



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal

VARIAÇÃO DO GENE *SLC45A2* E ASSOCIAÇÃO COM A COR DA PELE E  
ANCESTRALIDADE GENÉTICA AFRICANA EM QUILOMBOS BRASILEIROS

**Tatiana dos Anjos Resende**

Brasília

2013

VARIAÇÃO DO GENE *SLC45A2* E ASSOCIAÇÃO COM A COR DA PELE E  
ANCESTRALIDADE GENÉTICA AFRICANA EM QUILOMBOS BRASILEIROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Animal da Universidade de  
Brasília como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Mestre em Biologia Animal.

**Tatiana dos Anjos Resende**

Orientadora: Dra. Maria Nazaré Klautau Guimarães

Brasília

2013

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília – UnB com o apoio Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, com o suporte financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Á minha madrinha e avó Tinota que faleceu antes dessa conclusão e  
mais que ninguém torceu por isso.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Às minhas orientadoras, Dra Nazaré Klautau e Dra. Silviene Oliveira, pelos ensinamentos e exemplo de profissionalismo e ética, pela confiança e pela compreensão.

Ao Dr. Celso Teixeira Mendes Júnior, da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, por todo apoio e por conceder reagentes para este estudo;

Ao Dr. Jorge Lobo, Leonardo Marano e Henrique Valadão pelo auxílio com análises estatísticas.

Às agências de fomento CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade de avaliar este trabalho e com isso contribuir com o meu crescimento acadêmico.

Aos membros da equipe e amigos do Laboratório de Genética da UnB. Gabi e Bárbara o meu braço direito durante a parte experimental, que além do apoio e amizade incondicionais de vocês me ajudaram a chegar até aqui. Carol, Rafaela e Arcanjo, que além da amizade doaram seu tempo e conhecimento. Aos demais, Mariana, Camila, Marcela, Raphael, Arthur, Harumy, Pimenta, Sabrina, Diego e Diana minha total gratidão.

A toda minha família, pelo carinho e apoio durante todo este percurso, pela compreensão das intermináveis ausências, de quem este trabalho roubou dias e dias de convívio. Em especial a minha mamãe Cléria que sempre acreditou e sonhou comigo essa vitória. Ao meu papai Wilson pela força e determinação e aos meus irmãos Amanda, Marlon e Natália agradeço pelo amor de sempre. Não posso esquecer o meu “madrucinho de pé de limão”, Bruninha, que nos momentos mais difíceis me arranca sorrisos.

Ao Fábio, meu grande amor, pela compreensão, pela paciência e por me ajudar diretamente neste trabalho me dando estrutura emocional e estando presente em cada momento desta etapa.

Agradeço.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1 ANCESTRALIDADE GENÔMICA.....	3
1.2 A CONSTITUIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	6
1.3 EVOLUÇÃO DA COR DA PELE.....	10
1.4 BIOLOGIA DA PIGMENTAÇÃO.....	17
1.5 GENÉTICA DA PIGMENTAÇÃO.....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 AMOSTRA POPULACIONAL.....	23
3.1.1 <i>Kalunga</i> .....	23
3.1.2 <i>Mocambo</i> .....	24
3.1.3 <i>Rio das Rãs</i> .....	24
3.1.4 <i>Sacutiaba</i> .....	25
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	26
3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	26
3.3.1 <i>Extração de DNA</i> .....	26
3.3.2 <i>Análise de SNPs no gene SLC45A2</i> .....	26
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
3.4.1 <i>Análise populacional de quilombos brasileiros com relação a marcadores genéticos situados no gene SLC45A2</i> .....	30
3.4.2 <i>Análise de associação entre a classificação fenotípica com relação ao gene SLC45A2</i> .....	32

3.4.3	<i>Análise de associação entre o Índice de Ancestralidade Africana com relação ao gene SLC45A2</i> .....	34
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	ANÁLISE POPULACIONAL DE QUILOMBOS BRASILEIROS COM RELAÇÃO A MARCADORES GENÉTICOS SITUADOS NO GENE SLC45A2....	37
4.1.1	<i>Análise dos SNPs</i> .....	37
4.1.2	<i>Desequilíbrio de Ligação</i> .....	40
4.1.3	<i>Diferenciação populacional (Fst)</i> .....	40
4.1.4	<i>Análises haplotípicas</i> .....	42
4.1.5	<i>Diferenciação populacional haplotípica (Fst)</i> .....	44
4.2	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA COM RELAÇÃO AO GENE SLC45A2.....	44
4.2.1	<i>Classificação fenotípica x Dados do IBGE</i> .....	44
4.2.2	<i>Classificação fenotípica x SNPs</i> .....	47
4.3	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE ANCESTRALIDADE AFRICANA COM RELAÇÃO AO GENE SLC45A2.....	48
4.3.1	<i>IAA x SNPs</i> .....	48
4.3.2	<i>IAA x haplótipos</i> .....	49
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
5.1	ANÁLISE POPULACIONAL DE QUILOMBOS BRASILEIROS COM RELAÇÃO A MARCADORES GENÉTICOS SITUADOS NO GENE SLC45A2....	53
5.1.1	<i>Análise dos SNPs</i> .....	53
5.1.2	<i>Desequilíbrio de Ligação</i> .....	55
5.1.3	<i>Análises haplotípicas</i> .....	58
5.1.4	<i>Diferenciação populacional haplotípica (Fst)</i> .....	60
5.2	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA COM RELAÇÃO AO GENE SLC45A2.....	61
5.2.1	<i>Classificação fenotípica x Dados do IBGE</i> .....	61
5.2.2	<i>Classificação fenotípica x SNPs</i> .....	61

5.3	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE ANCESTRALIDADE AFRICANA COM RELAÇÃO AO GENE <i>SLC45A2</i> .....	63
5.3.1	<i>IAA x SNPs</i> .....	63
5.3.2	<i>IAA x haplótipos</i> .....	64
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>66</b>
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>
8.	<b>SÍTIOS DA INTERNET</b> .....	<b>79</b>
9.	<b>ANEXOS</b> .....	<b>80</b>



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estimativa das contribuições Ameríndia, Africana e Europeia nas comunidades quilombolas Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba, inferidas a partir de marcadores mitocondriais, STRs, AIMS e STR-Y.....	11
<b>Tabela 2.</b> Localização geográfica, estimativas de tamanho populacional e número de indivíduos analisados das populações afrodescendentes estudadas.....	25
<b>Tabela 3.</b> Concentração dos reagentes nas reações de PCR para os marcadores do gene <i>SLC45A2</i> .....	28
<b>Tabela 4.</b> Condições de PCR para os marcadores do gene <i>SLC45A2</i> .....	28
<b>Tabela 5.</b> Concentração dos reagentes para digestão enzimática e condições das reações utilizadas para análise dos RFLP.....	29
<b>Tabela 6.</b> Região, mutação e iniciadores dos SNPs situados no gene <i>SLC45A2</i> .....	29
<b>Tabela 7.</b> Número ( <i>n</i> ) e proporção (%) de indivíduos classificados quanto à cor de pele na população do Brasil e nas populações dos estados brasileiros (Dados da pesquisa domiciliar de 2010).....	33
<b>Tabela 8.</b> Frequência alélica e genotípica de seis SNPs situados no gene <i>SLC45A2</i> em quatro quilombos brasileiros - Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba - número amostral ( <i>n</i> ), heterozigose observada e esperada e <i>p</i> -valor dos testes de aderência ao EHW.....	38/39
<b>Tabela 9.</b> Haplótipos do gene <i>SLC45A2</i> e suas frequências nas populações Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba.....	43

<b>Tabela 10.</b> Teste Exato de diferenciação populacional para os haplótipos do gene <i>SLC45A2</i> em quatro quilombos brasileiros. Os valores de <i>Fst</i> estatisticamente significativos encontram-se em negritos.....	44
<b>Tabela 11.</b> Comparação dos quilombos e a população brasileira com relação à classificação fenotípica de indivíduos distribuídos em quatro categorias de cor da pele (GL = 3).....	45
<b>Tabela 12.</b> Análise de associação entre a classificação fenotípica e genótipos/alelos dos SNPs do gene <i>SLC45A2</i> em quilombos brasileiros analisados neste trabalho.....	50
<b>Tabela 13.</b> Análise de associação dos SNPs situados no gene <i>SLC45A2</i> com o Índice de Ancestralidade Africana, estimados para os indivíduos quilombolas analisados no presente trabalho.....	51
<b>Tabela 14.</b> Associação dos haplótipos do gene <i>SLC45A2</i> com os Índices de Ancestralidade Africana, em indivíduos quilombolas analisados no presente trabalho.....	52
<b>Tabela 15.</b> Frequência do alelo mutante dos SNPs situados no gene <i>SLC45A2</i> em populações quilombolas analisadas no presente trabalho e em populações descritas na literatura.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Percentual da população brasileira por categoria de cor de pele, seguindo a nomenclatura do IBGE. Dados da pesquisa domiciliar de 2010.....8
- Figura 2.** Modelo evolutivo da pigmentação da cor da pele humana em três populações: Africana, Asiática e Européia. Adaptado de McEvoy *et al.* 2006.....14
- Figura 3.** Padrão de distribuição global da variação da cor da pele em humanos. Adaptado de Jobling 2004.....15
- Figura 4.** Via metabólica da biossíntese de eumelanina/feomelanina a partir da tirosina, apresentando a atuação de diversos genes/enzimas. Adaptado de Bouakaze *et al.* 2009.....18
- Figura 5.** Esquema da arquitetura da pele clara e escura e a profundidade dos raios ultra-violeta. BM, membrana basal; D, derme; Tipos celulares: K, queratinócitos; M, melanócitos; F, fibroblastos; formas ovais, melanosomos. Adaptado de Yamaguchi *et al.* 2007.....18
- Figura 6.** Representação de um melanócito apresentando alguns dos genes envolvidos no sistema de pigmentação. Adaptado de Parra 2011.....20
- Figura 7.** Localização geográfica dos quilombos estudados no presente trabalho. Adaptado de Gontijo 2008.....25
- Figura 8.** Diagrama do gene *SLC45A2*, com a localização dos éxons (1 a 7) e dos seis SNPs: A-rs732740; B-rs181832; C-rs3756462; D-rs26722; E-rs168919825; e F-rs35394; A seta abaixo do nome do gene mostra a direção da transcrição e as demais setas indicam a direção do centrômero e do telômero.....27

