4}	BAN x KASH	0,0076	0,0056
Umariacú x SG	< 10^{-4}	< 10^{-4}	BAN x KAN	0,0102	0,0125
Umariacú x JQ	< 10^{-4}	< 10^{-4}	BAN x SG	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}	BAN x JQ	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}	BAN x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Umariacú x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}	BAN x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x Vendaval	< 10^{-4}	< 10^{-4}	BAN x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x Belém	0,2730	0,3212	KASH x KAN	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x BAN	0,0123	0,0128	KASH x SG	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x KASH	< 10^{-4}	< 10^{-4}	KASH x JQ	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x KAN	0,0007	0,0006	KASH x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x SG	< 10^{-4}	< 10^{-4}	KASH x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x JQ	< 10^{-4}	< 10^{-4}	KASH x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}	KAN x SG	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}	KAN x JQ	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Feijoal x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}	KAN x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x Belém	0,0004	0,0018	KAN x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x BAN	0,0085	0,0081	KAN x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x KASH	0,0009	0,0009	SG x JQ	0,0002	0,0010
Vendaval x KAN	< 10^{-4}	< 10^{-4}	SG x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x SG	< 10^{-4}	< 10^{-4}	SG x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x JQ	< 10^{-4}	< 10^{-4}	SG x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}	JQ x BR	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}	JQ x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Vendaval x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}	JQ x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Belém x BAN	0,2014	0,2385	BR x VAL	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Belém x KASH	0,0047	0,0087	BR x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}
Belém x KAN	< 10^{-4}	< 10^{-4}	VAL x HEM	< 10^{-4}	< 10^{-4}

Os marcadores PV92 e CYP1A1 não apresentam frequências alélicas disponíveis para muitas populações, razão pela qual não foram considerados

como base para a estimativa da diversidade genética (H_s) em diferentes populações mundiais (Tabela 7). Dentre as comunidades remanescentes de quilombo do presente trabalho, os valores de heterozigose (H_s) observados em BR (0,308) e VAL (0,317) são concordantes com o valor observado para os Afro-americanos dos EUA, exceto os Gullah (Pfaff *et al.*, 2001). Por outro lado, os valores observados em JQ e SG (Tabela 5) são superiores a todos os valores apresentados na Tabela 7, provavelmente explicados pela maior mistura étnica nestas comunidades (Sousa, 2001).

TABELA 7. Diversidade genética (H_s) obtidas a partir dos AIMs FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO entre diferentes populações mundiais.

Populações	n	$H_s \pm$ desvio padrão	Refs.
Europa	407	0,295 \pm 0,090	(1)
Inglaterra	44	0,291 \pm 0,101	(2)
Irlanda	86	0,282 \pm 0,095	(2)
Alemanha	30	0,340 \pm 0,095	(2)
Portugal	168	0,297 \pm 0,086	(3)
Espanha	79	0,299 \pm 0,093	(4)
África	474	0,186 \pm 0,085	(1)
Repúb. Centro Africana	49	0,189 \pm 0,083	(3)
Nigéria-1	46	0,189 \pm 0,086	(3)
Nigéria-2	100	0,171 \pm 0,090	(3)
Serra Leoa (Mende)	181	0,192 \pm 0,083	(5)
Serra Leoa (Temne)	98	0,189 \pm 0,090	(5)
Indígenas da Am. do Norte	184	0,285 \pm 0,090	(1)
Maias	96	0,293 \pm 0,088	(4)
Pima, Pueblo e Cheyenne	88	0,277 \pm 0,095	(4)
Afro-Americanos	1020	0,327 \pm 0,051	(1*)
Euro-Americanos	125	0,302 \pm 0,092	(1*)
Gullah (isolado)	83	0,210 \pm 0,074	(5)

Referências: (1) Valores obtidos a partir de médias ponderadas das frequências alélicas apresentadas em Materiais e Métodos (pag. 53). e em Parra *et al.*, 1998. (2) Parra *et al.*, 1998, (3) Tomás *et al.*, 2002, (4) dbSNP/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), (5) Parra *et al.*, 2001.

EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

As frequências genotípicas dos oito *loci* foram comparadas aos valores esperados pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste exato (Tabela 8).

TABELA 8. Probabilidade de desvio casual segundo teste exato (Guo e Thompson, 1992) para a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores significativos antes da correção de Bonferroni estão destacados em itálico e sublinhado e os valores significativos após a correção ($\alpha_{Bonf.} < 0,0005$) estão destacados em negrito

	FY	RB	LPL	AT3	Sb19.3	APO	PV92	CYP1A1	Multi-locus
São Gonçalo	0,2402	0,6422	0,2085	0,1595	<u>0,0432</u>	<u>0,0048</u>	<u>0,0061</u>		0,0017
Barra					<u>0,0019</u>	< 10 ⁻⁴	0,7442		0,0003
Valongo		0,5394	0,5289		0,6626		0,4340		0,9579
Jequié	0,5637	0,0003	0,7442	0,0003	<u>0,0030</u>	0,2002		0,3576	< 10 ⁻⁴
HEMOSC				0,0004					0,4845
Tikúna		<u>0,0009</u>	0,883	0,367	0,365			<u>0,002</u>	0,0030
Umariáçú			0,7728		0,3731				0,9982
Feijoal		<u>0,0056</u>							0,5842
Vendaval			0,7643					<u>0,0184</u>	0,5776
Belém		0,3441	0,7631	0,1058	0,6257			0,0686	0,3361
Baniwa		0,5699	0,7677		0,1672				0,9498
Kashináwa							0,1547	0,5418	0,9594
Kanamari		0,2226	0,2643		0,4700		0,1707		0,5537
Multi-populacional	0,9474	0,0714	0,9954	<i>0,0115</i>	<i>0,0255</i>	< 10 ⁻⁴	0,7116	0,7834	<i>0,000</i>

O *locus* CYP1A1 mostrou desvio significativo ($P < 0,05$) na aldeia Vendaval e na tribo Tikúna (considerando as quatro aldeias conjuntamente). O teste sensível à deficiência de heterozigotos indica que deficiência significativa ($P < 0,05$) de heterozigotos deste *locus* nestas amostras.

Desvios significativos foram também observados nas comunidades de SG e BR, bem como nas amostras urbanas de Jequié e HEMOSC (Tabela 8). O teste sensível à deficiência de heterozigotos indicou deficiência significativa de heterozigotos nestas amostras.

O teste exato não foi aplicado aos *loci* APO e CYP1A1 em VAL, e FY e APO nos ameríndios, pois estes se mostraram monomorfos.

Dado o grande número de testes independentes (72), torna-se necessário realizar a correção de Bonferroni (Hartl & Clark, 2007). Por este procedimento, o limite α de 5% foi recalculado pelo número de testes (0,05/72), de onde derivou-se o valor de $\alpha_{\text{Bonf.}} = 0,0007$.

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Associações significativas entre *loci* não ligados sugerem a presença de estrutura genética, razão pela qual o padrão de associações par-a-par entre os AIMs não ligados foi analisado. Os *locus* FY e AT3, considerados ligados, embora distantes 22cM (Parra *et al.*, 1998), também foram incluídos na análise, pois a associação entre os mesmos é indicativa de ALD (*Admixture Linkage Disequilibrium*), isto é, desequilíbrio de ligação gerado pela mistura recente (Pfaff *et al.*, 2001).

Em cada uma das populações, os oito AIMs considerados par a par permitiram 28 comparações. Dentre as comunidades remanescentes de quilombo foram observadas associações entre os *loci* FY/AT3 (P=0,043), FY/Sb19.3 (P=0,009) e FY/CYP1A1 (P=0,040) em SG; entre os *loci* FY/AT3 (P=0,036), FY/APO (P=0,000), AT3/APO (P=0,014), Sb19.3/PV92 (P=0,040), RB/CYP1A1 (P=0,013) e LPL/CYP1A1 (P=0,013) em BR, e entre os *loci* RB/PV92 (P=0,031) em VAL.

Na amostra urbana de JQ foram observadas associações entre os *loci* FY/AT3 (P=0,022) e APO/PV92 (P=0,002), e na amostra do HEMOSC entre os *loci* LPL/Sb19.3 (P=0,040).

Pelo nível de significância aqui considerado ($\alpha=0,05$) seriam esperadas de uma a duas associações significativas. No entanto, após realizada a correção de Bonferroni ($\alpha=0,05/28$ comparações) o novo valor de significância admitido é $\alpha_{\text{bonf}} = 0,0018$, e somente a associação entre os *loci* FY e APO ($p=0,000$) em BR foi considerada significativa.

DIVERSIDADE INTERPOPULACIONAL (*ESTATÍSTICAS F*)

Coeficiente de Endogamia (F_{IS})

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi altamente significativo ($p<0,01$) para SG e VAL, e significativo ao nível de 5% para JQ (Tabela 9).

TABELA 9. Valores de F_{IS} e seus intervalos de confiança (IC) para as populações analisadas. Valores significativos em negrito, pois seus IC não incluem o valor zero.

Populações	F_{IS}	IC = 95%	IC = 99%
Três Remanescentes			
São Gonçalo	0,237	0,134 a 0,344	0,046 a 0,373
Barra	0,196	-0,092 a 0,472	-0,102 a 0,536
Valongo	-0,152	-0,211 a -0,089	-0,226 a -0,063
Amostras urbanas			
Jequié	*0,228	*0,033 a 0,418	-0,026 a 0,467
HEMOSC	0,103	-0,078 a 0,366	-0,117 a 0,470
Africanos	- 0,036	- 0,102 a 0,032	- 0,118 a 0,051
Europeus	- 0,035	- 0,098 a 0,043	- 0,102 a 0,076
Ameríndios	0,142	0,057 a 0,207	0,020 a 0,226

Diversidade inter-populacional (F_{ST} e G_{ST})

Todos os valores de F_{ST} (Tabela 10) foram significativos e indicam diferenças entre as três comunidades remanescentes de quilombo, quando estas são individualmente comparadas às populações urbanas e na

comparação entre as duas populações urbanas. Isto demonstra a grande heterogeneidade existente entre estas populações.

TABELA 10. Valores de F_{ST} e intervalos de confiança (IC) para diferentes conjuntos e pares de populações. Valores significativos em negrito, pois seus IC não incluem o valor zero.

Pares ou conjuntos	F_{ST}	IC = 95%	IC = 99%
Três Remanescentes	0,103	0,043 a 0,162	0,031 a 0,179
São Gonçalo / Valongo	0,094	0,102 a 0,337	0,019 a 0,208
Valongo / Barra	0,147	0,030 a 0,301	0,015 a 0,346
São Gonçalo / Barra	0,085	0,024 a 0,145	0,012 a 0,172
Remanescentes vs. Urbanas			
São Gonçalo / Jequié	*0,030	*0,002 a 0,067	-0,001 a 0,079
Barra / Jequié	0,147	0,050 a 0,251	0,035 a 0,293
São Gonçalo / HEMOSC	0,216	0,114 a 0,311	0,081 a 0,334
Barra / HEMOSC	0,408	0,239 a 0,540	0,183 a 0,578
Valongo / HEMOSC	0,274	0,115 a 0,409	0,058 a 0,454
Duas amostras urbanas - Jequié / HEMOSC	0,108	0,026 a 0,189	0,010 a 0,221
Todas as populações	0,139	0,084 a 0,183	0,078 a 0,201

Todas as comparações entre as populações aqui analisadas e as populações parentais (Africanos, Europeus e Ameríndios) mostraram diferenças significativas, exceto Barra vs. Africanos e HEMOSC vs. Europeus (Tabela 11).

TABELA 11. Valores de F_{ST} e intervalos de confiança (IC) entre as populações analisadas e populações mundiais. Valores significativos em negrito, pois seus IC não incluem o valor zero.

Pares ou conjuntos	F_{ST}	IC = 95%	IC = 99%
Africanos / São Gonçalo	0,150	0,035 a 0,288	0,020 a 0,329
Africanos / Jequié	0,241	0,128 a 0,353	0,0950 a 0,383
Africanos / Barra	0,043	- 0,001 a 0,114	- 0,006 a 0,144
Africanos / Valongo	0,261	0,098 a 0,395	0,057 a 0,434
Africanos / HEMOSC	0,538	0,324 a 0,743	0,259 a 0,806
Europeus / São Gonçalo	0,273	0,140 a 0,399	0,107 a 0,443
Europeus / Jequié	0,173	0,044 a 0,334	0,040 a 0,371
Europeus / Barra	0,460	0,286 a 0,608	0,252 a 0,643
Europeus / Valongo	0,338	0,170 a 0,550	0,149 a 0,606
Europeus / HEMOSC	0,004	- 0,0080 a 0,024	- 0,012 a 0,035
Ameríndios / São Gonçalo	0,447	0,239 a 0,630	0,157 a 0,663
Ameríndios / Jequié	0,297	0,126 a 0,466	0,080 a 0,504
Ameríndios / Barra	0,576	0,379 a 0,733	0,285 a 0,759
Ameríndios / Valongo	0,449	0,204 a 0,660	0,081 a 0,721
Ameríndios / HEMOSC	0,229	0,032 a 0,496	0,021 a 0,574
Todas as populações	0,324	0,226 a 0,440	0,196 a 0,462

ESTRUTURA POPULACIONAL

Para as análises com o software *Structure* foram utilizados os genótipos de 55 indivíduos da Nigéria como parentais Africanos, 55 Espanhóis e Alemães como parentais Europeus (Shriver, comunicação pessoal), e 55 indivíduos aleatoriamente selecionados de quatro tribos indígenas da Amazônia Brasileira como parentais ameríndios (Luizon *et al.*, 2007a). A opção FLAG foi habilitada no intuito de determinar de forma mais precisa os *clusters* que representam os indivíduos reconhecidamente pertencentes a populações consideradas parentais.

As análises foram realizadas com $K = 3$ como parâmetro predefinido para o número de populações, com 30.000 interações para o período *burn-in* e 100.000 interações adicionais para obter as estimativas dos parâmetros.

A comunidade de Barra e a população urbana de Florianópolis (HEMOSC) apresentam grande contribuição africana e européia, respectivamente. Por outro lado, as comunidades de Valongo e São Gonçalo apresentam estrutura populacional, isto é, sub-populações de indivíduos geneticamente similares (Figura 6).

Os diagramas triangulares reforçam a maior similaridade de Barra com os Africanos (Figura 7A) e a heterogeneidade dos indivíduos da comunidade de São Gonçalo e da população urbana de Jequié (Figura 7B).

É importante notar que estas análises não foram realizadas com o *locus* CYP1A1, pois o mesmo não apresenta dados disponíveis para as mesmas populações reconhecidas como parentais utilizadas nesta análise. Assim como lembrar também que o alelo *CYP1A1*2C* apresenta grandes diferenças de frequência alélica entre populações ameríndias e africanas e européias (Luizon *et al.*, 2007b).

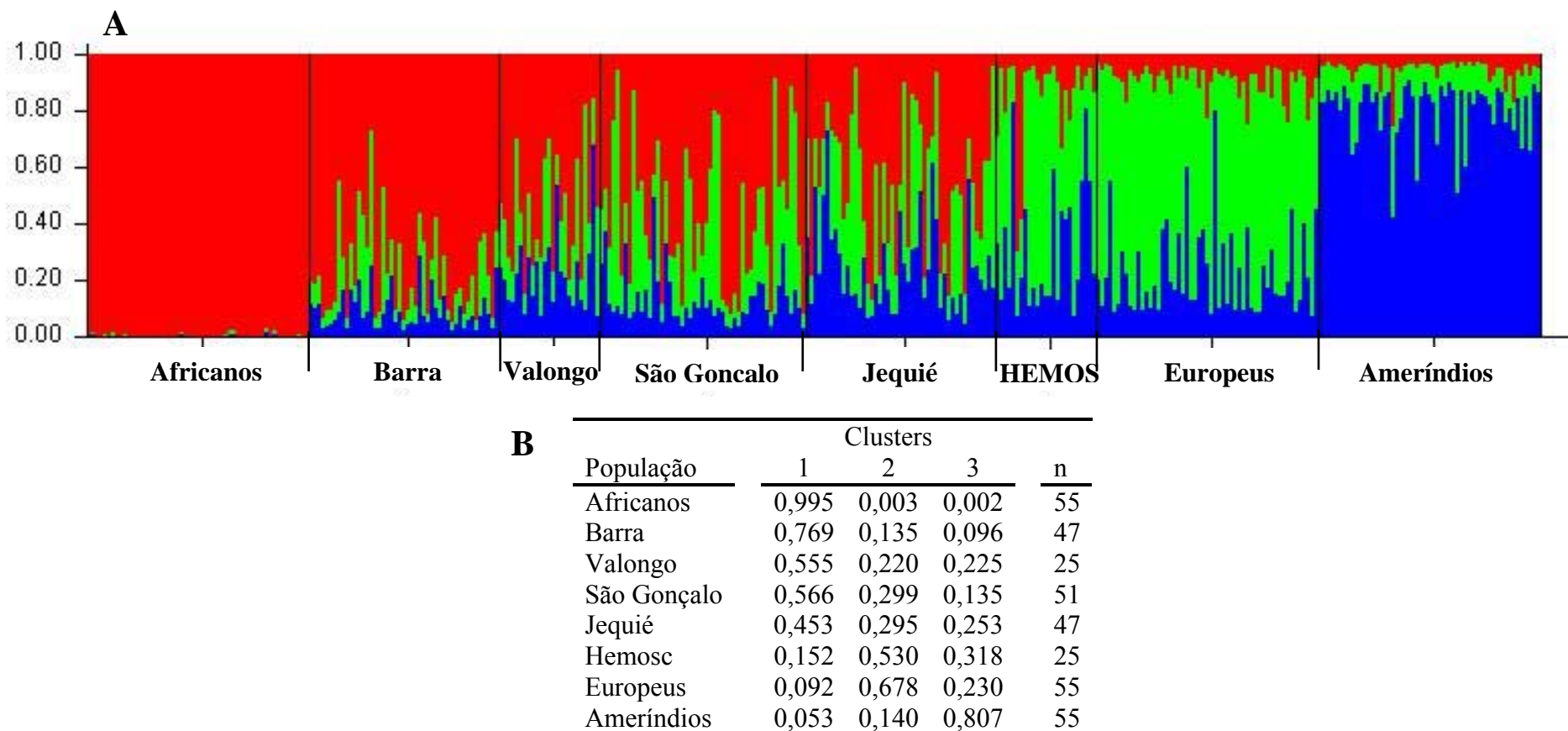


FIGURA 6. (A) Estrutura populacional nas comunidades remanescentes de quilombo e nas populações urbanas, em comparação com populações parentais Africanas, Europeias e Ameríndios da Amazônia Brasileira, obtido a partir de sete AIMs (com exceção do CYP1A1). Foram admitidas $k = 3$ populações, 30.000 interações para o período *burn-in* e 100.000 interações para as estimativas dos parâmetros. (B) Proporção de associação de cada população a cada um dos três clusters.

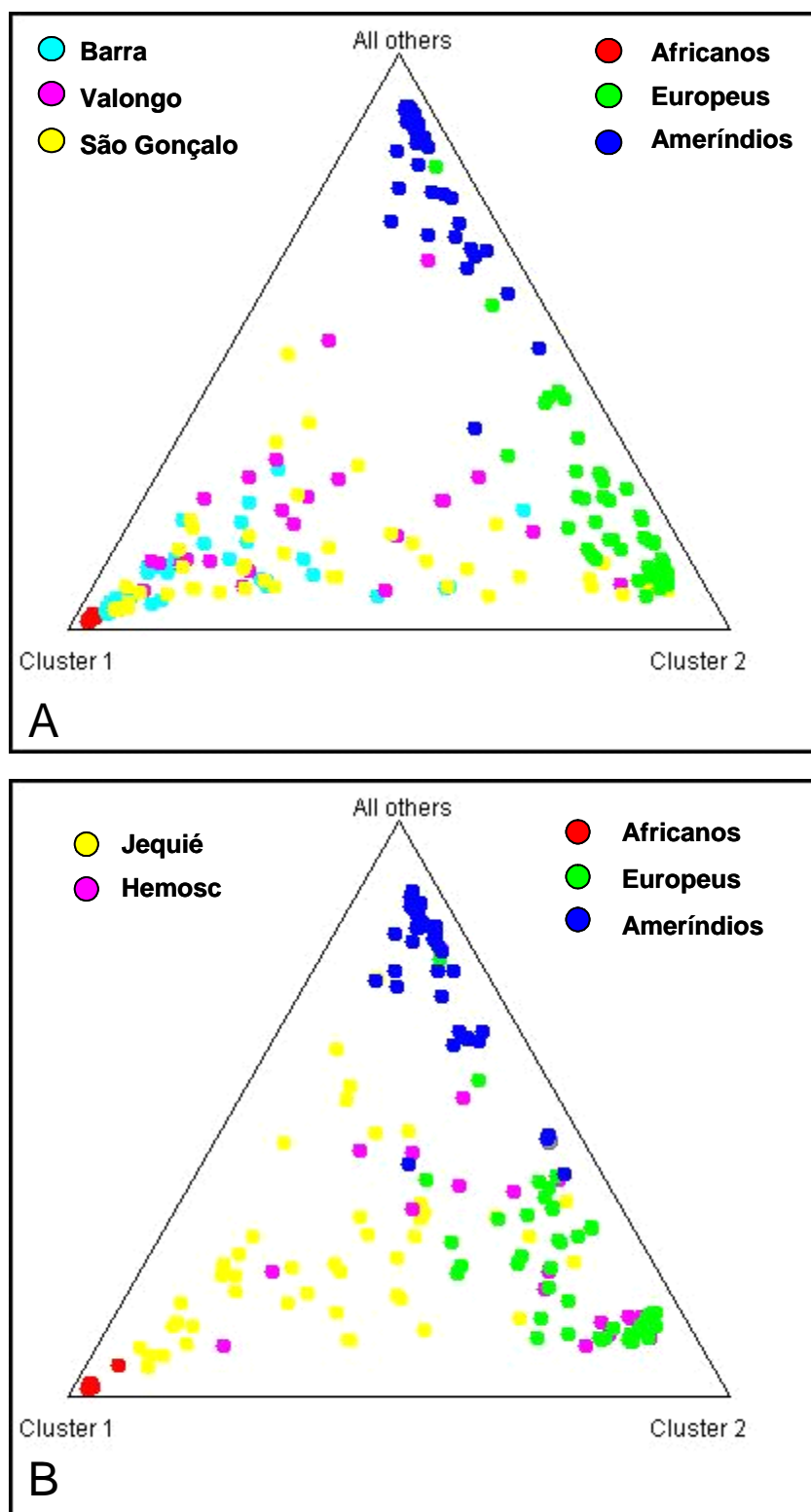


FIGURA 7. Agrupamento dos indivíduos (círculos) das comunidades de (A) Barra, Valongo e São Gonçalo e de (B) Jequié e do HEMOSC, de acordo a contribuição dos grupos étnicos parentais: africano, europeu e ameríndio.

ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL

O objetivo das análises de componente principal foi verificar o agrupamento, com base nas frequências alélicas, das comunidades remanescentes de quilombo e populações urbanas aqui analisadas com populações africanas, europeias, ameríndias, afro-americanas e euro-americanas. Para tanto, foram utilizadas as frequências da literatura citadas no Material e Métodos (página 53). As análises obtidas a partir de seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO) encontram-se na Figura 8 e nas Tabelas 12 e 13.

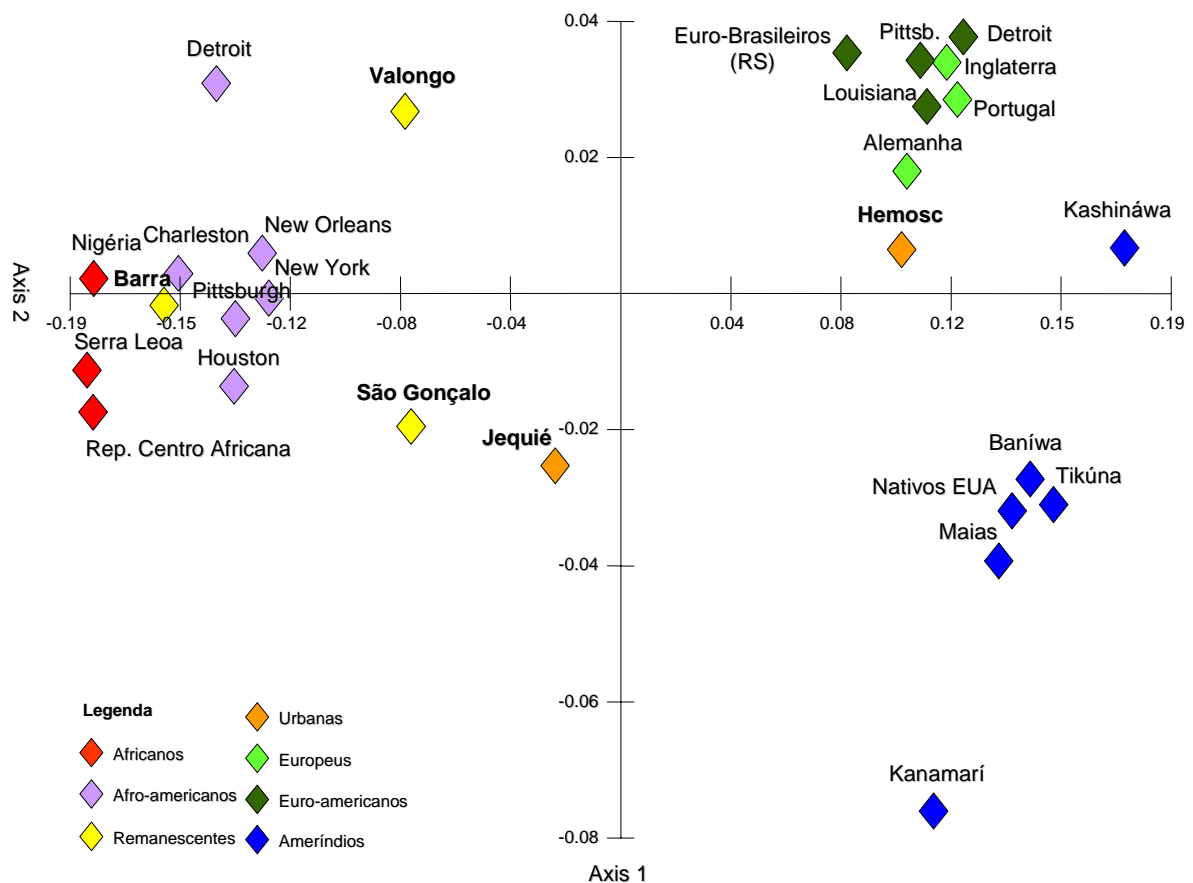


FIGURA 8. Componentes principais obtidos a partir de seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO) que relacionam as frequências alélicas das populações analisadas com populações mundiais. Populações africanas e europeias (Parra *et al.*, 2001; Tomás *et al.*, 2002), afro- e euro-americanas (Parra *et al.*, 1998), euro-brasileiros (Zembrzuski *et al.*, 2006), e populações indígenas da América do Norte (dbSNP, PSU-ANTH) e da Amazônia Brasileira (Luizon *et al.*, 2007a).