<b>Figura 9.</b> Distribuição dos indivíduos de acordo com o Índice de Ancestralidade Africana individual dos quilombolas analisados no presente trabalho. Obtidos por Gontijo, comunicação pessoal.....	35
<b>Figura 10.</b> Representação da distribuição dos indivíduos quilombolas nas classes fenotípicas de cor de pele de acordo com as categorias do IBGE.....	35
<b>Figura 11.</b> Correlação entre Índice de Ancestralidade Africana e a classificação fenotípica cor de pele, em indivíduos quilombolas analisados nesse trabalho.....	36
<b>Figura 12.</b> Matriz de Desequilíbrio de Ligação entre os seis SNPs nas quatro populações: A - Kalunga, B - Mocambo, C - Rio das Rãs e D - Sacutiaba. Em negrito estão representados os valores estatisticamente significativos.....	41
<b>Figura 13.</b> Matriz de diferenciação populacional baseado nos dados de <i>Fst</i> para as populações quilombolas analisadas neste trabalho.....	42
<b>Figura 14.</b> Comparação da classificação fenotípica da cor de pele entre os quilombos e a população brasileira e entre os quilombos e os estados brasileiros nos quais estão inseridos.....	46
<b>Figura 15.</b> Modelos explicativos do decaimento de Desequilíbrio de Ligação por miscigenação. Adaptado de Pffaf <i>et al.</i> 2001.....	57
<b>Figura 16.</b> A. Taxa de recombinação ao longo do cromossomo 5 mostrada em preto; pontos azuis sinalizam região de baixa recombinação e pontos vermelhos de alta (adaptado de Myers <i>et al.</i> 2005). B. ideograma do cromossomo 5 sinalizando, em vermelho, a região genômica do gene <i>SLC45A2</i> ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ).....	58

## RESUMO

Variação em genes relacionados com características fenotípicas pode explicar a variabilidade da característica entre os indivíduos e entre populações. Nesse contexto, a variabilidade genética do gene *SLC45A2* vem sendo estudada, visto que a proteína codificada aparentemente desempenha função relevante na síntese de melanina. Nesse trabalho foi avaliada a variação desse gene e a associação com cor da pele e ancestralidade genética africana em indivíduos de quilombos brasileiros: Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba. Foram avaliadas seis SNPs: quatro em íntrons (rs732740, rs181832, rs3756462 e rs35394) e dois em éxons (rs26722 e rs16891982). Como resultado, foi observado que as populações compartilharam o alelo mais comum para todos os marcadores e não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci*. Kalunga e Rio das Rãs apresentaram a menor diferenciação populacional. Sacutiaba apresentou maior diferenciação populacional com todas as populações. Os haplótipos mais frequentes foram compartilhados entre as quatro populações. Foi observada diferença significativa quanto a classificação da cor da pele entre a população brasileira e o pool de indivíduos quilombolas, e entre as comunidades e as populações dos estados onde estas se localizam. A exceção observada foi Sacutiaba. Foi observada associação estatisticamente significativa entre a classificação fenotípica cor de pele negra e quatro dos marcadores analisados. Sugere-se que o genótipo CT, do marcador rs3756462, o alelo C e genótipo CC, dos rs26722 e rs16891982, e, por fim, o alelo T do rs35394, ocorram frequentemente em pele mais escura. Foi observada associação estatisticamente significativa entre o Índice de Ancestralidade Africana e o marcador rs16891982. Observou-se associação entre os haplótipos 6 e 12 e a estimativa baixa de ancestralidade africana, sugerindo que esses haplótipos sejam indicativos de cor de pele clara.

**ABSTRACT**

Variation on genes related to phenotypic traits can explain the variability associated with such trait among individuals and populations. In this context, the genetic variability of the *SLC45A2* gene has been studied, since the protein encoded by this gene is involved on melanin synthesis. This work aimed to evaluate variation in this gene, skin color and the African Ancestry Index (AAI) in four Brazilian afro-derived communities called quilombos: Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs and Sacutiaba. Six SNPs were studied: four within introns (rs732740, rs181832, rs3756462 and rs35394) and two within exons (rs26722 e rs16891982). It was observed that all populations share the most frequent allele for all markers and all pairs of loci were in Hardy-Weinberg's Equilibrium. Kalunga and Rio das Rãs showed little population differentiation. Sacutiaba showed great population differentiation when compared to every one of the other populations. The most frequent haplotypes were shared between all four populations. Significant differences were observed regarding skin-color assignment between Brazilian population and the quilombos, and also between these communities and urban populations surrounding them, except for Sacutiaba. There was significant association between black skin-color assignment and four of the studied SNPs. The results suggest that the genotypes CT (rs3756462), C allele and CC genotype (rs26722 and rs16891982) and T allele (rs35394) are most frequent in individuals with a darker shade of skin color. There was also association between AAI and the rs16891982 SNP. Also, haplotypes 6 and 12 are associated with low indices of AAI, suggesting that those haplotypes are indicatives of lighter shades of skin color.

## INTRODUÇÃO

### *Ancestralidade genômica*

Qual a ancestralidade de uma dada população humana atual miscigenada, isso é, de onde vieram os ancestrais que deram origem a tal população? Apesar da disponibilidade de dados históricos, geralmente há carência de dados que permitam responder a tal questionamento. Uma das maneiras de elucidar tal questão é por meio da análise de ancestralidade populacional, ou seja, a avaliação da contribuição de grupos parentais na formação de uma população, a partir da ancestralidade individual.

Tais inferências vêm sendo utilizadas em estudos de reconstrução histórica de populações e povoamentos. Por exemplo, são utilizados para uma melhor compreensão da história e relacionamento entre grupos humanos (Beleza *et al.* 2012; Ang *et al.* 2012; Wang *et al.* 2008; Tang *et al.* 2007; Martinez *et al.* 2007; González-Andrade *et al.* 2007 e Martinez-Marignac *et al.* 2004) e em análise de estruturação populacional como base para estudo de mapeamento gênico por desequilíbrio de ligação (Shriver *et al.* 2008; Shriver *et al.* 1997). São indicados também em estudos de associação, para os quais a determinação de ancestralidade individual tem sido uma parte importante na definição da amostra controle, incluindo os estudos sobre a pigmentação humana (Leite 2012; Bonfim 2012; Chiabai 2008; Pimenta *et al.* 2006; Shriver *et al.* 1997).

As aplicações das inferências de ancestralidades foram aplicadas também na pesquisa biomédica e clínica, por exemplo, como os medicamentos BiDil® para os afro-americanos com insuficiência cardíaca e advertências do Carbamazepina para os asiáticos (Ferdinand 2008; Ferrell e McLeod 2008). Outro exemplo de aplicação é na genética forense, onde estes testes podem funcionar num sentido preditivo ou inferencial da ancestralidade genética de suspeitos, a partir da análise de material biológico obtido, por exemplo, em cenas de crime (Andrade *et al.* 2011; Fracasso *et al.*

2011; Mendes-Junior 2010; Andrade 2010; Jobling e Gill 2004). Finalmente, outra utilização é a possibilidade de extrapolação de ancestralidade biogeográfica a partir de genes que sofreram seleção ao longo da história da espécie humana, como os de cor da pele (Giardina *et al.* 2008).

Para estimar ancestralidade genética utiliza-se o conhecimento de frequências alélicas de marcadores genéticos nas populações alvo do estudo e nas populações parentais da mesma. Marcadores genéticos são regiões do genoma que apresentam variabilidade e possibilitam a diferenciação entre indivíduos e/ou populações. Dentre as ferramentas mais utilizadas estão os AIMS (*Ancestry Informative Markers* - Marcadores informativos de ancestralidade), esses apresentam grande diferença de frequência alélica ( $\delta$ ) entre populações e podem chegar à ausência ou presença exclusiva de um determinado alelo em uma dada população (Shriver *et al.* 1997). Estes marcadores tem se mostrado eficientes para identificar populações definidas geográfica e etnicamente e, com isso, permitem estimar o percentual de contribuição de grupos parentais na composição de populações miscigenadas.

Qualquer tipo de marcador genético pode ser classificado como um AIM, incluindo os polimorfismos de base única (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*), que são sequências de DNA variáveis em um único nucleotídeo no genoma de indivíduos da mesma espécie (Sobrinho *et al.* 2005). Os SNPs frequentemente são encontrados próximos ou em regiões codificantes do gene, sendo relevantes para a determinação de fenótipos (Brettell *et al.* 2007; Frudakis 2007).

As diferenças na acurácia de predição da ancestralidade genética em função da localização do SNPs no genoma (em íntrons, éxons, regiões regulatórias ou codificantes de RNA mensageiro) são extremamente pequenas. Por outro lado, SNPs que sejam AIMS são os mais eficazes (Allocco *et al.* 2007). Mas, além da diferença de frequência



alélica, há na literatura formas mais complexas e acuradas de inferir o poder de discriminação ancestral de um painel de AIMs. Por exemplo, quanto mais antigo o processo de miscigenação, maior o número de marcadores necessários para acessar a estrutura dentro da população e, quanto mais informativos os marcadores, melhor a estimativa (Tian *et al.* 2007).

A qualidade dos AIMs, em termos de diferença de frequência alélica entre as populações a serem discriminadas, é fator indispensável na análise da ancestralidade genética, sendo, inclusive, preponderante sobre a quantidade de marcadores. Um estudo realizado por Campbell e colaboradores (2005) avaliou a estratificação dentro de uma população de norte-americanos euro-descendentes e, após a genotipagem de 67 AIMs específicos para diferenciação de regiões genéticas de ancestralidade descendente de africanos e europeus, não encontraram evidências de estratificação. No entanto, quando avaliaram o polimorfismo LCT (rs4988235), cuja frequência alélica varia entre o norte e o sul europeu, foi possível identificar a estratificação (Campbell *et al.* 2005).

Encontra-se com frequência diversos marcadores genéticos em um mesmo gene e/ou região genômica. Espera-se que marcadores situados fisicamente próximos apresentem desequilíbrio de ligação (DL), que é definido por uma herança não independente entre dois ou mais marcadores. Porém observa-se com frequência a ocorrência de DL entre marcadores situados em cromossomos distintos e/ou distantes no mesmo cromossomo, assim como ausência de DL entre marcadores próximos. Deve ser observado que DL não se restringe à proximidade física, mas também pode ser reflexo de outros fatores, tais quais miscigenação e estruturação populacional (Pffaf *et al.* 2001). A ausência de DL pode ser explicada por decaimento de desequilíbrio de ligação, ocorrendo após a miscigenação ao longo das gerações (Pffaf *et al.* 2001), ou por este marcador estar localizado em um *hotspot*, isso é, uma região com altas taxas de

recombinação (Myers *et al.* 2005). Além disso, também foi proposto que a baixa frequência alélica populacional (menor que 5%), não apresenta força estatística suficiente para detectar DL (Goddard *et al.* 2000; Lewontin 1995).

Marcadores genéticos que podem sinalizar a ocorrência de determinados fenótipos têm recebido uma atenção especial, porque, podem estar relacionados com a variabilidade fenotípica entre os indivíduos e entre populações. A variabilidade genética do gene *SLC45A2* vem sendo estudada, uma vez que a proteína por ele codificada aparentemente desempenha função relevante na síntese de melanina (Ang *et al.* 2012; Park *et al.* 2012; Beleza *et al.* 2012; Bonfim 2012; Sturm 2009; Pulker *et al.* 2007; Soejima e Koda 2007; Tully 2007). Genes como este, que influenciam na pigmentação, estão sendo utilizados para estimar a origem geográfica dos indivíduos, uma vez que as diferenças na pigmentação são mais evidentes entre pessoas de diferentes ancestralidades (Leite 2012; Bonfim 2012; Bouakaze *et al.* 2009; Frudakis 2008; Branicki *et al.* 2007).