Tabela 12. Características dos componentes principais baseados nas frequências alélicas de seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO).

Componente	Eigenvalue	Proporção explicada (%)	Proporção cumulativa explicada (%)
Axis 1	0,469	92,605	92,605
Axis 2	0,021	4,052	96,657

Tabela 13. Pesos (*loadings*) das variáveis na resolução dos componentes principais na análise baseada em seis AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO).

	Axis 1	Axis 2
FY	0,602	0,06
RB	- 0,444	0,184
LPL	- 0,316	- 0,179
AT3	- 0,435	0,486
Sb19.3	0,224	0,832
APO	0,318	0,044

A população de BR está agrupada com as populações africanas e afro-americanas. As comunidades remanescentes de quilombo de VAL e SG encontram-se próximas a este agrupamento, mas mais distantes que os Afro-americanos dos EUA das populações Africanas. A população urbana do HEM, por outro lado, encontra-se próxima ao agrupamento das populações européias, euro-americanas e euro-brasileiros (Figura 8).

As frequências do *locus* PV92 não estão disponíveis para todas as populações acima. No entanto, devido à importância deste AIM na separação entre ameríndios e europeus, uma análise separada foi realizada incluindo este marcador (Figura 9 e Tabelas 14 e 15). O alelo *CYP1A1*2C* não foi incluso nesta análise, pois suas frequências não estão disponíveis para as populações comparadas.

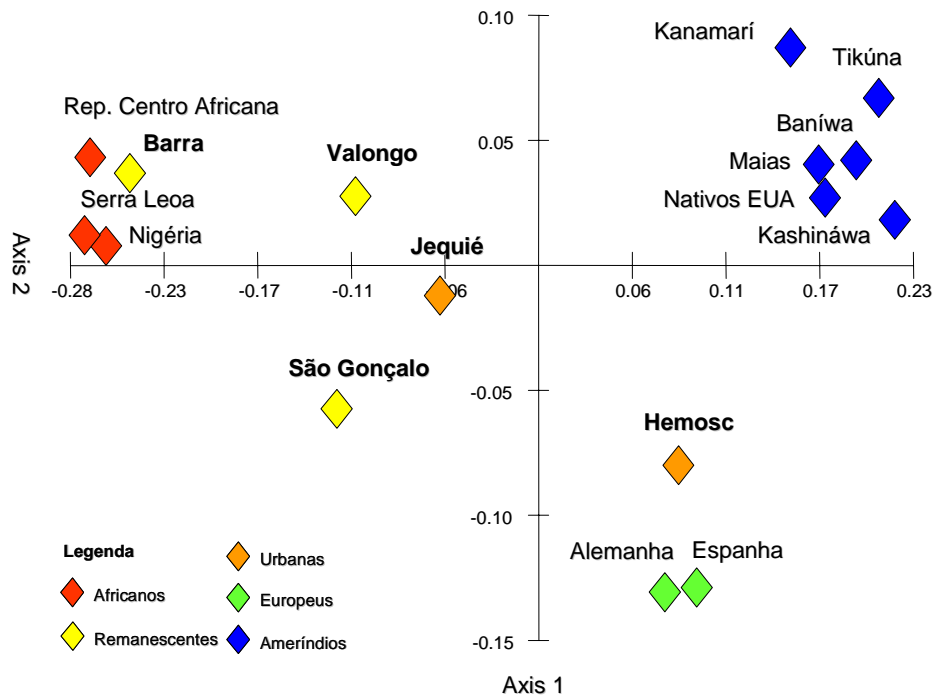


FIGURA 9. Componentes principais obtidos a partir da adição do locus PV92 aos seis AIMs da Figura 8, que relacionam as frequências alélicas das populações analisadas com populações mundiais. Populações africanas e europeias (Parra *et al.*, 2001; Tomás *et al.*, 2002), afro- e euro-americanas (Parra *et al.*, 1998), euro-brasileiros (Zembrzuski *et al.*, 2006), e populações indígenas da América do Norte (dbSNP, PSU-ANTH) e da Amazônia Brasileira (Luizon *et al.*, 2007a).

Tabela 14. Características dos componentes principais baseados nas frequências alélicas de sete AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO e PV92).

Componente	Eigenvalue	Proporção explicada (%)	Proporção cumulativa explicada (%)
Axis 1	0,560	85,43	85,43
Axis 2	0,064	9,7	95,13

Tabela 15. Pesos (*loadings*) das variáveis na resolução dos componentes principais na análise baseada em sete AIMs (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO e PV92).

	Axis 1	Axis 2
FY	0,552	- 0,286
RB	- 0,442	- 0,017
LPL	- 0,29	0,09
AT3	- 0,454	- 0,02
Sb19.3	0,186	- 0,391
APO	0,298	- 0,051
PV92	0,293	0,869

As populações ameríndias e europeias encontram-se separadas (Figura 8) dado o alto diferencial de frequência do AIM PV92 entre estes dois grupos étnicos (Shriver *et al.*, 2003). Isto se reflete no peso (0,869) deste *locus* na resolução do segundo componente principal (Tabela 15). A comunidade de BR encontra-se novamente agrupada com as populações africanas e a população urbana do HEM com as populações europeias.

O *locus* FY apresenta o peso mais importante na resolução do primeiro componente principal (Tabelas 13 e 15) em ambas as análises. Nas duas análises é importante notar também que os dois componentes principais explicaram mais do que 95% da variância total (Tabelas 12 e 14).

ESTIMATIVAS DE MISTURA ÉTNICA

A Tabela 16 apresenta a contribuição dos componentes Africano, Europeu e Ameríndio para as populações estudadas.

TABELA 16. Contribuição dos componentes africano, europeu e ameríndio obtidos a partir dos oito AIMS para as comunidades remanescentes de quilombo e populações urbanas analisadas.

Componentes	Remanescentes de Quilombo			Populações Urbanas	
	São Gonçalo	Barra	Valongo	Jequié	HEMOSC
Africano	0,681 ± 0,007	0,954 ± 0,009	0,681 ± 0,004	0,520 ± 0,003	0,072 ± 0,007
Europeu	0,216 ± 0,016		0,319 ± 0,004	0,306 ± 0,008	0,833 ± 0,017
Ameríndio	0,103 ± 0,011	0,046 ± 0,009		0,174 ± 0,005	0,095 ± 0,012

O modelo tri-híbrido foi inconsistente na determinação das estimativas de mistura nas comunidades de BR e VAL, apresentando inconsistência com o componente ameríndio. Portanto, este foi retirado da análise e foi admitido

um modelo de mistura a partir de duas populações parentais para estas comunidades.

A população do HEM apresentou preponderante contribuição européia, concordante com estimativas de contribuição para populações da região Sul do Brasil (Parra *et al.*, 2003). As contribuições dos componentes europeu em BR e africano no HEM não foram considerados porque o desvio padrão é maior do que as estimativas nos dois casos (Tabela 11).

DISCUSSÃO

FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E HETEROZIGOSE

Dos oito AIMs aqui analisados, que apresentam altos diferenciais de freqüência alélica (δ) quando são comparados africanos, europeus e ameríndios seis deles (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3, APO) apresentam freqüências semelhantes em ameríndios e populações européias, mas muito diferentes daquelas encontradas em populações africanas (Parra *et al.*, 1998). Os outros dois (PV92 e o alelo *CYP1A1*2C*) apresentam alta freqüência entre ameríndios, mas baixa nos outros dois grupos populacionais (Shriver *et al.*, 2003; Tabela 17). O alelo *CYP1A1*2C* é aqui definido como AIM, pois até agora havia sido estudado em apenas sete tribos indígenas Sul-americanas (Tabela 17).

No presente trabalho a freqüência deste marcador foi determinada em um grande número (297) de Ameríndios de quatro tribos indígenas da Amazônia Brasileira caracterizadas por uma baixa mistura (2 a 3%) com populações não-índigenas (Mohrenweiser *et al.*, 1979, Neel *et al.*, 1980). Além dos baixos valores de mistura, o estudo destas tribos é também relevante dada a posição geográfica central ocupada pelas mesmas no continente Sul-americano.

A média ponderada das freqüências aqui descritas (90,9%) é maior do que a das demais tribos (73,2%) relatadas na literatura (Tabela 17). As primeiras são provavelmente mais representativas, pois as tribos apresentam baixa mistura de acordo com marcadores clássicos (Mohrenweiser *et al.*,

1979, Neel *et al.*, 1980), do DNAmT, para o qual nenhum haplogrupo não indígena foi observado (Mendes-Junior, 2005), e a partir da análise de AIMS (Luizon *et al.*, 2007a).

Tabela 17. Frequências (%) do alelo CYP1A1*2C em populações mundiais.

População	2n	*2C	Referências
África ^a	228	1,3	Dandara <i>et al.</i> , 2002
Europa	924	2,8 - 5,8	Cascorbi <i>et al.</i> , 1996, Esteller <i>et al.</i> , 1997
Itália	242	6	Landi <i>et al.</i> , 2005
Ásia			
China	2454	24,8	Boyapati <i>et al.</i> , 2005
Sibéria	102	35	Duzhak <i>et al.</i> , 2000
América			
Achê	134	100	Gaspar <i>et al.</i> , 2002a
Baniwa	98	89,8	present study
Gavião	60	59	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Guarani	102	90,2	Gaspar <i>et al.</i> , 2002a
Kanamarí	68	92,6	presente estudo
Kashinawa	50	80	presente estudo
Mapuche	168	77	Muñoz <i>et al.</i> , 1998
Suruí	48	54	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Tikúna (4 aldeias)	378	92,1	presente estudo
Umariçú	100	94	presente estudo
Feijoal	98	95,9	presente estudo
Vendaval	90	82,2	presente estudo
Belém	90	95,6	presente estudo
Xavante	42	97	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Wai Wai	52	81	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Zoró	60	76	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Afro-brasileiros			
Porto Alegre	274	15,7	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b
Rio de Janeiro	128	11,7	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b
Salvador	60	15	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b
São Paulo	180	8,3	presente estudo
Valongo	104	0	presente estudo
Euro-brasileiros			
Porto Alegre	172	11,6	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b

Diante de tais resultados aqui observados e comparados àqueles de populações mundiais (Tabela 17) conclui-se que este marcador pode ser considerado um AIM, isto é, capaz de distinguir os Ameríndios dos outros grupos (Luizon *et al.*, 2007b).

Estes dois marcadores, capazes de diferenciar os indígenas dos grupos restantes, são particularmente importantes para o estudo da composição tri-híbrida da população brasileira que, como nos informam os dados históricos, foi constituída pela união de contingentes de colonizadores europeus (principalmente portugueses), escravos africanos por eles trazidos e indígenas autóctones (Ribeiro 1995).

Estas comunidades indígenas pequenas e isoladas são particularmente sensíveis ao efeito da deriva genética (Salzano, 2002). Embora os efeitos da deriva genética e/ou efeito do fundador sejam facilmente observáveis pela análise de distribuição de freqüências do alelo *CYP1A1*2C* (que variou de 54% em Surui até 100% em Aché; Tabela 17), ainda assim observa-se elevada freqüência média ponderada (78,3%) nos Ameríndios Sul-americanos, e elevado diferencial de freqüências em relação a europeus, africanos e asiáticos.

Como previamente mostrado para outros polimorfismos dos genes do citocromo P450 analisados nos Mapuche, estas diferenças podem ser interpretadas como uma consequência de deriva genética causada por um efeito do fundador no povoamento dos Sul-ameríndios, ou seleção natural causada por fatores da dieta ou ambientais (Muñoz *et al.*, 1998).

Em princípio, um remanescente de quilombo deve ter grande proporção de seus genes derivados de estoques africanos. Conseqüentemente, seriam esperadas freqüências alélicas mais próximas daquelas encontradas em populações do continente africano. De fato, a comunidade remanescente de quilombo de Valongo demonstrou ausência de contribuição ameríndia e a africana foi estimada em $97,33\% \pm 10,41$ por marcadores clássicos (Souza e Culpi, 2005). A baixa freqüência (1,3%) do alelo *CYP1A1*2C* em populações africanas (Dandara *et al.*, 2002) explicaria a sua ausência em VAL e sua baixa freqüência em BR (2,7%). Por outro lado, as altas freqüências em SG (20,3%) e JQ (10,2%) poderiam ser explicadas por uma participação mais intensa de ameríndios na formação destas populações, como indicado por marcadores clássicos, STRs autossômicos e ligados ao cromossomo Y (Sousa, 2001).

A freqüência do alelo *CYP1A1*2C* (8,3%) em uma amostra de indivíduos não aparentados nascidos no Estado de São Paulo (dados não publicados) é menor do que as observadas em outras populações urbanas brasileiras (Gaspar *et al.*, 2002). Por outro lado, é maior do que a freqüência africana e européia, e concordante com a contribuição ameríndia estimada (7%) para a mesma a partir de STRs autossômicos (Ferreira *et al.*, 2006).

Considerando-se as três comunidades remanescentes de quilombo (SG, BR, VAL), as duas populações urbanas (JQ e HEMOSC), e as sete aldeias ameríndias (considerando as quatro aldeias *Tikúna* independentemente) par a par, foi possível realizar um total de 66 comparações das freqüências alélicas e das genóticas pelo teste exato de Fisher (Tabela 6, Resultados,

pág.63). Destas, 63 comparações resultaram em desvios significativos no caso das freqüências gênicas e 62 no caso das freqüências genotípicas ($P < 0,05$). Entretanto, 55 no primeiro caso e 52 no segundo exibiram $P < 0,0007$, limite recalculado após a correção de Bonferroni ($0,05/66$), e foram os únicos considerados desvios realmente significativos.

Considerando a já citada ausência de mistura étnica nas amostras Ameríndias aqui analisadas, as diferenças entre as tribos indígenas devem ser decorrentes da deriva genética. Por outro lado, as diferenças entre as comunidades não indígenas, tendo em vista a conhecida história recente de sua formação, seriam mais plausivelmente atribuídas ao fluxo gênico.

Quanto menor a população e quanto menos imigrantes receber, maior é a tendência desta população à homozigose de seus locos em decorrência basicamente de dois processos: a imigração – ou fluxo gênico – e o endocruzamento que, embora de natureza diferente, produzem o mesmo resultado, isto é, diminuem o número esperado de heterozigotos.

Os aldeias ameríndias apresentaram os menores valores de H_s dentre as populações analisadas (Tabela 6). Estes poderiam ser decorrentes do pequeno tamanho populacional aliado ao isolamento característico de certas tribos, características que indicam que a deriva genética seja um fator preponderante dentre os indígenas da Amazônia (Tarazona-Santos *et al.*, 2001).

Os menores valores de diversidade genética (H_s) observados em BR e VAL ($0,308 \pm 0,056$ e $0,317 \pm 0,067$, respectivamente) dentre as populações remanescentes de quilombo analisadas são, portanto, concordantes com o

isolamento geográfico e cultural destas comunidades (Abé-Sandes, 2002; Souza *et al.*, 1992).

A menor diversidade haplotípica do cromossomo Y observada em BR ($0,394 \pm 0,119$) na comparação com populações Afro-derivadas de Salvador, Ribeirão Preto e São Gonçalo também foi explicada pelo isolamento desta comunidade, e conseqüente perda de variabilidade por deriva genética (Abé-Sandes *et al.*, 2004). A análise de marcadores clássicos em VAL também exhibe baixo valor de H_s ($0,242 \pm 0,063$; Souza e Culpi, 2005), tais como os observados nas populações isoladas Afro-derivadas de Cametá ($0,192 \pm 0,049$) e Paredão ($0,262 \pm 0,061$; Bortolini *et al.*, 1992).

A única comunidade afro-derivada Norte-americana que se assemelha a um remanescente é representada pelos Gullah, localizada na Carolina do Sul (EUA; Parra *et al.*, 2001), que também apresentam baixa diversidade ($0,210 \pm 0,074$), a menor dentre as populações afro-derivadas norte-americanas investigadas por Parra *et al.*, (2001). Este baixo valor de H_s está de acordo com a baixa contribuição européia, e com evidências históricas, culturais e antropológicas que indicam o maior isolamento dos Gullah (Parra *et al.*, 2001).

No mesmo sentido, o alto valor de diversidade observado para SG ($0,388 \pm 0,036$; Tabela 7) pode ser explicado pela mistura com populações não africanas, tal como sugerido pela análise de haplogrupos do cromossomo Y nesta mesma população (Abé-Sandes *et al.*, 2004); baixa freqüência do haplogrupo E-M2, característico de populações africanas do Sub-Saara (Flores *et al.*, 2001) e pela alta freqüência do haplogrupo P-92R7,

freqüentemente observado em Italianos (44%; Previderè *et al.*, 2000), Portugueses (52%) e Espanhóis (54%), mas não detectado no Sub-Saara Africano (Flores *et al.*, 2001).

Altos valores de H_S (0,384 a 0,500) foram observados também em populações remanescentes de quilombo do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, analisadas por quatro inserções *Alu* (Cotrim *et al.*, 2004). Estes altos índices foram explicados não somente pela mistura com outros grupos étnicos não africanos, mas também pela origem Africana diversa dos escravos trazidos para o Brasil (Cotrim *et al.*, 2004).

A alta diversidade observada em JQ (0,427) foi superior a todos os valores observados nas populações analisadas (Tabela 6) e nas populações mundiais (Tabela 8), para os oito AIMs. Este alto valor de H_S também pode ser explicado pela mistura étnica, pois sua população também é considerada tri-híbrida, de acordo com dados de sua história demográfica (Sousa, 2001). Nesta mesma população, a diversidade estimada a partir de marcadores clássicos (0,270), STRs autossômicos (0,767) e STRs ligados ao cromossomo Y (0,587) foi equivalente ao observado para populações africanas (Sousa, 2001). Por sua vez, a H_S observada no HEM (0,303) é semelhante aos valores observados em populações européias e euro-americanas (Tabela 8).

EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Considerando-se as aldeias da tribo *Tikúna* isoladamente e as demais populações, foi possível realizar um total de 72 comparações entre as freqüências genotípicas observadas e esperadas (Tabela 8, Resultados, pág.

65), das quais 13 resultaram em desvios significativos ($P < 0,05$). Destes, quatro (BR/APO, JQ/RB e AT3 e HEM/AT3; Tabela 8) exibiram $P < 0,0007$, limite recalculado após a correção de Bonferroni ($0,05/72$), e foram os únicos considerados desvios realmente significativos.

Devido ao isolamento e pequeno tamanho populacional da comunidade remanescente de quilombo de BR, o único desvio observado (*locus* APO) poderia ser explicado por casamentos não-aleatórios. A migração também poderia explicar este desvio, visto que migrações temporárias masculinas, às vezes definitivas, em busca de trabalho são características nesta comunidade (Abé-Sandes, 2002).

Os desvios observados nas amostras urbanas de JQ e HEM, por outro lado, poderiam ser explicados por fluxo gênico, como indicado pela história demográfica destas populações. Desvios também foram evidenciados pela análise de marcadores clássicos (*loci* HP, Haptoglobina) e STRs autossômicos (*loci* vWF2 e vWA) em JQ (Sousa, 2001).

Os outros nove casos em que o desvio foi significativo apenas sem a correção de Bonferroni devem ser, por força do teste, considerados como variação casual.

Entretanto, a correção de Bonferroni é considerada uma medida conservadora, ou seja, modifica o limite de α para valores muito baixos, o que aumentaria a possibilidade de erros do tipo β , isto é, aumentaria a probabilidade de se aceitar o desvio como sendo casual quando deveria ser considerado significativo.

Sendo assim, apesar provavelmente serem casuais, esses desvios ‘intermediários’ exigem alguma discussão adicional.

Os indígenas exibiram apenas dois desvios o que aparentemente é muito menor do que o número de desvios encontrados dentre as amostras populacionais urbanas (JQ e HEMOSC) e dos remanescentes de quilombo (SG, BR e VAL). Chama a atenção o fato de que, entre altamente significativos e moderadamente significativos, observam-se três desvios em SG e três outros em JQ.

Tais populações apresentam uma história demográfica de clara miscigenação recente (Sousa, 2001), enquanto que os ameríndios aqui estudados foram selecionados de amostras praticamente sem contato com populações não indígenas (Neel *et al.*, 1980).

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE *LOCI*

O fluxo gênico entre populações geneticamente distintas gera desequilíbrio de ligação (*admixture linkage disequilibrium*, ALD) entre os *loci* (ligados e não ligados) que possuem frequências alélicas diferentes (Hartl & Clark, 2007). Associações entre *loci* não ligados sugerem a presença de estrutura genética.

Considerando-se as aldeias agrupadas em suas respectivas tribos, foi possível testar a associação em um total de 28 pares de *loci* (Resultados, pág. 66), das quais 13 resultaram em desvios significativos ($P < 0,05$). Destes, apenas um exibiu $P < 0,0018$, limite recalculado após a correção de Bonferroni, e foi o único considerado realmente significativo.

Esta única associação significativa foi observada entre os *loci* FY e APO ($p=0,000$) em BR, e sugere a presença de estrutura genética nesta comunidade.

Como salientado previamente, sendo a correção de Bonferroni considerada uma medida conservadora, discutiremos aqui as possíveis explicações para as associações significativas antes de admitida esta correção.

O desequilíbrio de ligação entre os *loci* FY e AT3, separados por 22cM no cromossomo 1 e considerados fisicamente ligados, assim como entre os outros AIMs não ligados, é característico de ALD. A presença de ALD entre estes *loci* em BR poderia ser explicada por um evento de mistura na fundação desta população, similar ao modelo de isolamento híbrido descrito por Pfaff *et al.* (2001). Por outro lado, a manutenção das associações significativas em SG e JQ poderia ser explicada por eventos adicionais de fluxo gênico, em um modelo semelhante ao de fluxo gênico contínuo (Pfaff *et al.*, 2001). A possibilidade de ocorrência destes modelos é reforçada pela história demográfica e por estimativas de mistura nestas populações (Sousa, 2001; Abé-Sandes, 2002; Abé-Sandes *et al.*, 2004).

ESTATÍSTICA F E DIVERSIDADE INTER-POPULACIONAL

Coeficiente de endogamia (F_{IS})

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) significativo para VAL (Tabela 9) era esperado dado o seu isolamento geográfico e cultural em relação às

comunidades vizinhas, como também pelo alto coeficiente de endogamia ($F=0,081$) calculado a partir de dados demográficos (Souza e Culpi, 2005).

Apesar de possuir uma formação tri-híbrida, a comunidade de SG é caracterizada como um remanescente de quilombo pelo seu grau de isolamento geográfico e cultural, com baixo tamanho efetivo e populacional (Abé-Sandes, 2002). Semelhantemente a VAL, SG também apresenta um coeficiente de endogamia significativo ($p<0,01$; Tabela 9) que também poderia ser acarretado por seu isolamento e, conseqüentemente, pela endogamia.

A população urbana de JQ também apresentou F_{IS} significativo. Entretanto, apresenta história demográfica de mistura étnica característica de uma população exogâmica. Marcadores clássicos, STRs autossômicos e Y-STRs (Sousa, 2001) e os AIMs analisados neste estudo indicam que esta população é tri-híbrida (Tabela 16 e, portanto, tal parâmetro seria provavelmente decorrente da sub-estrutura populacional e não de endogamia.

O valor significativo de F_{IS} (Tabela 9) no caso dos Ameríndios seria mais provavelmente influenciado pelo pequeno tamanho amostral e conseqüente endogamia destas populações, principalmente quando se considera a comprovada e já citada ausência de mistura com populações não indígenas (Neel *et al.*, 1980).

Diversidade inter-populacional (F_{ST})

A maioria das populações são constituídas por subpopulações, dentro das quais ocorre geralmente a reprodução. Tal agrupamento é denominado estrutura populacional ou subdivisão populacional (Hartl & Clark, 2007).

A diferenciação entre as três comunidades remanescentes e as duas urbanas medida pelos valores do parâmetro F_{ST} são concordantes com as estimativas de diferenciação gênica e genotípica significativas encontradas pelas comparações par a par entre todas estas populações (Tabela 6).

O cálculo do F_{ST} exige freqüências genotípicas, que não estão disponíveis na literatura. Para tanto, os genótipos de indivíduos Africanos (Nigerianos) e Europeus (Espanhóis e Alemães) nos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Mark David Shriver, Professor do Departamento de Antropologia da Universidade da Pennsylvania (Shriver, comunicação pessoal). Duas amostras aleatórias de 55 indivíduos para cada um daqueles grupos étnicos foram selecionadas com o uso do programa Excel (Material e Métodos, pág. 54). Estas mesmas amostras aleatórias foram utilizadas na análise destas duas populações parentais com o software *Structure*.

Comparadas às populações parentais (15 comparações; Tabela 11), as três comunidades de remanescentes de quilombo e as duas urbanas apresentaram valores de F_{ST} significativamente diferentes, exceto na comparação de Africanos vs. Barra e Europeus vs. HEMOSC. A comunidade de Barra e a população urbana do HEMOSC compartilham uma grande proporção de alelos característicos de Africanos e Europeus, respectivamente.

ESTRUTURA POPULACIONAL

O software *Structure* utiliza um método de agrupamento, baseado no modelo desenvolvido por Pritchard *et al.* (2000), para a inferência de estrutura populacional utilizando dados genotípicos de marcadores não ligados. Por estrutura populacional entende-se a presença de subpopulações de indivíduos geneticamente similares que diferem entre as mesmas.