#### *A constituição da população humana brasileira*

Historicamente, a constituição da população brasileira atual deve-se a miscigenação de três grupos ancestrais principais: europeus, ameríndios e africanos. As diferenças na distribuição de genótipos nessas populações e a proporção com que cada uma contribuiu para a formação da população brasileira, tiveram como reflexo, diferenças regionais no povoamento do Brasil. Portanto, a atual constituição populacional do Brasil decorre diretamente do processo de colonização do país associado as imigrações e migrações internas.

Á época da chegada dos portugueses, os nativos da região, denominados de indígenas, já habitavam o território brasileiro há pelo menos 12 mil anos, o tamanho da população ameríndia foi estimado variando em 1 a 10 milhões de indivíduos (Fundação Nacional do Índio – FUNAI), segundo dados do IBGE (2000), viviam no Brasil aproximadamente 2,4 milhões de ameríndios. A hipótese mais recente sobre a origem asiática dos ameríndios baseia-se na análise de 8,8 Kb do DNA mitocondrial de ameríndios da América do Sul, que sugerem a migração da Ásia através do estreito de Bering em uma única onda migratória há cerca de 12.000 - 19.000 anos (Silva *et al.* 2002, 2003). Os ameríndios permaneceram isolados durante vários séculos originando assim, grupos bastante homogêneos do ponto de vista cultural e linguístico (Fausto 1998).

O fluxo de europeus para o Brasil se iniciou em 1500 com a chegada dos primeiros navios portugueses, dando início à história oficial do nosso país. Em resumo, a colonização europeia inicial foi constituída, principalmente, por indivíduos do sexo masculino sendo que a entrada de mulheres europeias foi insignificante. Até 1808, com a abertura dos portos brasileiros, os portugueses que vieram para o Brasil representavam um contingente de aproximadamente 500.000 indivíduos (Ribeiro 1995). O contato português, pacífico em alguns casos e hostil em outros, gerou miscigenação e a redução drástica da população ameríndia brasileira para, de acordo com o Censo 2010, estimados 821.501 indivíduos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE), isto é, aproximadamente 0,43% da população do país. Diversas etnias foram extintas, seja por morte de todos os membros ou pela incorporação a população brasileira, o que reflete hoje na contribuição genética observada na população atual (Santos e Guerreiro 1995).

Além dos europeus, o Brasil teria recebido cerca de quatro milhões de escravos africanos entre os anos de 1600 a 1870, o que compreende 40% do total de africanos que foram introduzidos nas Américas neste período. Os negros provinham de diversas regiões da África, predominando Angola, Congo e Moçambique (Curtin 1969). Na América, eles apresentaram várias formas de resistência como brigas, suicídio, agressão aos senhores de escravos e especialmente, a fuga e concentração em locais de difícil acesso. Esse último caso deu origem às comunidades isoladas geográfica e culturalmente denominadas no Brasil de *Quilombos* ou *Mocambos* (Vila Real 1996).

O IBGE responsável pela realização do Censo Demográfico brasileiro utiliza o critério de autodeclaração de cor de pele para a classificação do indivíduo e reconhece cinco categorias, que são: Branco, Preto, Amarelo, Pardo e Indígena. De acordo com a Pesquisa Nacional de Dados Domiciliar (PNDA), realizada em 2010 pelo IBGE, 51% dos mais de 190 milhões de brasileiros devem ter indicações morfológicas de contribuição africana (autodefinidos como negros e pardos, de acordo com a nomenclatura utilizada no levantamento). E ainda, esses grupos têm distribuição heterogênea no território Brasileiro (Figura 1).

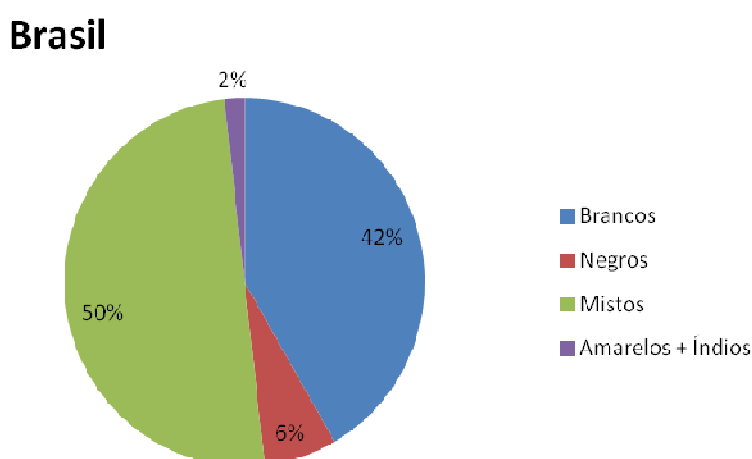


Figura 1. Percentual da população brasileira por categoria de cor de pele, seguindo a nomenclatura do IBGE. Dados da pesquisa domiciliar de 2010.

Mais de 2000 comunidades com o perfil de ancestralidade de escravos africanos foram registradas no Brasil, distribuídas por todas as regiões. São comunidades rurais cuja história e tradições se identificam como antigos *Quilombos* (Anjos 2006). Ainda que possuam diferentes histórias desde suas fundações no século passado, os quilombos e outras populações afrodescendentes, como Salvador, por exemplo, mantem uma contribuição genética africana e cultural maior que as comunidades brasileiras não afrodescendentes (Amorim *et al.* 2011; Abe-Sandes 2002; Lima 2002). Por isso, espera-se que essas comunidades apresentem uma coloração de pele mais escura que as demais.

Com relação aos estudos de genética de populações que envolvem a análise de populações ditas vulneráveis, como ameríndias e quilombolas, é interessante notar a proximidade e dependência cada vez maior dos centros urbanos. Portanto, estas estão cada vez mais expostas aos efeitos da miscigenação e migração, provocados pelo fluxo gênico que vem se intensificando com o passar do tempo, ocasionando perda do patrimônio antropológico e genético dessas comunidades (Amorim *et al.* 2011; Ribeiro 2009; Gontijo 2008; Pedrosa 2006; Oliveira *et al.* 2005). Esse patrimônio caracteriza os indivíduos e as populações, e por isso é de grande importância que sejam estudadas o quanto antes, em uma tentativa de ainda resgatar ao menos uma parte relevante da história da formação da população brasileira (Amorim *et al.* 2011; Ribeiro 2009; Gontijo 2008; Pedrosa 2006; Oliveira *et al.* 2005).

As populações quilombolas analisadas neste trabalho, também foram estudadas com relação à composição populacional, acessada a partir da análise de marcadores genéticos clássicos e moleculares autossômicos e uniparentais. As estimativas de ancestralidade genética estão listadas na Tabela 1.

De forma geral, os resultados da análise de contribuição das populações parentais na formação das populações quilombolas, indicaram uma grande contribuição da parental africana e contribuições variáveis das parentais ameríndia e europeia. Para os marcadores STRs (do inglês, *Short Tandem Repeats*) e AIMs, a contribuição africana é maior em todas as comunidades quilombolas, com exceção de marcadores STRs em Sacutiaba, onde mostrou maior contribuição europeia (Pedrosa 2006; Ribeiro 2005).

Outra diferença significativa ocorre entre as estimativas obtidas para marcadores mitocondriais e do cromossomo Y: a contribuição materna europeia é nula na formação dessas comunidades e a paterna europeia é maior que a ameríndia (Ferreira 2006; Ribeiro 2009). Tal discrepância se explica por razões históricas, já que houve desde o início da colonização, reprodução direcional entre homens europeus e mulheres ameríndias e africanas (Alencastro 2000).

#### *Evolução da cor da pele*

As bases genéticas da variação normal da pigmentação da pele tem despertado grande interesse na comunidade científica (Leite 2012; Ang *et al.* 2012; Beleza *et al.* 2012; Bonfim 2012; Lucotte *et al.* 2011; Valenzuela *et al.* 2010; Spichenok *et al.* 2010; Tully 2007; Soejima e Koda 2007; Yuasa *et al.* 2006; Sturm 2006). Um dos maiores complicadores neste tipo de análise é a dificuldade de associação entre fenótipo e genótipo, decorrentes principalmente, da relevante contribuição ambiental na definição desta característica (Sturm e Larsson 2009; Tully 2007).

Tabela 1. Estimativa de mistura étnica em comunidades quilombolas: Kalunga – Mocambo – Rio das Rãs – Sacutiaba, para diferentes marcadores.

Comunidade	Tipo de Marcador	Estimativa de contribuição (%)			Referência
		Ameríndia	Africana	Europeia	
Kalunga - GO	Mitocondriais	13,3	86,7	0,0	Oliveira <i>et al.</i> 2005
	STRs	3,33	57,38	39,29	Pedrosa 2006
	AIMs	9,18	61,05	29,77	Pedrosa 2006
	STR-Y	6,00	27,00	67,00	Ribeiro 2005
Mocambo - SE	Mitocondriais	21,40	78,6	0,00	Oliveira <i>et al.</i> 2005
	STRs	13,62	46,57	39,81	Pedrosa 2006
	AIMs	18,81	43,42	37,77	Pedrosa 2006
	STR-Y	7,00	7,00	86,00	Ribeiro 2005
Rio das Rãs - BA	Mitocondriais	14,00	86,00	0,00	Oliveira <i>et al.</i> 2005
	STRs	3,43	53,88	42,69	Pedrosa 2006
	AIMs	8,66	60,56	30,78	Pedrosa 2006
	STR-Y	0,00	38,00	62,00	Ribeiro 2005
Sacutiaba - BA	Mitocondriais	15,4	84,6	0,00	Oliveira <i>et al.</i> 2005
	STRs	0,61	35,08	64,31	Pedrosa 2006
	AIMs	2,73	53,94	43,33	Pedrosa 2006
	STR-Y	0,00	5,00	95,00	Ribeiro 2005

Estudar a evolução do homem e sua dispersão ao longo do tempo, além de fornecer conhecimento acerca de sua história, permite também uma melhor compreensão da base genética dos fenótipos observados atualmente, tais como o surgimento da variação da pigmentação da pele. Muitas hipóteses têm sido propostas para explicar a evolução da pigmentação da pele em humanos, tendo em conta a relação entre os dados observados de melanina e a latitude. Segundo a maioria dos autores, o fator que explica a distribuição geográfica de pigmentação da pele em humanos, parece ser a exposição à radiação ultravioleta (RUV). A melanina atua como um filtro da luz solar natural, e é especialmente eficaz para a proteção contra os efeitos da radiação eletromagnética de comprimento de onda curto (280-400 nm), que são as mais prejudiciais para o DNA e proteínas (Beleza *et al.* 2012; Parra 2011).

Foi proposto que, os primeiros membros da linhagem de homínídeos tinham a pele despigmentada ou levemente pigmentada coberta por pelos. Os pelos protegem a pele contra danos da RUV, pois absorvem um comprimento de onda mais curto da radiação solar (Walsberg 1988). Sugeriu-se que estes primeiros homínídeos exibiam corpos e cérebros relativamente maiores em relação aos seus predecessores (McHenry e Berger 1998; Ruff *et al.* 1997, 1993). O aumento do nível de suas atividades e da radiação solar diária teria resultado em um maior sucesso dos indivíduos com menor quantidade de pelos no corpo e com uma alta densidade de glândulas sudoríparas exócrinas, que facilitavam a perda de calor e contribuía no processo de regulação de temperatura corporal (Jablonski e Chaplin 2000; Wheeler 1984). Portanto, com a perda dos pelos, a pigmentação escura da pele foi selecionada, pois confere maior proteção à RUV.

McEvoy e colaboradores (2006) apresentaram um modelo evolutivo da arquitetura genética da pigmentação humana para as populações Africana, Asiática e



Europeias, conforme ilustra a Figura 2, com base na análise de 77 genes candidatos para a pigmentação da pele. Este modelo simula uma árvore populacional para a evolução de pigmentação da cor da pele, partindo de um ancestral comum que provavelmente tinha pele clara em decorrência da camada protetora de pelos que cobriam todo o corpo. Ainda de acordo com o modelo, houve seleção para o escurecimento da pele e este evento coincide com a perda de pelos na linhagem que conduz ao *Homo sapiens*. Além disso, o modelo propõe que a diferenciação da cor da pele entre asiáticos e europeus provavelmente resultou de mecanismos genéticos diferentes e, portanto, não evoluiu antes da separação destas populações. Isto levou à identificação de alguns genes como fortes indicativos da evolução da pigmentação de pele na população asiática e europeia: genes como *ADAMI7*, *ADAMTS20*, *SLC24A5* e *SLC45A2* (McEvoy *et al.* 2006).

A síntese de melanina protege a pele contra a radiação ultravioleta, particularmente em áreas da pele com alta exposição à luz solar. A melanina é capaz de absorver radiação eletromagnética no comprimento de onda UV, protegendo assim o DNA, proteínas e outras macromoléculas dos efeitos nocivos desses raios e garantindo a integridade da termorregulação (Rees 2003). Por exemplo, o folato que é extremamente sensível a RUV, ele é necessário à síntese e reparo do DNA, e a deficiência deste pode levar a complicações durante a gravidez e uma infinidade de anomalias fetais, incluindo defeitos do tubo neural, como espinha bífida e anencefalia (Rees 2003), além de desempenhar um papel fundamental na espermatogênese (Jablonski e Chaplin 2000). Alterações em nível molecular deste tipo de macromoléculas sugerem que, em áreas geográficas com alta incidência de RUV, os indivíduos de pele clara sofrem maior deficiência de folato àqueles de pele escura (Jablonski e Chaplin 2000).

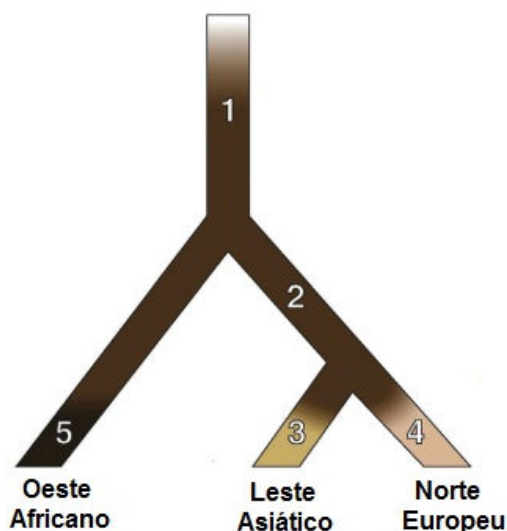


Figura 2. Modelo evolutivo da arquitetura genética da pigmentação humana em três populações: Africana, Asiática e Europeia. Adaptado de McEvoy *et al.* 2006.

Os seres humanos apresentam uma grande variabilidade quanto à pigmentação da pele, tanto intrapopulacional como interpopulacional, sendo mais relevante, a observada entre populações, especialmente entre continentes. Essa diversidade é derivada da interação entre fatores genéticos e ambientais, que influenciam fortemente a definição da cor da pele, e mostram correlação com a localização geográfica das populações (Stokowski 2007), como mostrado na Figura 3. E ainda, está intimamente relacionado com a incidência dos RUV (Walter 1971).

Diferenças na pigmentação são mais evidentes entre pessoas de diferentes ancestralidades genéticas. Portanto, variações nos genes de pigmentação vêm sendo utilizadas como ferramentas para determinação da ancestralidade dos indivíduos (Leite 2012; Ang *et al.* 2012; Bonfim 2012; Bouakaze *et al.* 2009; Frudakis 2008; Chiabai 2008; Bomfim 2008; Branicki *et al.* 2007).

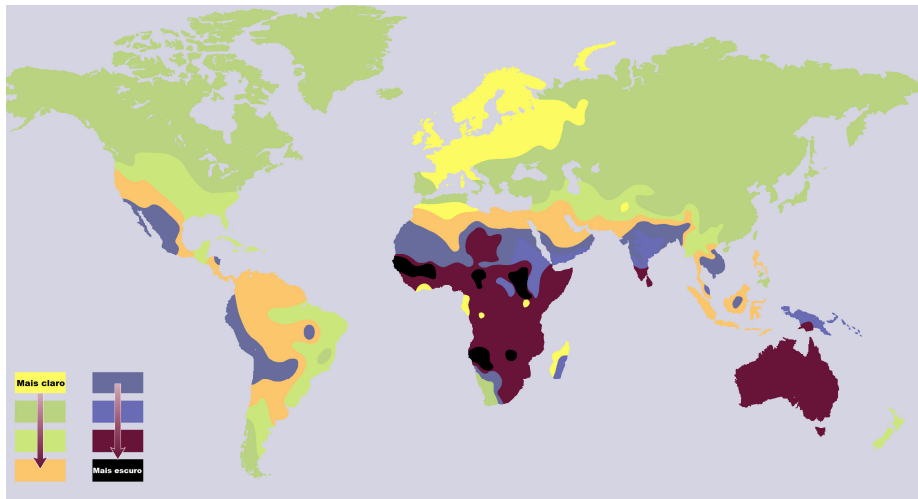


Figura 3. Padrão de distribuição global da cor da pele. Adaptado de Jobbling 2004.

Infere-se que a pigmentação da pele representa uma adaptação à variação geográfica da radiação solar em função da incidência de RUV. Observa-se que em ambientes caracterizados por elevada incidência de RUV (baixas latitudes) a pele negra oferece maior proteção, enquanto regiões onde a incidência não é tão alta (elevadas latitudes) há predominância da pele clara (Soejima e Koda 2007).

Embora os efeitos dos RUV na pele sejam geralmente prejudiciais, há uma importante exceção: sua incidência é essencial para a síntese da vitamina D na pele. Embora algumas fontes de nutrientes tenham quantidades substanciais de vitamina D, a síntese cutânea é a principal fonte (Holick 2003). A vitamina D desempenha um papel chave no metabolismo do tecido ósseo, sua deficiência causa raquitismo em crianças e osteomalacia em adultos. Atualmente, têm-se reconhecido outras funções para esta vitamina, incluindo imunorregulação e regulações na diferenciação e proliferação celular (Parra 2011).

A distribuição moderna da variação na pigmentação da pele humana representa uma relevante hipótese na explicação da influência de síntese da vitamina D como

resultado de um equilíbrio entre, a seleção natural que favorece a proteção contra queimaduras solares e a destruição de folato em regiões com elevada incidência de RUV. A seleção favorece a despigmentação em regiões distantes do Equador, facilitando a síntese de vitamina D. Por exemplo, uma pessoa de pele escura requer exposição à luz solar pelo menos dez vezes maior que uma pessoa de pele clara para produzir a mesma quantidade de vitamina D (Jablonski e Chaplin 2000).

Deve-se mencionar que há outras hipóteses para explicar a distribuição de pigmentação da pele. Wassermann (1965) relaciona a pigmentação escura com a resistência às infecções bacterianas, parasitárias e virais. Post e colaboradores (1975) relataram que a despigmentação pode gerar resistência a danos ao frio. Além disso, Aoki (2002) aponta evidências de que a pigmentação é um critério importante para a seleção de parceiros em humanos, levando alguns autores a postular que a seleção sexual tem sido um fator importante na distribuição da pele. Evidências genéticas sugerem que indivíduos com pele mais pigmentada nos primeiros membros do gênero *Homo* tiveram maior sucesso reprodutivo, a datação de um evento de seleção foi estimada em cerca de 1,2 milhões de anos (Rogers *et al.* 2004).

### *Biologia da pigmentação*

A biologia da pigmentação da pele é determinada pela interação de três pigmentos ou cromóforos: melanina, hemoglobina e, em uma escala muito menor, carotenóides provenientes da dieta. No entanto, as diferenças observadas são resultantes principalmente do conteúdo e distribuição de melanina na pele (Rees 2003).

A melanina é uma substância sintetizada a partir da oxidação enzimática do aminoácido tirosina, sendo que sua produção ocorre dentro de organelas denominadas melanossomos e em células especializadas, denominadas melanócitos, que se localizam na junção entre a epiderme e a derme. Variações na coloração de pele e cabelos, observadas em diferentes regiões geográficas, resultam da produção, distribuição e quantidades de dois tipos de melanina: a eumelanina, um pigmento castanho/preto, e a feomelanina, pigmento vermelho/amarelo (Gerstenblith *et al.* 2007; Rana *et al.* 1999), ambos produzidos na via da biossíntese de melanina, a partir da tirosina com a atuação de diversas enzimas (Figura 4).

Na pele, os melanossomos são depositados nos queratinócitos, células adjacentes aos melanócitos (Sturm 2009; Pulker *et al.* 2007; Tully 2007). Considera-se, em geral, que peles mais pigmentadas contêm partículas melanossomais maiores e mais numerosas, enquanto a despigmentação está associada com melanossomos menores e menos abundantes. Essas partículas são agregadas em torno do núcleo, e proporcionam proteção contra os efeitos nocivos da RUV (Yamaguchi *et al.* 2007). A Figura 5 mostra um esquema da arquitetura da pele clara e escura e a profundidade de penetração da RUV nesses dois tipos de coloração de pele.

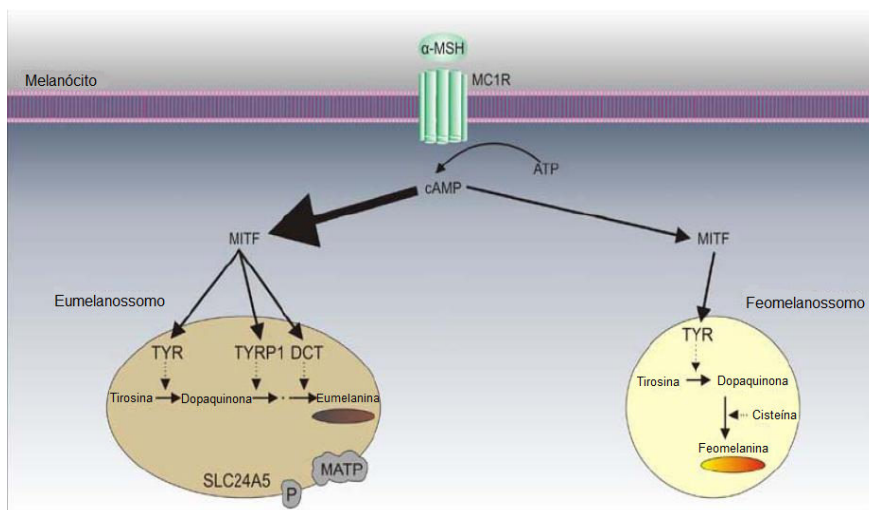


Figura 4. Via metabólica da biossíntese de eumelanina/feomelanina a partir da tirosina, mostrando a atuação dos diversos genes/enzimas. Adaptado de Bouakaze *et al.* 2009.