O diagrama (Figura 6A) representa cada indivíduo das populações analisadas como uma barra. Esta barra tem três partes correspondentes às proporções africana, europeia e ameríndia representadas pelas cores vermelha, verde e azul, respectivamente.

Três *clusters* (Figura 6B) foram designados a partir das frequências genotípicas das populações analisadas na Figura 6A. Pode-se observar que grande proporção (0,995) da amostra de africanos está representada no *cluster* 1, assim como a amostra de europeus (0,678) está representada no *cluster* 2 e a amostra ameríndia (0,807) no *cluster* 3. Entretanto, é importante salientar que todos estes *clusters*, principalmente os de número 2 e 3, possuem contribuição dos outros dois grupos reconhecidos como parentais. No *cluster* 2 pode-se observar uma proporção (0,140) que refere-se ao componente ameríndio e no *cluster* 3 uma proporção (0,230) que refere-se ao componente europeu.

Os *clusters* 2 e 3 têm informação ‘sobreposta’, isto é, cada um deles apresenta componentes característicos do outro o que se caracteriza, no gráfico (Figura 6A) por barras isoladas azuis que “invadem” a área verde e

por barras verdes que “invadem” a área azul, nas regiões correspondentes às populações européia e ameríndia, respectivamente. Um maior número de AIMs informativos na separação destes dois *clusters* é necessária para que as proporções dos três *clusters* determinadas para cada população (Figura 6B) possa ser interpretada como contribuição dos componentes parentais para as mesmas.

A comunidade de BR e a população de HEM apresentam uma maior homogeneidade em comparação com as demais populações, o que está de acordo com as estimativas de mistura (Tabela 16).

A comunidade de SG e a população urbana de JQ apresentam níveis de estrutura populacional elevados, isto é, sub-populações de indivíduos geneticamente similares, como salientado pelas barras (Figura 6A) e círculos (Figuras 7A e B), que representam seus indivíduos.

ANÁLISES DE COMPONENTE PRINCIPAL

Os componentes principais são procedimentos utilizados na simplificação de dados multivariados com uma perda mínima de informação (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). As populações do presente trabalho foram submetidas a esta análise em conjunto com populações mundiais com o intuito de verificar eventual agrupamento por similaridade das frequências dos alelos examinados. O maior número de populações disponíveis na literatura é obtido considerando-se apenas seis (FY, RB, LPL, AT3, Sb19.3 e APO) dos *loci* aqui descritos. A análise de componente principal de tais dados está reproduzida na Figura 8.

Os *loci* CYP1A1 e PV92 diferenciam ameríndios dos outros dois grupos, africanos e europeus, mas apenas deste último encontram-se na literatura relatos de sua frequência em número significativo de populações. A Figura 9 reproduz a análise componente principal acrescentando-se o *locus* PV92, mas diminuindo-se o número de amostras populacionais.

Em ambas as análises de componente principal (Figuras 8 e 9) as três comunidades remanescentes de quilombo tendem a agrupar-se próximas às populações africanas e afro-americanas, em posição intermediária entre estas e as amostras urbanas brasileiras. Seguindo o mesmo sentido, as amostras européias se agrupam em posição mais distante. As amostras ameríndias se agrupam isoladamente em ambas as situações.

Este posicionamento reflete as diferentes contribuições européia e ameríndia (Tabela 16) obtidas a partir dos oito AIMS analisados, inclusive a população urbana do Estado de SC (HEM) posicionou-se muito próxima às amostras européias e euro-derivadas, como seria esperado por sua a preponderante contribuição do componente europeu ($0,833 \pm 0,017$) nesta amostra.

A contribuição européia estimada a partir dos AIMS em populações Afro-derivadas dos EUA variou de 3,5% nos Gullah (Parra *et al.*, 2001) a 22,5% em New Orleans (Parra *et al.*, 1998). A contribuição ameríndia na formação destas comunidades foi negligenciada. Entretanto, estas populações Afro-derivadas se agruparam na análise de componente principal (Figura 8) muito próximas às amostras africanas e muito distantes das ameríndias, confirmando tal 'ausência'.

ESTIMATIVAS DE MISTURA ÉTNICA

Os resultados mostraram que SG e JQ são amostras tri-híbridas, o que está de acordo com estimativas prévias obtidas a partir de marcadores clássicos, STRs autosômicos e ligados ao cromossomo Y (Sousa, 2001) para estas mesmas amostras (Tabela 18).

TABELA 18. Comparação das contribuições africana, europeia e ameríndias obtidas a partir dos oito AIMS com marcadores previamente analisados nas comunidades de São Gonçalo e Valongo e na população urbana de Jequié.

Componentes	Remanescentes de Quilombo			Populações Urbanas	
	São Gonçalo	Barra	Valongo	Jequié	HEMOSC
Africano	0,681 ± 0,007	0,954 ± 0,009	0,681 ± 0,004	0,520 ± 0,003	0,072 ± 0,007
(1)	0,540 ± 0,016			0,344 ± 0,153	
(2)			0,977 ± 0,104		
Europeu	0,216 ± 0,016		0,319 ± 0,004	0,306 ± 0,008	0,833 ± 0,017
(1)	0,317 ± 0,296			0,510 ± 2,86	
(2)					
Ameríndio	0,103 ± 0,011	0,046 ± 0,009		0,174 ± 0,005	0,095 ± 0,012
(1)	0,144 ± 0,209			0,145 ± 0,202	
(2)			0,026 ± 0,104		

(1) Marcadores clássicos, STRs autossômicos e Y-STRs (Sousa 2001). (2) Marcadores clássicos (Souza e Culpi 2005).

Com exceção de VAL, a partir dos dados baseados em AIMS, a contribuição africana foi estimada em valores maiores do que aqueles obtidos a partir dos marcadores clássicos (Souza e Culpi, 2005; Tabela 18).

A preponderante contribuição europeia na população urbana do HEM está de acordo com outras estimativas obtidas para populações da região Sul do Brasil a partir dos AIMS (Parra *et al.*, 2003). A contribuição africana na amostra do HEMOSC (7,2%) é similar à estimativa observada em uma

amostra Euro-derivada formada por indivíduos controles saudáveis do RS (6,5%; Zembrzuski *et al.*, 2006), também obtida pelo método de identidade gênica (Chakraborty, 1985).

Em VAL as estimativas de mistura não foram consistentes com o modelo tri-híbrido, sugerindo ausência do componente ameríndio, o que refletiria a história demográfica desta comunidade, segundo a qual ela teria sido fundada por sete escravos fugidos e alforriados e um homem branco (Souza e Culpi, 1992; Souza e Culpi, 2005).

Ressalte-se que a estimativa do componente africano obtida a partir dos AIMs foi menor do que a obtida a partir dos marcadores clássicos (Tabela 18). Isto poderia ser considerado como evidência da maior eficiência destes marcadores na quantificação do componente africano, uma vez que o aumento das estimativas não foi generalizado e, portanto, provavelmente não viciado. Esta idéia é reforçada pelo fato de que, em comparação com BR, o outro remanescente, este está localizado em área geográfica em que a população envolvente tem grande componente europeu e seria de se esperar uma pressão imigratória deste componente para dentro do isolado. O componente europeu, portanto, seria decorrente não apenas daquele europeu fundador inicial juntamente com sete outros indivíduos negros de que nos conta a História (Souza e Culpi, 1992). Conclui-se que os AIMs seriam mais eficientes para o cálculo da proporção relativa dos diferentes componentes formadores destas populações, pois conduziriam a estimativas mais realistas.

CONCLUSÕES

O presente trabalho é o primeiro relato de frequências de AIMs em comunidades remanescentes de quilombo Brasileiras.

As frequências alélicas aqui observadas e comparadas com populações mundiais atestam que o alelo *CYP1A1*2C* é um excelente AIM para distinguir Ameríndios de europeus e africanos.

Dos 11 casos de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em um total de 96 testes, apenas quatro permaneceram significativos após a correção de Bonferroni. Portanto, não houve número excessivo de desequilíbrios. Apesar disso, todos os casos de desequilíbrio foram caracterizados pelo déficit de heterozigotos que, por sua vez, poderia ser ocasionado por consangüinidade ou heterogeneidade populacional (efeito de Wahlund).

A diferenciação gênica e genotípica apenas confirmou dados históricos de formação das populações aqui examinadas. As aldeias e tribos mostraram homogeneidade, enquanto que os três quilombos com histórias de formação muito diferentes entre si, bem como as duas comunidades urbanas muito distantes geográfica e demograficamente mostram grande diferenciação.

O grau relativo de isolamento dos ameríndios em relação às outras comunidades aqui examinadas justifica os menores valores de heterozigose observados entre eles.

Em 28 comparações para a par entre *loci*, 13 foram significativas, das quais apenas uma permaneceu assim, após a correção de Bonferroni. Se a mistura recente leva a desequilíbrios de ligação e, sabendo da história de formação recente destas populações, seria esperado um número significativo de desequilíbrios. Entretanto, este achado indica que ou a mistura não foi tão intensa ou este teste não tem poder suficiente para ser aplicado às condições aqui encontradas.

Os valores de F_{ST} confirmaram os resultados do teste exato que indicou diferenciação gênica e genotípica.

Nas análises de componente principal os AIMS agruparam todas as amostras estudadas de acordo com o que seria esperado pelos dados histórico-demográficos. Chama a atenção, contudo, que em ambas as análises (excluindo ou incluindo o loco PV92) o loco FY foi a variável que maior peso (*loading*) demonstrou sobre o primeiro componente principal. Com relação ao segundo componente principal, na primeira análise a variável de maior peso foi o loco Sb19.3, porém na segunda análise o loco PV92 demonstrou o maior peso.

Este método demonstrou-se particularmente adequado, pois, em ambas as análises, os dois componentes principais explicaram mais do que 95% da variância total.

A partir das estimativas de mistura étnica aqui observadas conclui-se que os AIMS seriam mais eficientes para o cálculo da proporção relativa dos diferentes componentes formadores destas populações, pois conduziriam a estimativas mais realistas.

Dentre as comunidades remanescentes de quilombo, Barra apresenta baixa heterozigose e não apresentou diferenciação (F_{ST}) com a população africana. Concluimos que esta comunidade foi preponderantemente formada por indivíduos de origem africana (95,4% de componente africano).

A comunidade de Valongo apresentou um dos maiores coeficientes de endogamia relatados na literatura. Esta população apresentou baixa heterozigose e uma alta contribuição europeia em comparação com estimativas anteriormente obtidas por marcadores clássicos.

A comunidade de São Gonçalo apresentou F_{IS} significativo, alta heterozigose e estimativas tri-híbridas de mistura.

REFERÊNCIAS

- ABÉ-SANDES, K. **Diversidade genética de afro-brasileiros: DNA mitocondrial e cromossomo Y**. 104 p. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- ABÉ-SANDES, K; SILVA JR., W.A.; ZAGO, M.A. Heterogeneity of the Y Chromosome in Afro-Brazilian Populations. **Human Biology**. 76(1):77-86, 2004.
- ALVES-SILVA J.; DA SILVA SANTOS, M.; GUIMARAES, P.E.; FERREIRA, A.C.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.; PRADO, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**. 67(2):444-61, 2000.
- ARPINI-SAMPAIO, Z.; COSTA, M. C.; MELO, A. A.; CARVALHO, M. F.; DEUS, M. S.; SIMÕES AL. Genetic polymorphisms and ethnic admixture in African-derived black communities of northeastern Brazil. **Hum Biol**. 71: 69-85, 1999.
- BEDOYA, G.; MONTOYA, P.; GARCIA, J.; SOTO, I.; BOURGEOIS, S.; CARVAJAL, L.; LABUDA, D., ALVAREZ, V.; OSPINA, J.; HEDRICK, P.W.; RUIZ-LINARES, A. Admixture dynamics in Hispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. **Proc Natl Acad Sci USA**. 103(19):7234-9, 2006.
- BONILLA, C.; GUTIERREZ, G.; PARRA, E. J.; KLINE, C.; SHRIVER, M. D. Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero, Mexico. **Am J Phys Anthropol** 128:861-869, 2005.
- BONILLA, C.; PARRA, E.J.; DIOS, S.; MARSHALL, J.A.; HAMMAN, R.F.; FERREL, R.E.; HOGGART, C.L.; McKEIGUE, P.M.; SHRIVER, M.D. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. **Ann Hum Genet**. 68: 139-153, 2004.
- BORTOLINI, M. C.; SILVA JR, W. A.; CASTRO DE GUERRA, D.; REMONATTO, G.; MIRANDOLA, R.; HUTZ, M. H.; WEIMER, T. A.; SILVA, M. C. B. O.; ZAGO, M. A.; SALZANO, F. M. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. **Am J Hum Biol**, 11: 551-563, 1999.
- BORTOLINI, M. C.; SILVA JR, W.A.; WEIMER, T. A.; ZAGO, M. A.; CASTRO DE GUERRA, D.; SCHNEIDER, M. P.; LAYRISSE, Z.; CASTELLANO, H. M.; SALZANO, F. M. Protein and hypervariable tandem repeat diversity in eight african-derived South American populations: inferred relationship do not coincide. **Hum Biol**, 70: 443-461, 1998
- BORTOLINI, M. C.; WEIMER, T. A.; SALZANO, F. M.; CALLEGARI-JACQUES; SCHNEIDER, H.; LAYRISSE, Z.; BONATTO, S. L. Evolutionary relationships between Black South American and African Populations. **Hum Biol**, 67: 547-559, 1995.
- BORTOLINI, M. C; WEIMER, T. A.; FRANCO, M. H. L. P.; SALZANO, F. M.; LAYRISSE, Z.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; HARADA, M. L. Genetic studies in three South American Blacks populations. **Gene Geogr**, 6: 1-16, 1992.