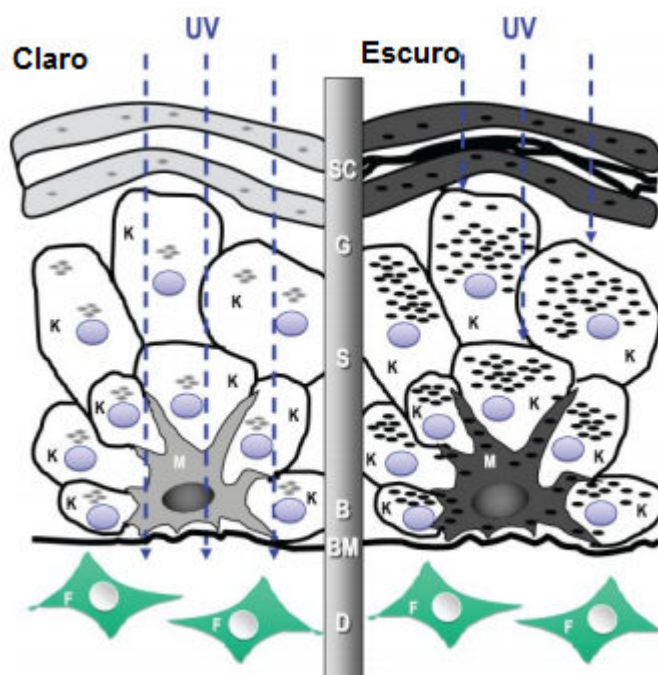


Figura 5. Esquema da arquitetura da pele clara e escura. BM, membrana basal; D, derme; Tipos celulares: K, queratinócitos; M, melanócitos; F, fibroblastos; formas ovais, melanossomos Adaptado de Yamaguchi *et al.* 2007.

## Genética da Pigmentação

O conhecimento da base genética da variação da pigmentação normal da nossa espécie ainda é muito incompleto, apesar de sua importância fisiológica e evolutiva (Barsh 2003). Investigações de desordens da pigmentação humana, tais como albinismo, combinados com estudos de pigmentação em modelos animais têm aumentado muito o nosso conhecimento do sistema pigmentário e gerado uma nova compreensão dos genes envolvidos na produção e na regulação da melanina (Park *et al.* 2012; Parra 2011). Dentre estes, os considerados de maior importância incluem os genes (Parra 2011):

a) que codificam o complexo enzimático tirosinase (*TYR*, *TRP1* e *DCT*), que está localizado na membrana dos melanossomos e causa a conversão enzimática do aminoácido tirosina em melanina;

b) que codificam outras proteínas localizadas dentro dos melanossomos, que têm um papel importante na melanogênese (*SLC45A2*, *OCA2*, *SILV* e *SLC24A5*);

c) envolvidos na regulação da síntese de melanina, incluindo hormônios e receptores ( *$\alpha$ -MSH*, *MC1R*, *ASIP* e *ATRN*);

d) que codificam os fatores de transcrição envolvidos na produção de melanina (*PAX3*, *MITF* e *SOX10*);

e) que codificam proteínas envolvidas no transporte e na construção de melanossomos (*MYO5A*, *MYO7A*, *RAB27A*, *CHS1* e *HPS1-6*),

f) que codificam os receptores (*KIT* e *ENDRB*) e ligantes (*EDN3* e *KITLG*) regulando a migração e diferenciação de melanoblastos.

A Figura 6 mostra um melanócito, indicando alguns dos genes envolvidos no processo de pigmentação. Dada a herança poligênica da pigmentação e a complexidade do processo, tem sido muito difícil identificar os genes responsáveis pela variação na

pigmentação da pele, do cabelo e da íris. No entanto, a situação se alterou na última década, é crescente a descoberta de genes associados com a variação normal na pigmentação. Na literatura, estimam-se cerca de 120 genes envolvidos com a produção, distribuição e secreção da melanina pelos melanócitos, contribuindo com o processo da pigmentação da pele humana (Ang *et al.* 2012; Parra 2011; Spichenok *et al.* 2010; Bouakaze 2009; Tully 2007; Branicki *et al.* 2007).

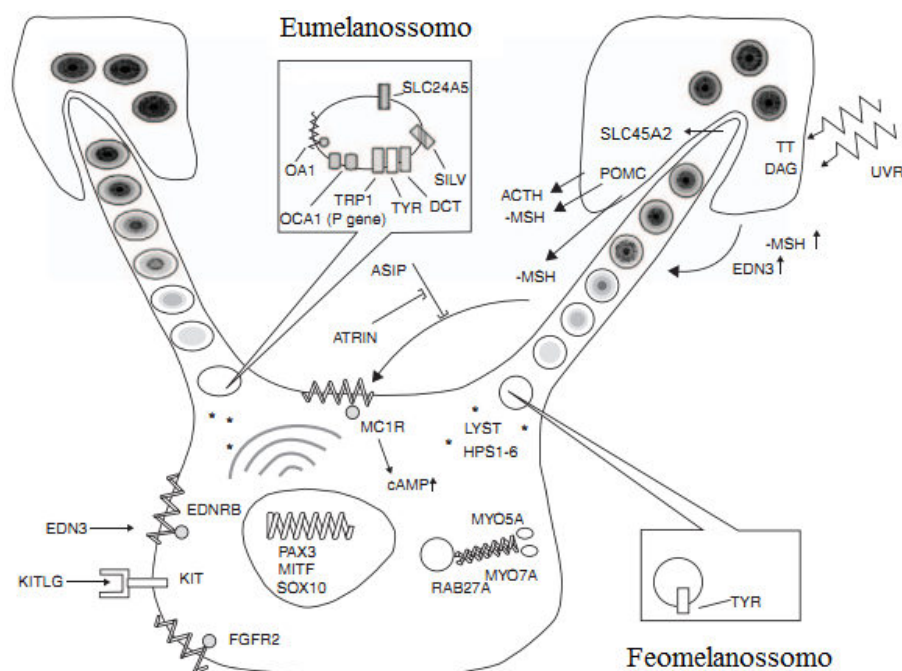


Figura 6. Representação de um melanócito indicando parte dos genes envolvidos no sistema de pigmentação. Adaptado de Parra 2011.

O gene *SLC45A2* (*solute carrier family 45, member 2*), localizado na região cromossômica 5p13.3, apresenta sete éxons que abrangem 40 kb e codificam os 530 aminoácidos da proteína MATP (do inglês, *Membrane-Associated Transporter Protein*). Essa desempenha importante função na síntese de melanina, atuando como transportador de membrana e direcionando o fluxo das proteínas melanossomais



(tirosinases) ao melanossomo (Tully 2007; Yuasa *et al.* 2006). Quando alterada, MATP é responsável pelo albinismo óculo-cutâneo tipo 4 (OCA4) (Park *et al.* 2012; Soejima e Koda 2007). Mutações neste gene, como c.478G>C (p.D160H), podem causar a redução da quantidade de melanina e interferir na codificação de proteínas de transporte de membrana (Park *et al.* 2012; Kushimoto *et al.* 2003; Fukamachi *et al.* 2001; Harada *et al.* 2001; Newton *et al.* 2001).

Determinadas mutações na região codificante do gene *SLC45A2* mostram diferença de frequência entre populações, assim como associação/correlação com variações na cor da pele. Por exemplo, para o SNP rs16891982, foram observadas altas frequências do alelo G em indivíduos sul africanos e alemães, classificados como brancos, e ausência em indivíduos não brancos (Yuasa *et al.* 2006; Nakayama *et al.* 2002). Contudo, o alelo C é mais comum em populações com predominância de indivíduos classificados como negros e em populações não brancas (Graf *et al.* 2005).

## OBJETIVOS

### *Objetivo Geral*

Avaliar a variação do gene *SLC45A2* e a associação desta variação com a cor da pele e ancestralidade genética africana em quilombos brasileiros

### *Objetivos específicos*

- ✓ Caracterizar quatro quilombos brasileiros - Kalunga, Sacutiaba, Mocambo e Rio das Rãs – com relação a marcadores genéticos do tipo SNPs situados no gene *SLC45A2*;
- ✓ Avaliar o desequilíbrio de ligação entre esses marcadores nessas populações;
- ✓ Avaliar a diferenciação genética entre os quilombos com base nesses marcadores;
- ✓ Avaliar se a distribuição populacional da cor da pele nos quilombos é distinta daquela observada na população brasileira como um todo e nos estados em que os quilombos estão localizados;
- ✓ Analisar ocorrência de associação entre classificação fenotípica e os genótipos e haplótipos dos SNPs;
- ✓ Analisar ocorrência de associação entre os alelos e genótipos dos SNPs do gene *SLC45A2* e as estimativas de ancestralidade individual;
- ✓ Analisar ocorrência de associação entre os haplótipos dos SNPs do gene *SLC45A2* e as estimativas de ancestralidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Amostra Populacional*

Foram analisadas amostras de 262 indivíduos saudáveis com mais de 18 anos de idade, de ambos os sexos, obtidas de moradores de quatro quilombos, descritos abaixo: Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba. Em todos os casos, as amostras selecionadas foram de pessoas não aparentadas entre elas (grau de parentesco máximo aceitável = 1/16). A localização geográfica dessas populações, a estimativa do tamanho populacional e o tamanho das amostras utilizadas neste trabalho estão indicados na Figura 7 e na Tabela 2.

*Kalunga*, localizada no nordeste do Estado de Goiás, é um dos maiores quilombos do Brasil (cerca de 5300 habitantes) e com alto destaque histórico da região Centro-Oeste. A comunidade ocupa uma área de aproximadamente 258 mil hectares na zona rural do estado, próxima às cidades de Monte Alegre e Cavalcante, a 320 quilômetros de Brasília.

Sua população é formada por descendentes de escravos que foram levados para a região da atual cidade de Monte Alegre para trabalharem nas “Minas do Tocantins”. De acordo com Soares (1995), escravos teriam fugido das minas no final do século XVIII e formado o quilombo. Entretanto, alguns moradores contam que seus ancestrais foram abandonados pelos bandeirantes quando o ouro das minas acabou e, com receio de serem novamente capturados, eles permaneceram escondidos por várias décadas. Ao longo do tempo, vilas e cidades cresceram nas proximidades da área Kalunga e os quilombolas começaram a manter relações comerciais com os habitantes dos centros urbanos (Meegen-Silva 1999).

*Mocambo* está localizado no município de Porto da Folha em Sergipe, a 190 quilômetros de Aracaju e à margem direita do rio São Francisco. Cerca de 80 famílias com aproximadamente 500 indivíduos ocupam uma área de 93,5 ha e estão distribuídas em duas fileiras de casas paralelas ao rio (Arruti 2006). A chegada dos primeiros escravos em Sergipe aconteceu no século XVII, e ficaram concentrados principalmente na zona açucareira, embora também estivessem envolvidos com a atividade pecuarista. Várias revoltas ocorreram em Sergipe a partir do século XVIII. A fuga foi à maneira mais constante, mas nem todas, culminaram na formação de quilombos (Barreto 1995).

Mocambo localiza-se ao lado da área indígena Xocó. A história desse quilombo está ligada à dessa tribo. Os dois grupos sempre estiveram ligados por um fluxo constante e contínuo de trocas matrimoniais, econômicas e de alianças conjunturais. Um levantamento apontou que dentre as famílias do Mocambo, nove tinham um dos cônjuges de origem indígena, sendo sete deles Xocó (Amorim *et al.* 2011; Arruti 2006).

*Rio das Rãs* está situado à margem direita do médio São Francisco, no município de Bom Jesus da Lapa a 970 quilômetros de Salvador, na Bahia, ocupando uma área de aproximadamente 38.000 hectares (Silva 1997). Sua população foi estimada em 4000 indivíduos em 1998 (Brasileiro e Sampaio 2002).

Não há um consenso quanto à origem da comunidade de Rio das Rãs. A versão mais aceita é que poucas famílias, entre duas e cinco, teriam fundado o quilombo. Supõe-se que os indivíduos que se aquilombaram teriam vindo, em fuga do cativeiro, de Salvador ou Porto Seguro. Na primeira metade do século XIX, um grupo de escravos teria sido deslocado das cidades mencionadas para o sul cafeeiro, através do rio São Francisco. Possivelmente nesse período é que teria ocorrido a ocupação do quilombo (Silva 1997).

*Sacutiaba* está localizada a 97 quilômetros do município de Wanderley, na região oeste do estado da Bahia, às margens do rio Grande, um afluente do rio São Francisco. Sua população é estimada em 209 indivíduos, que apresentam laços de consanguinidade e afinidade centrados na figura de uma matriarca. A origem dos escravos fundadores da comunidade é o norte do estado de Minas Gerais, de onde teriam escapado pelo rio São Francisco, subindo o rio Grande e se instalando em uma região de difícil acesso próxima a uma serra. Acredita-se que os indivíduos que habitam a área tenham chegado há mais de 200 anos (Brasileiro e Sampaio 2002).

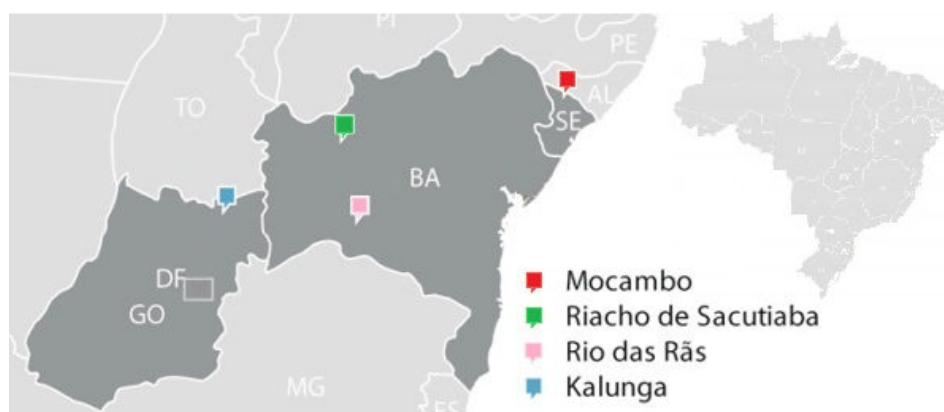


Figura 7. Localização geográfica dos quilombos analisados no presente trabalho.

Adaptado de Gontijo 2008.

Tabela 2. Informação demográfica, estimativas de tamanho populacional e número de indivíduos amostrados das populações afrodescendentes.

População	Latitude	Longitude	Tamanho populacional (estimativa em 2010)	Indivíduos amostrados
Kalunga	13 <sup>0</sup> 41'S a 13 <sup>0</sup> 51'S	47 <sup>0</sup> 15'W a 47 <sup>0</sup> 42'W	5300	70
Mocambo	9 <sup>0</sup> 45'S	37 <sup>0</sup> 25'W	500	81
Rio das Rãs	13 <sup>0</sup> 41'S a 13 <sup>0</sup> 52'S	43 <sup>0</sup> 20'W a 43 <sup>0</sup> 25'W	4000	81
Sacutiaba	11 <sup>0</sup> 29'S	43 <sup>0</sup> 47'W	209	30

### *Aspectos Éticos*

A análise das amostras dos quatro quilombos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, com número 151/07 (Anexo 1). Todos os voluntários concordaram com sua participação na pesquisa.

### *Análises Laboratoriais*

#### Extração de DNA

As amostras de DNA utilizadas nesse trabalho estavam disponíveis para uso, pois pertencem ao banco de DNA do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. As amostras de sangue venoso foram coletadas utilizando o sistema de coleta à vácuo com tubos contendo EDTA como anticoagulante. O DNA foi extraído das amostras com o kit comercial *Illustra*® da *Amersham*, atualmente *GE Healthcare* segundo instruções do fabricante e quantificado em Nanovue da *GE Healthcare*.

#### Análise de SNPs no gene *SLC45A2*

Foram analisadas seis regiões distintas do gene *SLC45A2*, mostradas na Figura 8, englobando porções da região promotora e codificadora. Dos marcadores analisados, quatro estão em íntrons [rs732740 (íntron 1 T>C), rs181832 (íntron 2 T>C), rs3756462 (íntron 2 T>C) e rs35394 (íntron 5 A>G)] e dois em éxons [rs26722 (éxon 3 T>C; Glu272Lys) e rs16891982 (éxon 5 G<C; Leu374Phe)]. A análise destes marcadores nos mesmos indivíduos permitiu a definição de haplótipos, o que objetivou um maior poder de resolução para identificação de eventuais associações, bem como uma visão da diversidade do gene *SLC45A2* em quase toda sua extensão.

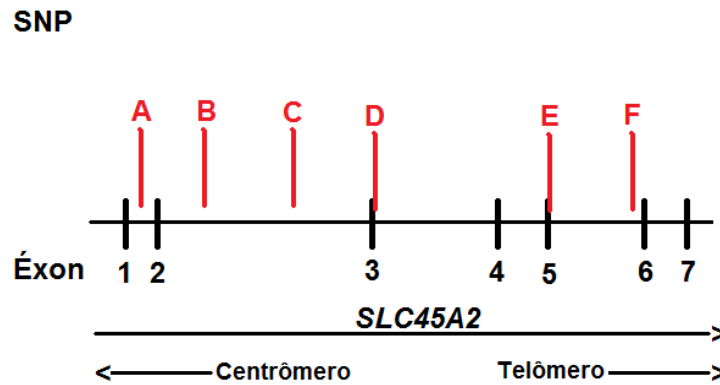


Figura 8. Diagrama do gene *SLC45A2*, com a localização dos éxons (1 a 7) e dos seis SNPs: A-rs732740; B-rs181832; C-rs3756462; D-rs26722; E-rs168919825; e F-rs35394; A seta abaixo do nome do gene mostra a direção da transcrição e as demais setas indicam a direção do centrômero e do telômero.

Para a análise dos marcadores genéticos, os fragmentos de interesse foram amplificados por PCR alelo-específica, para o rs168919825, e por PCR-RFLP para os demais em um termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* da *Applied Biosystems*. As condições foram padronizadas de acordo com a literatura (Soejima *et al.* 2006; Nakayama *et al.* 2002). As concentrações dos reagentes e as condições de PCR estão expostas na Tabela 3 e Tabela 4. Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel vertical de poliacrilamida não desnaturante com glicerol a 10% e corados com nitrato de prata a 1% (Sanguinetti *et al.* 1994). Os marcadores rs732740, rs26722 e rs35394 foram analisados em gel a 12%. O tempo de corrida foi de 3h, com exceção do marcador rs26722 (5h) e a voltagem, 210V. Previamente à eletroforese, os fragmentos foram digeridos por enzimas de restrição específicas (Tabela 5). A sequência de cada iniciador, bem como a região e mutação utilizadas para identificação do SNP e suas respectivas referências estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 3. Concentração dos reagentes nas reações de PCR para os marcadores do gene *SLC45A2*.

Reagentes	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982	rs35394
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup> (μL)	3,0	1,4	1,26	1,8	2,66	2,8
Tampão <sup>b</sup> (μL)	0,5	0,3	0,31	0,3	0,71	0,52
dNTP <sup>c</sup> (μL)	0,05	0,03	0,03	0,03	0,08	0,05
iniciadores <sup>d</sup> (μL)	0,3	0,125	0,25	0,2	0,82	0,41
MgCl <sub>2</sub> <sup>e</sup> (μL)	0,2	0,125	0,13	0,1	0,27	0,2
Taq <sup>f</sup> (5U/μL)	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,02
DNA (μL)	1,0	1,0	1,0	0,5	1,5	1,0

**a:** H<sub>2</sub>O milliQ autoclavada; **b:** tampão com MgCl<sub>2</sub> 2mM fornecido pelo fabricante da Taq DNA Polimerase; **c:** solução de dATP, dTTP, dCTP e dGTP a 5Mm; **d:** solução dos iniciadores forward e reverse a 5μM; **e:** MgCl<sub>2</sub> a 2Mm; **f:** Platinum Taq DNA-polymerase.

Tabela 4. Condições de PCR para cada sistema incluindo ciclos de amplificação.

Condições da PCR	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982	rs35394
T <sup>0</sup> C de pareamento	57 <sup>0</sup>	55 <sup>0</sup>	55 <sup>0</sup>	56 <sup>0</sup>	56 <sup>0</sup>	58 <sup>0</sup>
Tempo no <i>first step</i> de 94 <sup>0</sup> C	5'	5'	5'	5'	5'	5'
Número de ciclos	32	32	32	28	30	32
Tempo em 94 <sup>0</sup> C	30''	30''	30''	1'	1'	30''
Tempo na T <sup>0</sup> C pareamento	30''	30''	30''	1'	1'	30''
Tempo em 72 <sup>0</sup> C	30''	30''	30''	1'	1'	30''
Tempo no final step de 72 <sup>0</sup> C	10'	10'	10'	7'	7'	10'



Tabela 5. Misturas de reagentes para digestão enzimática e condições das reações utilizadas para análise dos RFLP.

Reagentes	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs35394
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup> (μL)	5,5	4,61	4,8	4,71	5,5
Tampão <sup>b</sup> (μL)	1,2	0,9	0,9	0,9	1,2
BSA <sup>c</sup> (μL)	-	0,09	-	0,09	-
Enzima <sup>d</sup>	Msp I	StyI	Tsp 509 I/ Mcl I	Taq I	Msp I
Produto PCR (μL)	5,0	3,0	3,0	3,0	5,0
Temperatura °C	37	65	65	65	37
Tempo (h)	16	16	16	16	16

*a: H<sub>2</sub>O milliQ autoclavada; b: tampão fornecido pelo fabricante; c: BSA fornecida pelo fabricante da enzima de restrição; d: 4U para a Sty I e 3U para as demais.*

Tabela 6. Região de localização, mutação e iniciadores dos SNPs situados no gene *SLC45A2*.