- BOYAPATI, S.M; SHU, X. O.; GAO, Y. T.; CAI, Q.; JIN, F.; ZHENG, W.; Polymorphisms in CYP1A1 and breast carcinoma risk in a population-based case-control study of Chinese women. **Cancer**. 2005 Jun 1;103(11):2228-35, 2005.
- CALMON, P. História do Brasil - Volume II. Editora José Olímpio, Rio de Janeiro-RJ, 1959.
- CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Hum Genet** 68:281-286, 2001.
- CASCORBI, I.; BROCKMOLLER, J.; ROOTS, I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. **Cancer Res** 56(21):4965-9, 1996.
- CAVALLI-SFORZA, L. L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. **History and geography of human genes**. Princeton: Princeton University Press, 1994.
- CHAKRABORTY, R.; WEISS, K. M. Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between *loci*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 85:9119-9123, 1988.
- CHAKRABORTY, R. Gene identity in racial hybrids and estimation of admixture rates. In Ahuja YR, Neel JV, editors. **Genetic differentiation in human and others animal populations**. **Indian Anthropological Association**. 1985. p, 171-180.
- CHOUDHRY, S.; COYLE, N. E.; TANG, H.; SALARI, K.; LIND, D.; CLARK, S. L.; TSAI, H. J.; NAQ, VI, M.; PHONG, A.; UNG, N.; MATAALLANA, H.; AVILA, P. C.; CASAL, J.; TORRES, A.; NAZARIO, S.; CASTRO, R.; BATTLE, N. C.; PEREZ-STABLE, E. J.; KWOK, P. Y.; SHEPPARD, D.; SHRIVER, M. D.; RODRIGUEZ-CINTRON, W.; RISCH, N.; ZIV, E.; BURCHARD, E. G. Genetics of Asthma in Latino Americans GALA Study. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. **Hum Genet** 118:652-664, 2006.
- COLLINS-SCHRAMM, H. E.; CHIMA, B.; MORII, T.; WAH, K.; FIGUEROA, Y.; CRISWELL, L. A.; HANSON, R. L.; KNOWLER, W. C.; SILVA, G.; BELMONT, J. W.; SELDIN, M. F. Mexican American ancestry-informative markers: Examination of population structure and marker characteristics in European Americans, Mexican Americans, Amerindians and Asians. **Hum Genet** 114:263-271, 2004.
- COLLINS-SCHRAMM, H. E.; PHILLIPS, C. M.; OPERARIO, D. J.; LEE, J. S.; WEBER, J. L.; HANSON, R. L.; KNOWLER, W. C.; COOPER, R.; LI, H.; SELDIN, M. F. Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture lineage disequilibrium. **Am J Hum Genet**, 70:737-750, 2002.
- COTRIM, N. H.; AURICCHIO, M. T.; VICENTE, J. P.; OTTO, P. A.; MINGRONI-NETTO, R.C. Polymorphic Alu insertions in six Brazilian African-derived populations. **Am J Hum Biol**. May-Jun;16(3):264-77, 2004.
- CURTIN, P.D. **The Atlantic Slave Trade: A Census**. University of Wisconsin Press, Madison, 1969.
- DANDARA, C.; SAYI, J.; MASIMIREMBWA, C.M.; MAGIMBA, A.; KAAAYA, S.; DE SOMMERS, K.; SNYMAN, JR.; HASLER J.A. Genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) and glutathione transferases (M1, T1 and P1) among Africans. **Clin Chem Lab Med** 40(9):952-7, 2002.
- DUZHAK, T.; MITROFANOV, D.; OSTASHEVSKII, V.; GUTKINA, N.; CHASOVNIKOVA, O.; POSUKH, O.; OSIPOVA, L.; LYAKHOVICH, V. V. Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1, GSTM1 and p53 genes in a unique Siberian population of Tundra Nentsi. **Pharmacogenetics** 10(6):531-537, 2000.

- FERREIRA, L. B.; MENDES-JUNIOR, C. T.; WIEZEL, C. E.; LUIZON, M. R.; SIMOES, A. L. Genomic ancestry of a sample population from the state of Sao Paulo, Brazil. **Am J Hum Biol.** 18(5):702-5, 2006.
- FLORES, C.; MACA-MEYER, N.; PEREZ, J. A.; HERNANDEZ, M.; CABRERA, V. M. Y-chromosome differentiation in Northwest Africa. **Hum Biol.** Aug;73(4):513-24, 2001.
- FUNDAÇÃO CULTURAL PALMARES (<http://www.palmares.gov.br>). Acesso em fevereiro de 2002.
- GASPAR P.; KVIKTO, K.; PARADÓPOLIS, L. G.; HUTZ, M. H.; WEIMER, T. A. High frequency of *CYP1A1*2C* allele in Brazilian populations. **Hum Biol.** 74(2): 235-242, 2002.
- GOUDET, J. *FSTAT* (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **J Hered.** 86:485-486, 1995.
- GOULART M. A escravidão africana no Brasil: Das origens à extinção do tráfico. Editora Alfa-Omega, São Paulo-SP, 1975.
- GUERREIRO, J. F.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C.; SANTOS, E. J. M.; VALLINOTO, A. C. R.; CAYRES-VALLINOTO, I. M. V.; AGUIAR, G. F. S.; SANTOS, S. E. B. Genetical-demographic data from two Amazonian populations composed of descendants of african slaves: Pacoval and Curiau. **Genet Mol Biol.** 22: 163-167, 1999.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, 48(2):361-372, 1992.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics.** 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, 2007.
- HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: ERLICH, H. A. (Ed.). **PCR technology: principles an applications for DNA amplification.** New York, NY: Stockton Press, 1989. p. 31-38.
- HOGGART, C. J.; PARRA, E. J.; SHRIVER, M. D.; BONILLA, C.; KITTLES, R. A.; CLAYTON, D. G.; MCKEIGUE, P. M. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. **Am J Hum Genet.** 72(6):1492-1504, 2003.
- IBGE – CENSO 2000.** SITE DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível na Internet via WWW. URL: www.ibge.gov.br/. Acesso em maio de 2007.
- KVIKTO, K.; NUNES, J.C.; WEIMER, T.A.; SALZANO, F.M.; HUTZ, M.H. Cytochrome P4501A1 polymorphisms in South American Indians. **Hum Biol** 72(6):1039-43, 2000.
- LANDI, M.T.; BERGEN, A.W.; BACCARELLI, A.; PATTERSON, D.G. JR, GRASSMAN, J.; TERMINASSIAN, M.; MOCARELLI, P.; CAPORASO, N.; MASTEN, S.A.; PESATORI, A.C.; PITTMAN, G.S.; BELL, D.A. CYP1A1 and CYP1B1 genotypes, haplotypes, and TCDD-induced gene expression in subjects from Seveso, Italy. **Toxicology** 207(2):191-202, 2005.
- LEBOUTE, A. P. M.; CARVALHO, M. W. P.; SIMÕES, A. L. Absence of the Δ ccr5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. **Hum Genet.** 105:442-443, 1999.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: software for the analysis of discrete genetic data. Version 1.0. 1997
- LIU, Y.; SAHA, N.; LOW, P. S.; TAY, J. S. Linkage disequilibrium between two *loci* (5' untranslated exon 1 and intron 5-*Ddel*) of the antithrombin III gene in three ethnic groups in Singapore. **Hum Hered.** 45:192-198, 1995.

- LUIZON, M. R.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DE OLIVEIRA, S. F.; SIMOES, A. L. Ancestry informative markers in ameridians from Brazilian Amazon. **Am J Hum Biol**, 2007a (aceito para publicação)
- LUIZON, M. R.; SOUZA, I. R. De; SIMOES, A. L. CYP1A1*2C as an Ancestry Informative Marker (AIM) to detect Amerindian contribution in Brazilian populations. 2007b (no prelo).
- MARRERO, A.R.; DAS NEVES, LEITE F.P.; DE ALMEIDA, CARVALHO, B; PERES, L.M.; KOMMERS, T.C., DA CRUZ, I.M.; SALZANO, F.M.; RUIZ-LINARES, A.; DA SILVA Junior, WA.; BORTOLINI, M.C.; Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Am J Hum Biol**, 17(4):496-506, 2005.
- MARTINEZ-MARIGNAC, V. L.; VALLADARES, A.; CAMERON, E.; CHAN, A.; PERERA, A.; GLOBUS-GOLDBERG, R.; WACHER, N.; KUMATE, J.; MCKEIGUE, P.; O'DONNELL, D.; SHRIVER, M. D.; CRUZ, M.; PARRA, E. J. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. **Hum Genet**. Feb;120(6):807-19, 2007.
- MATTOSO, K. M. Q. **Ser escravo no Brasil**. São Paulo: Brasiliense, 1982.
- MENDES-JUNIOR, CD. T. **Dna mitocondrial na Amazônia brasileira: estrutura genética regional e inferências continentais**. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005
- MENDES Jr., C. T. **Frequências alélicas de polimorfismos de DNA do tipo STR em indígenas da Amazônia brasileira**. 2001. 160 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- MESSEDER M.L.L.; MARTINS M.A.M. **Arraiais de Rio de Contas: Uma comunidade de Cor**. Caderno CRH Supl 36-49, 1991.
- MESTRINER, M. A.; SIMÕES, A. L.; SALZANO, F. M. New studies on the esterase D polymorphism in South American Indians. **Am J Phys Anthropol**, 52(1):95-101, 1980.
- MILJKOVIC-GACIC, I.; FERRELL, R. E.; PATRICK, A. L.; KAMMERER, C. M.; BUNKER, C. H. Estimates of African, European and Native American ancestry in Afro-Caribbean men on the island of Tobago. **Hum Hered** 60:129-133, 2005.
- MOHRENWEISER, H.; NEEL, J. V.; MESTRINER, M. A.; SALZANO, F. M.; MIGLIAZZA, E.; SIMÕES, A. L.; YOSHIHARA, C. M. Electrophoretic variants in three Amerindian tribes: the *Baniwa*, Kanamari, and Central Pano of western Brazil. **Am J Phys Anthropol**, 50(2):237-46, 1979.
- MOLLISON, P. L.. **Blood transfusion in clinical medicine**. 5.ed. Oxford: Blackwell, 1972.
- MOURA, C. **Dicionário da Escravidão Negra no Brasil**/Clóvis Moura; assessora de pesquisa Soraya Silva Moura. São Paulo: Ed Universidade de São Paulo, 2004.
- MUÑOZ, S.; VOLLRATH, V.; VALLEJOS, M. P.; MIQUEL, J. F.; COVARRUBIAS. C.; RADDATZ, A.; CHIANALE, J. Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. **Pharmacogenetics** 8(4):343-51, 1998
- NEEL, J. V.; GERSHOWITZ, H.; MOHRENWEISER, H. W.; AMOS, B.; KOSTYU, D. D.; SALZANO, F. M.; MESTRINER, M. A.; LAWRENCE, D.; SIMOES, A. L.; SMOUSE, P. E.; OLIVER, W. J.; SPIELMAN, R. S.; NEEL Jr., J. V. Genetic studies on the Ticuna, an enigmatic tribe of Central Amazonas. **Ann Hum Genet**, 44(Pt 1):37-54, 1980.

- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 512p, 1987.
- OLIVEIRA, S. F. **Inserções Alu em populações indígenas da Amazônia Brasileira**. 135 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- OTA, T. **DISPAN**: genetic distance and phylogenetic analysis. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The University of Pennsylvania State University, University Park, PA, USA, 1993.
- PARRA, E. J.; KITTLES, R. A.; ARGYROPOULOS, G.; PFAFF, C. L.; HIESTER, K.; BONILLA, C.; SYLVESTER, N.; PARRISH-GAUSE, D.; GARVEY, W. T.; JIN, L.; McKEIGUE, P. M.; KAMBOH, M. I.; FERRELL, R. E.; POLLITZER, W. S.; SHRIVER, M. D. Ancestral proportions and admixture dynamics in geographically defined African Americans living in South Carolina. **Am J Phys Anthropol**, 114:18-29, 2001.
- PARRA, E. J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M. A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D. B.; DEKA, R.; FERRELL, R. E.; SHRIVER, M. D. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. **Am J Hum Genet**, 63:1839-1851, 1998.
- PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100(1):177-82, Jan 2003.
- PEDROSA, M. P. **A presença africana em Alagoas: contribuições da genética e da biologia molecular ao perfil das comunidades de Muquém e Quilombo**. 1998. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará, PA.
- PFAFF, C. L.; PARRA, E. J.; BONILLA, C.; HIESTER, K.; McKEIGUE, P. M.; KAMBOH, M. I.; HUTCHINSON, R. G.; FERRELL, R. E.; BOERWINKLE, E.; SHRIVER, M. D. Population structure in admixed populations: effect of admixture dynamics on the pattern of linkage disequilibrium. **Am J Hum Genet**, 68:198-207, 2001.
- PRITCHARD J. K.; STEPHENS M., DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. 155(2):945-59. 2000.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Hered**, 86:248-249, 1995.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, 49: 1280-1283, 1995b.
- RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil**. Companhia das Letras, São Paulo, 1995.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C.; PEREIRA, J. M.; LOBATO, M. R. F.; CARVALHO, B. M.; GUERREIRO, J. F.; SANTOS, S. E. B. Dissimilarities in the process of formation of Curiaú a semi-isolated afro-brazilian population of the Amazon region. **Am J Hum Biol**, 14: 440-447, 2002.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; CARVALHO, B.M.; FEIO-DOS-SANTOS, A.C.; DOS SANTOS, S.E. Nucleotide variability of HV-I in Afro-descendents populations of the Brazilian Amazon Region. **Forensic Sci Int**. 167(1):77-80, 2007.
- RICARDO, C. R. (Ed.). **Povos Indígenas no Brasil, 1996-2000**. São Paulo: Instituto Socioambiental, 2000.

- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, 4(4):406-425, 1987.
- SALARI, K.; CHOUDHR, Y. S.; TANG, H.; NAQVI, M.; LIND, D.; AVILA, P. C.; COYLE, N. E.; UNG, N.; NAZARIO, S.; CASAL, J.; TORRES-PALACIOS, A.; CLARK, S.; PHONG, A.; GOMEZ, I.; MATAALLANA, H.; PEREZ-STABLE, E. J.; SHRIVER, M. D.; KWOK, P. Y.; SHEPPARD, D.; RODRIGUEZ-CINTRON, W.; RISCH, N. J.; BURCHARD, E. G.; ZIV, E. Genetic admixture and asthma-related phenotypes in Mexican American and Puerto Rican asthmatics. **Genet Epidemiol**. 29(1):76-86, 2005.
- SALZANO, F. M. Em busca das raízes. **Ciência Hoje**, 5: 48-53, 1986.
- SALZANO, F. M. Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. **An Acad Bras Cienc**, 74(2):223-63, Jun 2002.
- SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17:914-21, 1994.
- SCHMITT, A.; TURATTI, M.C.M; CARVALHO, M.C.P. DE. **A atualização do conceito de quilombo: identidade e território nas definições teóricas**. Ambiente e Sociedade, Ano V, no.10, 1o Semestre de 2002.
- SCHNEIDER, H.; GUERREIRO, J. F.; SANTOS, S. E. B.; WEIMER, T. A.; SCHNEIDER, M. P. C.; SALZANO, F. M. Isolate Breakdown in Amazonia – The blacks of the Trombetas river. **Rev Brasil Genet**, 10: 565-574, 1987.
- SELDIN, M. F.; TIAN, C.; SHIGETA, R.; SCHERBARTH, H. R.; SILVA, G.; BELMONT, J. W.; KITTLES, R.; GAMRON, S.; ALLEVI, A.; PALATNIK, S. A.; ALVARELLOS, A.; PAIRA, S.; CAPRARULO, C.; GUILLERÓN, N. C.; CATOGGIO, L. J.; PRIGIONE, C.; BERBOTTO, G. A.; GARCIA, M. A.; PERANDONES, C. E.; PONS-ESTEL, B. A.; ALARCON-RIQUELME, M. E. Argentine population genetic structure: large variance in Amerindian contribution. **Am J Phys Anthropol**. 132(3):455-62, 2007.
- SHRIVER, M. D.; PARRA, E. J.; DIOS, S.; BONILLA, C.; NORTON, H.; JOVEL, C.; PFAFF, C. L.; JONES, C.; MASSAC, A.; CAMERON, N.; BARON, A.; JACKSON, T.; ARGYROPOULOS, G.; JIN, L.; HOGGART, C. J.; McKEIGUE, P. M.; KITTLES, R. A. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Hum Genet**, 112(4):387-99, 2003.
- SHRIVER, M. D.; SMITH, M. W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J. M.; DEKA, R.; FERRELL, R. E. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **Am J Hum Genet**, 60:957-964, 1997.
- SILVA JR, W. A.; BORTOLINI, M. C.; MEYER, D.; SALZANO, F. M.; ELION, J.; KRISHNAMOORTHY, R.; SCHNEIDER, M. P. C.; CASTRO DE GUERRA, D.; LAYRISSE, Z.; CASTELLANO, H. M.; WEIMER, T. A.; ZAGO, M. A. Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. **Am J Physic Anthropol**, 109: 425-437, 1999.
- SIMÕES, A. L. **O polimorfismo da esterase D em indígenas sul-americanos**. 1980. 115 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- SMITH, M. W.; LAUTERNBERGER, J. A.; DOO-SHINE, H.; CHREETIEN, J.; SHRESTHA, S.; GILBERT, D. A.; O'BRIEN, S. J. Markers for mapping by admixture linkage disequilibrium in African-American and Hispanic populations. **Am J Hum Genet**, 69:1080-1094, 2001.

- SOUZA, I.R. de. **Estudos demográficos genéticos em uma comunidade negra solada, Valongo, SC**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 209 pp, 1993.
- SOUZA, I.R. de; CULPI, L. Valongo, an isolated Brazilian Black community. I. Structure of the population. **Brazil J Genet** 15:439-447, 1992.
- SOUZA, I.R. de; CULPI, L. Valongo, genetic studies on an isolated Afro-Brazilian community. **Genetics and Molecular Biology** 28 (3) 402-406, 2005.
- SOUZA, S. M. B. **Estrutura genética de uma comunidade Afro-brasileira, São Gonçalo (BA)**. 2001. 109 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- TARAZONA-SANTOS, E., CARVALHO-SILVA, D. R., PETTENER, D.; LUISELLI, D.; DE STEFANO, G. F.; LABARGA, C. M.; RICKARDS, O.; TYLER-SMITH, C.; PENA, S. D., SANTOS, F. R. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. **Am J Hum Genet.** Jun;68(6):1485-96, 2001.
- TOMÁS, G.; SECO, L.; SEIXAS, S.; FAUSTINO, P.; LAVINHA, J.; ROCHA, J. The peopling of São Tomé (Gulf of Guinea): origins of slave settlers and admixture with the Portuguese. **Hum Biol**, 74(3):397-411, Jun 2002.
- VIANNA, F.L. O negro na Bahia. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro-RJ, 1988.
- WEBER, J. L.; DAVID, D.; HEIL, J.; FAN, Y.; ZHAO, C.; MARTH, G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. **Am J Hum Genet** 2002; 71:854-862, 2002.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6):1358-1370, 1984.
- ZEMBRZUSKI, V.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; HUTZ, M.H. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. **Ann Hum Genet.** 70(Pt 6):822-8, 2006.

Banco de Dados em Meio Eletrônico

- dbSNP/NCBI. In: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>>. Acesso em: 24 mai. 2003.

ANEXO

MANUSCRITO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Title page

***CYP1A1*2C* as an Ancestry Informative Marker (AIM) to detect Amerindian contribution in Brazilian populations**

Marcelo Rizzatti Luizon¹, Ilíada Rainha de Souza² and Aguinaldo Luiz Simões¹

¹(Institute where the work was conducted) Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Short title *CYP1A1*2C* and Amerindian contribution in Brazilians

A. L. Simões (**Corresponding author**)

Departamento de Genética

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,

Universidade de São Paulo

Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto

State of São Paulo, Brasil, CEP 14049-900

E-mail: alsimoes@fmrp.usp.br

Phone/Fax: 55 (16) 3602-3157

Keywords

*CYP1A1*2C* allele, Amerindians, Brazilians, Amazon, Ancestry Informative Markers, Large frequency differences

Abstract

Ancestry informative markers (AIMs) are genetic *loci* showing alleles with large frequency differences ($\delta > 30\%$) between populations. *CYP1A1*2C* allele (Ile462Val polymorphism of CYP1A1 gene) is very rare among Caucasians and Africans and was observed at higher frequencies in Brazilian Amerindians. The presence of this variant was investigated in four tribes of Brazilian Amazon (n=297 individuals) in order to corroborate the high δ values observed elsewhere. These values were compared to an urban sample from the State of São Paulo (Southeastern Brazil, n=90) and the quilombo remnant of Valongo (Southern Brazil, n=52). *CYP1A1*2C* was analyzed by the PCR-RFLP method before digestion with *Bsr*DI. Its presence ranged from 80% to 93% among the indigenous tribes, in accordance with previous reported data for other Brazilian tribes. This variant was absent in Valongo, probably related to the low frequencies observed in African populations. The frequency (8.3%) of the urban sample was lower than those observed to other Afro-derived Brazilians previously studied, and can be explained by different Amerindian contribution to them. The large frequency differences between the Amazon tribes studied and African and European populations indicate that *CYP1A1*2C* could be used as an AIM to distinguish Amerindian contribution to tri-hybrid Brazilian populations.

Acknowledgements:

This work was supported by grants from the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq / Brazil).

Introdução

Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs, do inglês *Ancestry Informative Markers*) são *loci* que possuem alelos com grandes diferenciais de frequência ($\delta > 30\%$) entre os principais grupos étnicos (Shriver *et al.*, 2003). Estes são considerados ferramentas eficientes na determinação de estimativas mais precisas de mistura étnica e na detecção de estrutura populacional (Bonilla *et al.*, 2005; Choudhry *et al.*, 2006). Considerando a natureza tri-híbrida da população Brasileira, faz-se necessário a seleção de marcadores específicos que permitam estimar a contribuição do componente Ameríndio.

O gene *CYP1A1* desempenha um papel significativo no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), um importante grupo de substâncias carcinogênicas. Uma substituição de base (A2455G) no exon 7 induz a mudança do aminoácido isoleucina para uma valina no codon 462 (Ile462Val). Esta variante, denominada alelo *CYP1A1*2C*, tem sido associada com o risco aumentado para alguns tipos de câncer (Cascorbi *et al.*, 1996, Esteller *et al.*, 1997, Garte 1998).

As presença do alelo *CYP1A1*2C* é muito rara dentre os Europeus (de 2,8% a 6%; Cascorbi *et al.*, 1996, Esteller *et al.*, 1997, Landi *et al.*, 2005) e Africanos (1,3% em 114 indivíduos; Dandara *et al.*, 2002). Por outro lado, está presente em altas frequências em Sul-ameríndios (de 54% a 97%; Muñoz *et al.*, 1998, Kvitko *et al.*, 2000, Gaspar *et al.*, 2002a). Portanto, esta variante apresenta grandes valores de δ entre populações ameríndias e europeias ou africanas.

As frequências do alelo *CYP1A1*2C* em 297 indivíduos de quatro tribos indígenas da Amazônia Brasileira são aqui relatadas no intuito de confirmar aqueles altos valores de δ observados. Estas tribos são caracterizadas por baixa mistura com populações não-indígenas, de acordo com a análise de marcadores clássicos (2 a 3%; Mohrenweiser *et al.*, 1979, Neel *et al.*, 1980) e AIMs (Luizon *et al.*, 2007), e suas frequências poderiam ser consideradas como

parentais de populações Ameríndias em estimativas de mistura étnica. Uma amostra urbana da população do Estado de São Paulo (Sudeste do Brasil, n = 90) e da comunidade remanescente de quilombo de Valongo (Sul do Brasil, n = 52) também foram determinadas para permitir comparações adicionais.

Material e Métodos

As amostras de quatro tribos indígenas da Amazônia Brasileira (*Tikúna*, *Baníwa*, *Kashinawa* e *Kanamari*; Figura 1) foram coletadas em 1976 para estudos de marcadores clássicos (Mestriner *et al.*, 1980). O anel leucocitário foi removido por aspiração e, após a retirada do plasma as hemácias foram então lavadas em solução salina e o sedimento resultante após a última centrifugação foi diluído em tampão glicerol a 30% e mantido a –20°C em nosso laboratório até o presente. As amostras de Valongo, uma comunidade isolada do Sul do Brasil de origem predominantemente da África Sub-Saariana (um remanescente de quilombo), e de indivíduos não aparentados nascidos no estado de São Paulo, Sudeste do Brasil, foram coletadas como descrito na literatura (de Souza e Culpí 2005 e Ferreira *et al.*, 2006, respectivamente).

Figura 1

O DNA genômico foi isolado a partir de uma alíquota de 300 µl de sangue total (incluindo leucócitos). O alelo *CYP1A1*2C* foi detectado por PCR seguida de digestão pela endonuclease de restrição *BsrDI*, segundo os *primers* e condições de reação descritas por Cascorbi *et al.*, (1996). Os fragmentos de DNA foram então separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% e visualizados por coloração com nitrato de prata. As frequências alélicas foram estimadas por contagem gênica e as análises estatísticas realizadas pelo software GENEPOP (Raymond & Rousset 1995, versão 3.4), disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>. As diferenças entre os nossos dados e as frequências

alélicas obtidas na literatura foram estimadas pelo teste exato de Fisher. Os procedimentos realizados no presente trabalho foram revisados e aprovados pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, Processo 25000.097241.2001-83).

Resultados e discussão

O presente trabalho apresenta altas frequências do alelo *CYP1A1*2C* em sete aldeias de quatro tribos da Amazônia Brasileira, a ausência desta variante em uma comunidade remanescente de quilombo do Sul do Brasil, e sua baixa frequência em uma amostra urbana do Sudeste do Brasil (Figura 1 e Tabela 1).