SNPs	Região	Mutação	Iniciadores (5' - 3')
rs732740 <sup>a</sup>	Íntron 1	C/T	GTTCAAAGATGTGGCCTCTGAC GTAGTCAAACGCAGTGCTTCTC
rs181832 <sup>a</sup>	Íntron 2	C/T	TATGTCCAACACCTCCCTTCTC TCTAAGGCCTCCAAGTACTG
rs3756462 <sup>a</sup>	Íntron 2	C/T	AAACGCTTCACGGTGTGCTGA ATTTCCTGGTCAGACCCCATGGA
rs26722 <sup>b</sup>	Éxon 3	C/T	AGAGGTTGCAAAGGGCATTTC CCCATGAAACTCTTCTCGTCAA GAGGTTGGATGTTGGaGCTTG
rs16891982 <sup>b</sup>	Éxon 5	C/G	attatGAGGTTGGATGTTGGGactTC GAAGACATCCTTAGGAGAGAGAAAGAC
rs35394 <sup>a</sup>	Íntron 5	A/G	AGCCAAGTTGACCTGCTAGA TGAAATCACCCAGCTTAATGCC

<sup>a</sup> Yuasa *et al.* 2006; <sup>b</sup> Yuasa *et al.* 2004

### *Análises estatísticas*

Os testes estatísticos foram realizados em três etapas. A primeira etapa, genética populacional, procurou descrever as populações quanto aos SNPs, desequilíbrio de ligação e diferenciação populacional e quanto aos haplótipos. A segunda etapa, referente à cor da pele, comparou o conjunto amostral dos quilombos e dados do IBGE para o Brasil e as regiões brasileiras, depois analisou associação da cor pele e a variação dos SNPs. A terceira etapa, referente ao IAA, analisou associação deste com SNPs e haplótipos.

Análise populacional de quilombos brasileiros com relação a marcadores genéticos situados no gene *SLC45A2*

#### *Análise dos SNPs*

Para a caracterização genética e comparativa das quatro populações quanto ao gene *SLC45A2* para os seis marcadores foi realizada uma série de análises, dentre elas frequências gênicas e genotípicas obtidas por contagem direta utilizando o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer 2010), aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) utilizando o Teste Exato de Fisher, diferenciações gênica e genotípica utilizando a metodologia da cadeia de Markov com o programa GENEPOP v3.4 (Raymond e Rousset 1995). Os gráficos presentes na dissertação foram feitos com o software Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer 2010), através de scripts do pacote estatístico R fornecidos com o programa.

### *Desequilíbrio de Ligação*

Para verificar a ocorrência de desequilíbrio de ligação (DL), definido por uma herança não independente entre dois ou mais marcadores, foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer 2010).

### *Diferenciação populacional ( $F_{st}$ )*

Para análise de diferenciação populacional foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer 2010) e essa diferenciação foi baseada em  $F_{st}$  para populações quilombolas brasileiras analisadas.

### *Análises haplotípicas*

Para a análise haplotípica utilizou-se o *software online SNPstats*, encontrado no site [http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats\\_web](http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web) acessado em 1/08/2013, que emprega o algoritmo EM (Solé *et al.* 2006).

### *Diferenciação populacional ( $F_{st}$ )*

Para análise de diferenciação populacional baseada em haplótipos, foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer 2010).

## Análise de associação entre a classificação fenotípica com relação ao gene *SLC45A2*

### *Classificação fenotípica x Dados do IBGE*

Na época da visita as comunidades quilombolas, os pesquisadores classificaram os indivíduos quanto a cor da pele, de acordo com as classes utilizadas pelo IBGE: branco, negro, amarelo e misto. No caso dos mistos foi adicionada a informação quanto às origens da mistura observada: branco e negro, branco e amarelo e negro e amarelo.

Foram analisados o perfil das populações com relação à cor da pele e uma comparação com a população brasileira e os respectivos estados onde os quilombos se localizam e para isso foi utilizado Teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Os dados observados são os números de indivíduos nas populações quilombolas, e os dados esperados são os percentuais de indivíduos daquela região vezes o número amostral da população quilombola como mostra a Tabela 7.

### *Classificação fenotípica x SNPs*

Para analisar se houve associação entre classificação fenotípica cor de pele e genótipos e alelos do gene *SLC45A2*, foi utilizado o Teste Exato de Fisher e *Odds ratio* (OR). Para essa análise foram considerados todos os indivíduos analisados, independente de qual quilombo o mesmo pertence. Isso é, a partir dessa análise, não foram consideradas as populações e sim o fato de que os indivíduos compõem um grupo com ancestralidade africana predominante.

Tabela 7. Quantidade (*n*) e proporção (%) de indivíduos quanto à cor de pele no Brasil e nos estados brasileiros de acordo com IBGE.

Região	Branços		Negros		Mistos		Amarelos + Índios		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Brasil	90.621.281	41,68	14.351.162	6,53	82.820.452	50,01	2.926.854	1,78	190.755.799	100
Bahia	3.110.605	22,20	2.397.249	17,10	8.293.057	59,16	215.306	1,54	14.016.217	7,35
Goiás	2.502.119	41,68	391.918	6,53	3.002.673	50,01	107.011	1,78	6.003.721	3,15
Sergipe	583.428	28,21	184.054	8,90	1.269.656	61,39	30.927	1,50	2.067.974	1,08

## Análise de associação entre o Índice de Ancestralidade Africana com relação ao gene *SLC45A2*

### *IAA x SNPs*

Os indivíduos pertencentes a população Rio das Rãs foram excluídos dessa análise por não terem disponibilidade de dados de Índice de Ancestralidade Africana individual (IAA). Portanto, essa análise foi realizada para as populações de Kalunga, Mocambo e Sacutiaba (Gontijo, Comunicação pessoal).

As estimativas do IAA foram obtidas utilizando o *software* Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000), que utiliza um método de agrupamento baseado em dados genotípicos para inferir a estrutura populacional e a ancestralidade individual. Os genótipos individuais foram obtidos de 108 AIMS (Gontijo, comunicação pessoal) a partir de três multiplex: Sistema 34-plex, formado por 34 SNPs autossômicos com alto poder de predição de ancestralidade individual (Phillips *et al.* 2007), Sistema PIMA-plex formado por 28 SNPs autossômicos com alto  $\delta$  entre populações ameríndias e não ameríndias (Phillips *et al.* 2007) e AIM-Indelplex formado por 46 marcadores *Indels* com  $\delta > 0,40$  entre pelo menos dois grupos (Pereira *et al.* 2012). O índice de IAA variou de 0,10 a 0,79 da amostra, com a maioria dos indivíduos entre 0,30 a 0,69 (Figura 9). A maioria dos indivíduos foram classificados como mistos e negros 55 e 33%, respectivamente (Figura 10).

A análise de associação entre IAA e a classificação fenotípica cor de pele mostrou que os indivíduos classificados como negros são os que apresentam os maiores valores para IAA. Pode-se observar no *boxplot* que apenas dois indivíduos apresentaram um IAA desviando do padrão (Figura 11). Os indivíduos classificados como mistos, apresentaram um IAA intermediário aos indivíduos classificados como negros e brancos, abrangendo quase todo o box.

Já os indivíduos classificados como brancos apresentaram valores de IAA mais baixo que os indivíduos classificados como negros e mistos. Observamos que apenas um indivíduo apresentou um desvio quanto ao esperado. O Teste de *Kruskal Wallis* mostrou que a variação do IAA é diferente entre as classes fenotípicas ( $\chi^2 = 40.2351$ ;  $DF = 2$ ;  $p = 1,83 e^{-09}$ ).

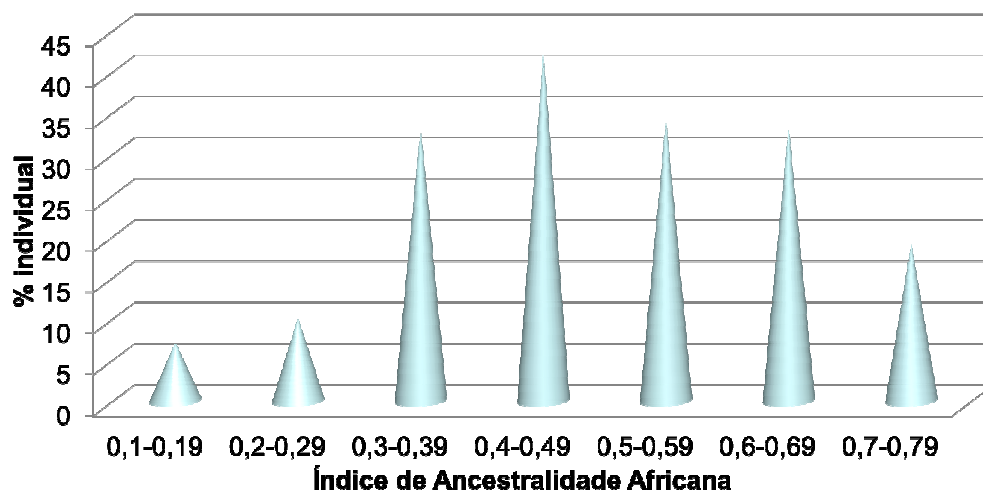


Figura 9. Distribuição dos indivíduos de acordo com o Índice de Ancestralidade Africana individual em quilombolas.

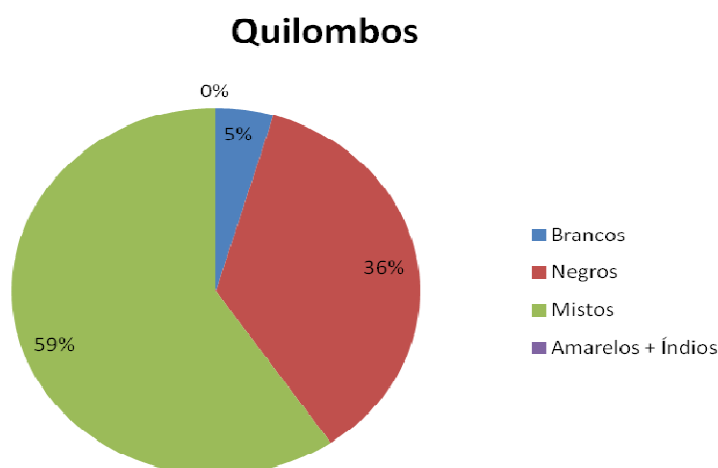


Figura 10. Representação dos indivíduos quilombolas nas classes fenotípicas de cor de pele de acordo com as categorias do IBGE.