As frequências da aldeia Vendaval, e da tribo *Tikúna* como um todo, não apresentaram aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes desvios podem estar relacionados. Eles são causados pelo déficit de heterozigotos que, por sua vez, poderia ser ocasionado por consangüinidade, heterogeneidade populacional (efeito de Wahlund) ou seleção natural.

Um cenário provável para o aumento da frequência deste alelo em Ameríndios pode ter ocorrido quando da travessia do estreito de Behring. Uma pequena parcela da variabilidade total da população Asiática contida na população migrante apresentaria, ao acaso, frequências mais altas do alelo *CYP1A1*2C*. No entanto, dada as baixas frequências observadas atualmente em Asiáticos (Tabela 1), fatores seletivos também poderiam ter atuado em regiões e/ou momentos de gargalo a partir do qual teriam emergido populações com altas frequências do alelo espalhando-se pelo continente onde não mais estariam presentes tais fatores seletivos. O aumento da frequência do *CYP1A1*2C* na América do Sul teria sido, portanto, uma mistura de seleção natural e efeito do fundador.

O tipo sanguíneo O e alguns haplogrupos do mtDNA são exemplos de marcadores característicos de ameríndios por terem suas frequências significativamente maiores entre eles do que nos outros grupos populacionais. A mesma razão ou motivo que provocou o

aparecimento de tais marcadores pode ter motivado o aparecimento do alelo *CYP1A1*2C* com alta frequência em ameríndios.

Por outro lado, estas comunidades indígenas isoladas são particularmente sensíveis ao efeito da deriva genética (Salzano 2002). No entanto, o alto valor médio observado nos ameríndios Sul-americanos (Tabela 1) em relação a Europeus, Africanos e Asiáticos não poderia ser explicado pela deriva. Seu efeito teria provocado uma variação em torno desta frequência média alta, o que pode ser constatado para alguns valores relatados na literatura (Tabela 1).

A média ponderada das frequências aqui descritas (90,9%) é maior do que a observada para as demais tribos (73,2%) relatadas na literatura (Tabela 1). As primeiras são provavelmente mais representativas, pois as tribos apresentam baixa mistura com populações não indígenas de acordo com marcadores clássicos (2-3%; Mohrenweiser *et al.*, 1979, Neel *et al.*, 1980) e AIMs (Luizon *et al.*, 2007). Estas frequências também são muito maiores do que as descritas para populações européias e mais ainda em relação às frequências de populações africanas (Tabela 1).

Com o objetivo de comparar as frequências deste marcador em diferentes segmentos da população brasileira, uma amostra urbana e um remanescente de quilombo foram aqui incluídos.

Em princípio, um remanescente de quilombo deve ter grande proporção de seus genes derivados de estoques africanos. De fato, o quilombo de Valongo demonstrou ausência de contribuição ameríndia e a africana foi estimada em $97,33\% \pm 10,41$ por marcadores clássicos (de Souza e Culpi 2005). Isto explica a ausência do alelo *CYP1A1*2C* nesta comunidade, tendo em vista a baixa frequência (1,3%) observada em populações africanas (Tabela 1; Dandara *et al.*, 2002).

A frequência de *CYP1A1*2C* na amostra urbana analisada (8,3%; Tabela 1) é concordante com a contribuição ameríndia estimada para a mesma a partir de STRs autossômicos (7%; Ferreira *et al.*, 2006). Esta frequência também é maior do que a frequência africana (Tabela 1), e pode ser atribuída à contribuição indígena para esta amostra.

A comparação das frequências alélicas pelo teste exato de Fisher revela diferença estatística ($p = 0,014$) entre a amostra urbana aqui analisada e a amostra de Afro-brasileiros de Porto Alegre (Gaspar *et al.*, 2002b), mas não com relação a outras amostras urbanas brasileiras relatadas na literatura (Tabela 1). A contribuição ameríndia nas amostras Afro-brasileiras analisadas por Gaspar *et al.*, (2002b) foi estimada em 0% a 7% para Porto Alegre (Bortolini *et al.*, 1999), em 7% para o Rio de Janeiro (Palatnik *et al.*, 2000), e em 4% a 11% para Salvador (Bortolini *et al.*, 1999). A menor contribuição ameríndia em Porto Alegre poderia explicar a diferença estatística com relação a amostra urbana analisada no presente trabalho.

Conclusões

As frequências do alelo *CYP1A1*2C* nas tribos indígenas da Amazônia analisadas apresentam grande diferencial ($\delta > 70\%$) em relação as de Africanos e Europeus e são concordantes com aquelas observadas em outras tribos indígenas da América do Sul, o que confirma os altos valores de δ observados na literatura. Este grande valor de δ indica que o alelo *CYP1A1*2C* poderia ser útil como um AIM na determinação das contribuições Ameríndia em estimativas de mistura envolvendo as populações tri-híbridas Brasileiras. Além disso, a alta heterogeneidade das frequências observadas entre os principais grupos étnicos que participaram da formação da população Brasileira deve ser levada em consideração no delineamento de estudos de associação caso-controle devido a possibilidade de ocorrência de estratificação populacional entre casos e controles, o que levaria a resultados falso-positivos.

Referências

- Bonilla C, Gutierrez G, Parra EJ, Kline C, Shriver MD (2005) Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero, Mexico. *Am J Phys Anthropol* 128(4):861-9
- Bortolini MC, Da Silva WA Junior W, De Guerra DC, Remonato G, Mirandola R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MC, Zago MA, Salzano FM (1999) African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *Am J Hum Biol* 11(4):551-563
- Boyapati SM, Shu XO, Gao YT, Cai Q, Jin F, Zheng W (2005) Polymorphisms in CYP1A1 and breast carcinoma risk in a population-based case-control study of Chinese women. *Cancer*. 2005 Jun 1;103(11):2228-35.
- Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I (1996) A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 56(21):4965-9
- Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, Tsai HJ, Naqvi M, Phong A, Ung N, Matallana H, Avila PC, Casal J, Torres A, Nazario S, Castro R, Battle NC, Perez-Stable EJ, Kwok PY, Sheppard D, Shriver MD, Rodriguez-Cintron W, Risch N, Ziv E, Burchard EG; Genetics of Asthma in Latino Americans GALA Study (2006) Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 118(5):652-64
- Dandara C, Sayi J, Masimirembwa CM, Magimba A, Kaaya S, De Sommers K, Snyman JR, Hasler JÁ (2002) Genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) and glutathione transferases (M1, T1 and P1) among Africans. *Clin Chem Lab Med* 40(9):952-7
- de Souza IR, Culp L (2005) Valongo, genetic studies on an isolated Afro-brazilian community. *Genet Mol Biol* 28(3):402-406
- Duzhak T, Mitrofanov D, Ostashevskii V, Gutkina N, Chasovnikova O, Posukh O, Osipova L, Lyakhovich VV (2000) Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1, GSTM1 and p53 genes in a unique Siberian population of Tundra Nentsi. *Pharmacogenetics* 10(6):531-537
- Esteller MA, Garcia JM, Martínez-Palones *et al.*, (1997) Susceptibility to endometrial cancer: Influence of allelism at p53, glutathione S-transferase (GSTm1 and GST1) and cytochrome P-450 (CYP1A1) *loci*. *Br J Cancer* 75:1385-1388
- Ferreira LB, Mendes-Junior CT, Wiesel CE, Luizon MR, Simoes AL (2006) Genomic ancestry of a sample population from the state of Sao Paulo, Brazil. *Am J Hum Biol* 18(5):702-5
- Garte S (1998) The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis* 19(8):1329-32
- Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Weimer TA (2002a) Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 119(3):249-56
- Gaspar PA, Kvitko K, Papadópolis LG, Hutz MH, Weimer TA (2002b) High frequency of CYP1A1*2C allele in Brazilian populations. *Hum Biol* 74(2):235-242

- Kvitko K, Nunes JC, Weimer TA, Salzano FM, Hutz MH (2000) Cytochrome P4501A1 polymorphisms in South American Indians. *Hum Biol* 72(6):1039-43
- Landi MT, Bergen AW, Baccarelli A, Patterson DG Jr, Grassman J, Ter-Minassian M, Mocarelli P, Caporaso N, Masten SA, Pesatori AC, Pittman GS, Bell DA (2005) CYP1A1 and CYP1B1 genotypes, haplotypes, and TCDD-induced gene expression in subjects from Seveso, Italy. *Toxicology* 207(2):191-202
- Luizon MR, Mendes-Junior CT, de Oliveira SF, Simões AL (2007) Ancestry Informative Markers in Amerindians from Brazilian Amazon. *Am J Hum Biol* (aceito para publicação).
- Mestriner MA, Simões AL, Salzano FM (1980) New studies on the esterase D polymorphism in South American Indians. *Am J Phys Anthropol* 52(1):95-101
- Mohrenweiser H, Neel JV, Mestriner MA, Salzano FM, Migliazza E, Simões AL, Yoshihara CM (1979) Electrophoretic variants in three Amerindian tribes: the *Baníwa*, Kanamari, and Central Pano of western Brazil. *Am J Phys Anthropol* 50(2):237-46
- Muñoz S, Vollrath V, Vallejos MP, Miquel JF, Covarrubias C, Raddatz A, Chianale J (1998) Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics* 8(4):343-51
- Neel JV, Gershowitz H, Mohrenweiser HW, Amos B, Kostyu DD, Salzano FM, Mestriner MA, Lawrence D, Simoes AL *et al.*, (1980) Genetic studies on the Ticuna, an enigmatic tribe of Central Amazonas. *Ann Hum Genet* 44(Pt 1):37-54
- Palatnik M, Silva Jr. WA, Estalote AC *et al.*, (2000) Gene admixture and type 2 diabetes mellitus (type 2 DM) in Rio de Janeiro, Brazil. *Genet Mol Biol* 23 (Suppl 3):608
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248-249
- Salzano FM (2002) Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc* 74(2):223-63
- Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, Pfaff C, Jones C, Massac A, Cameron N, Baron A, Jackson T, Argyropoulos G, Jin L, Hoggart CJ, McKeigue PM, Kittles RA (2003) Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet* 112(4):387-99

Figura 1. Mapa indicando a localização das tribos analisadas.

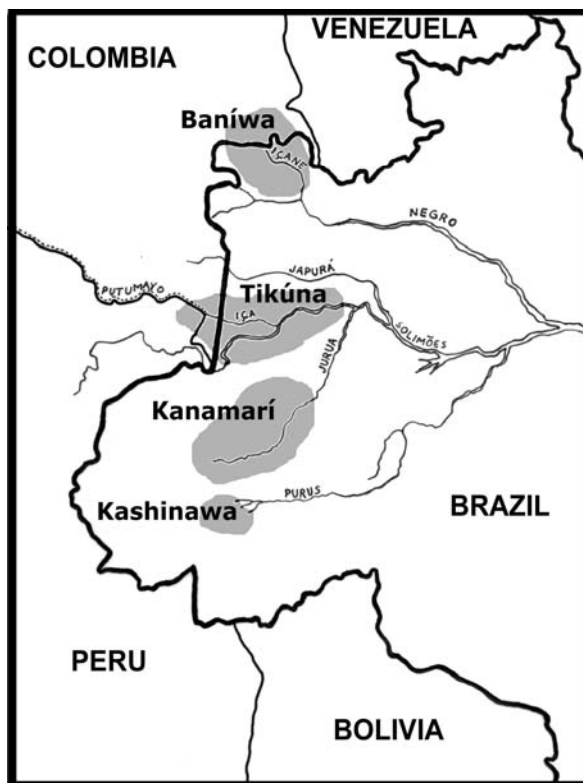


Tabela 1. Frequências do alelo *CYP1A1*2C* (%) em populações mundiais.

População	2n	*2C	Referências
África ^a	228	1,3	Dandara <i>et al.</i> , 2002
Europa	924	2,8 - 5,8	Cascorbi <i>et al.</i> , 1996, Esteller <i>et al.</i> , 1997
Itália	242	6	Landi <i>et al.</i> , 2005
Ásia			
China	2454	24,8	Boyapati <i>et al.</i> , 2005
Sibéria	102	35	Duzhak <i>et al.</i> , 2000
América			
Aché	134	100	Gaspar <i>et al.</i> , 2002a
Baniwa	98	89,8	present study
Gavião	60	59	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Guarani	102	90,2	Gaspar <i>et al.</i> , 2002a
Kanamari	68	92,6	presente estudo
Kashinawa	50	80	presente estudo
Mapuche	168	77	Muñoz <i>et al.</i> , 1998
Suruí	48	54	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Tikúna (4 aldeias)	378	92,1	presente estudo
Umariacú	100	94	presente estudo
Feijoal	98	95,9	presente estudo
Vendaval	90	82,2	presente estudo
Belém	90	95,6	presente estudo
Xavante	42	97	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Wai Wai	52	81	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Zoró	60	76	Kvitko <i>et al.</i> , 2000
Afro-brasileiros			
Porto Alegre	274	15,7	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b
Rio de Janeiro	128	11,7	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b
Salvador	60	15	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b
São Paulo	180	8,3	presente estudo
Valongo	104	0	presente estudo
Euro-brasileiros			
Porto Alegre	172	11,6	Gaspar <i>et al.</i> , 2002b

^aTanzânia, os Venda da África do Sul, e Zimbábue