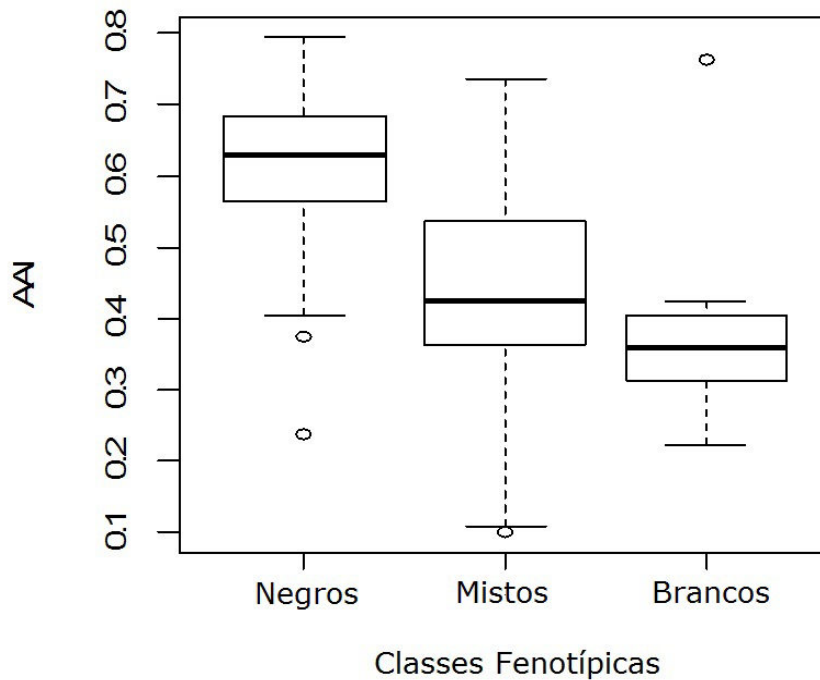


Figura 11. Correlação entre Índice de Ancestralidade Africana e a classificação fenotípica cor de pele em indivíduos quilombolas.

#### *IAA x haplótipos*

As análises de correlação foram usadas para medir a intensidade de associação observada entre duas variáveis (haplótipos e os SNPs como IAA). Para isso, foi utilizado o *software* SNPStats (Solé *et al.* 2006) para avaliar a associação entre SNPs do gene *SLC45A2* e o índice IAA e também entre os haplótipos e o IAA.



## RESULTADOS

### *Análise populacional de quilombos brasileiros com relação a marcadores genéticos situados no gene SLC45A2*

#### *Análise dos SNPs*

As amostras das quatro populações - Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba - foram analisadas para os seis marcadores: rs732740, rs181832, rs3756462, rs26722, rs168919825 e rs35394. A Tabela 8 apresenta as frequências gênicas e genotípicas observadas, número de indivíduos analisados (n), heterozigose observada e esperada, valores de  $p$  e erro padrão obtidos pelo Teste Exato de Fisher para a distribuição dos alelos de acordo com o esperado pelo EHW.

O marcador rs732740 apresentou-se monomórfico em todas as populações. Os demais *loci* apresentaram polimorfismo em todas as populações, exceto o rs3756462 em Sacutiaba. O alelo mais comum de todos os *loci* foi o mesmo nas quatro populações: para os marcadores rs181832, rs3756462 e rs35394 o alelo mais comum foi o T e para rs26722 e rs16891982 foi o alelo C.

Os genótipos de todos os marcadores encontraram-se distribuídos de acordo com o esperado pelo EHW ( $p > 0,05$ ). Apesar disso, em Kalunga, todos os marcadores apresentaram uma heterozigose observada ligeiramente maior do que a esperada. Já em Mocambo, o mesmo ocorreu com dois marcadores: rs181832 e rs16891982 e em Rio das Rãs e Sacutiaba, para o marcador rs181832.

Tabela 8. Frequência alélica e genotípica de seis SNPs situados no gene *SLC45A2* em quatro quilombos brasileiros - Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba - número amostral ( $n$ ), heterozigose observada e esperada e  $p$ -valor dos testes de aderência ao EHW.

População	Marcador	Frequência Alélica		$n$	Frequência Genotípica			Heterozigose		EHW	
		*1	*2		11	12	22	Obs.	Esp.	$p$ -valor	Erro Padrão
Kalunga	rs732740	1,00	-	69	1,000	-	-	-	-	-	-
	rs181832	0,64	0,36	70	0,410	0,460	0,13	0,543	0,462	0,192	0,0004
	rs3756462	0,97	0,03	70	0,940	0,059	0,001	0,057	0,055	1,000	0,0000
	rs26722	0,06	0,94	70	0,003	0,113	0,884	0,128	0,121	1,000	0,0000
	rs16891982	0,81	0,19	70	0,623	0,362	0,014	0,362	0,315	0,438	0,0005
	rs35394	0,88	0,12	70	0,775	0,211	0,014	0,242	0,214	0,582	0,0005
Mocambo	rs732740	1,00	-	80	1,000	-	-	-	-	-	-
	rs181832	0,69	0,31	81	0,477	0,427	0,096	0,444	0,429	0,798	0,0004
	rs3756462	0,99	0,01	81	0,980	0,020	-	0,012	0,012	1,000	0,0000
	rs26722	0,16	0,84	80	0,026	0,269	0,705	0,262	0,265	1,000	0,0000
	rs16891982	0,70	0,30	81	0,490	0,420	0,090	0,430	0,422	1,000	0,0000
	rs35394	0,84	0,16	81	0,705	0,269	0,026	0,222	0,271	0,110	0,0003

Tabela 8. Continuação

População	Marcador	Frequência Alélica		<i>n</i>	Frequência Genotípica			Heterozigose		EHW	
		*1	*2		11	12	22	Obs.	Esp.	<i>p</i> -valor	Erro Padrão
Rio das Rãs	rs732740	1,00	-	81	1,000	-	-	-	-	-	-
	rs181832	0,66	0,34	81	0,436	0,449	0,115	0,530	0,451	0,135	0,0003
	rs3756462	0,96	0,04	81	0,921	0,077	0,002	0,061	0,083	0,126	0,0003
	rs26722	0,07	0,93	81	0,005	0,130	0,865	0,111	0,127	0,304	0,0004
	rs16891982	0,79	0,21	80	0,624	0,332	0,044	0,312	0,335	0,730	0,0005
	rs35394	0,93	0,07	81	0,865	0,130	0,005	0,123	0,138	0,354	0,0005
Sacutiaba	rs732740	1,00	-	30	1,000	-	-	-	-	-	-
	rs181832	0,70	0,30	30	0,490	0,420	0,090	0,533	0,427	0,217	0,0004
	rs3756462	1,00	0,00	30	1,000	-	-	-	-	-	-
	rs26722	0,30	0,70	29	0,490	0,420	0,090	0,379	0,421	0,662	0,0005
	rs16891982	0,73	0,27	30	0,533	0,394	0,073	0,440	0,404	1,000	0,0000
	rs35394	0,78	0,22	30	0,608	0,343	0,049	0,233	0,345	0,101	0,0003

rs732740\*1=T, \*2=C; rs181832 \*1=T, \*2=C; rs3756462 \*1=T, \*2=C; rs26722 \*1=T, \*2=C; rs16891982 \*1=C, \*2=G; rs35394 \*1=T, \*2=C.

### *Desequilíbrio de Ligação*

A Figura 12 mostra as matrizes dos testes de DL para as quatro populações. Em um total de 60 comparações foi observado que 14 pares de *loci* desviaram quanto ao esperado no caso de segregação independente. Foi observado DL estatisticamente significativo para o par de *loci* rs26722 e rs35394 ( $p < 0,05$ ) em todas as quatro populações. O par de *loci* rs181832 e rs16891982 apresentou DL nas populações Kalunga e Rio das Rãs (Figura 12A e 12C). Entre Mocambo e Rio das Rãs, DL foi observado para os pares rs3756462 e rs26722 (Figura 12B e 12C). Além disso, em Mocambo e Sacutiaba os pares de *loci* rs26722 e rs16891982 e entre rs16891982 e rs35394 foram observados em DL (Figura 12B e 12D). Por fim, em Rio das Rãs foi observado DL entre os pares dos *loci* rs181832 e rs3756462 e entre rs3756462 e rs35394 (Figura 12C).

### *Diferenciação populacional (Fst)*

Na Figura 13 estão apresentados os resultados com relação ao *Fst* considerando os marcadores do tipo SNPs situados no gene *SLC45A2* nas quatro populações de quilombos. No Anexo 2 estão apresentados os valores numéricos do *Fst*. Observa-se que a população de Sacutiaba mostrou maior diferenciação populacional com Kalunga e Rio das Rãs e uma diferenciação populacional moderada com Mocambo. Por outro lado, as populações que apresentaram menor diferenciação populacional foram Kalunga e Rio das Rãs.

	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982
rs732740	-				
rs181832	1.0000± 0.0000	-			
rs3756462	1.0000± 0.0000	0.9325±0.0020	-		
rs26722	1.0000± 0.0000	0.1771±0.0039	0.2231±0.0045	-	
rs16891982	1.0000± 0.0000	<b>0.0406±0.0020</b>	0.3107±0.0049	0.9796±0.0013	-
rs35394	1.0000± 0.0000	0.1267± 0.0035	0.4170±0.0044	<b>0.0000±0.0000</b>	0.6329±0.0049

A

	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982
rs732740	-				
rs181832	1.0000± 0.0000	-			
rs3756462	1.0000± 0.0000	1.0000±0.0000	-		
rs26722	1.0000± 0.0000	0.2872±0.0047	<b>0.0421±0.0020</b>	-	
rs16891982	1.0000± 0.0000	0.0857±0.0027	0.1837±0.0036	<b>0.0425±0.0021</b>	-
rs35394	1.0000± 0.0000	0.0549±0.0021	0.1759±0.0036	<b>0.0000±0.0000</b>	<b>0.0070±0.0008</b>

B

	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982
rs732740	-				
rs181832	1.0000±0.0000	-			
rs3756462	1.0000± 0.0000	<b>0.0474±0.0022</b>	-		
rs26722	1.0000± 0.0000	0.7892±0.0037	<b>0.0007±0.0003</b>	-	
rs16891982	1.0000± 0.0000	<b>0.0000±0.0000</b>	0.1109±0.0031	0.2447±0.0045	-
rs35394	1.0000± 0.0000	0.7744±0.0045	<b>0.0004±0.0002</b>	<b>0.0000±0.0000</b>	0.1967±0.0040

C

	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982
rs732740	-				
rs181832	1.0000± 0.0000	-			
rs3756462	1.0000± 0.0000	1.0000±0.0000	-		
rs26722	1.0000± 0.0000	0.8550±0.0036	1.0000±0.0000	-	
rs16891982	1.0000± 0.0000	0.2080±0.0031	1.0000±0.0000	<b>0.0040±0.0007</b>	-
rs35394	1.0000± 0.0000	0.5685±0.0057	1.0000±0.0000	<b>0.0000±0.0000</b>	<b>0.0049±0.0007</b>

D

Figura 12. Matriz de Desequilíbrio de Ligação entre os seis SNPs nas quatro populações: A - Kalunga, B - Mocambo, C - Rio das Rãs e D - Sacutiaba.

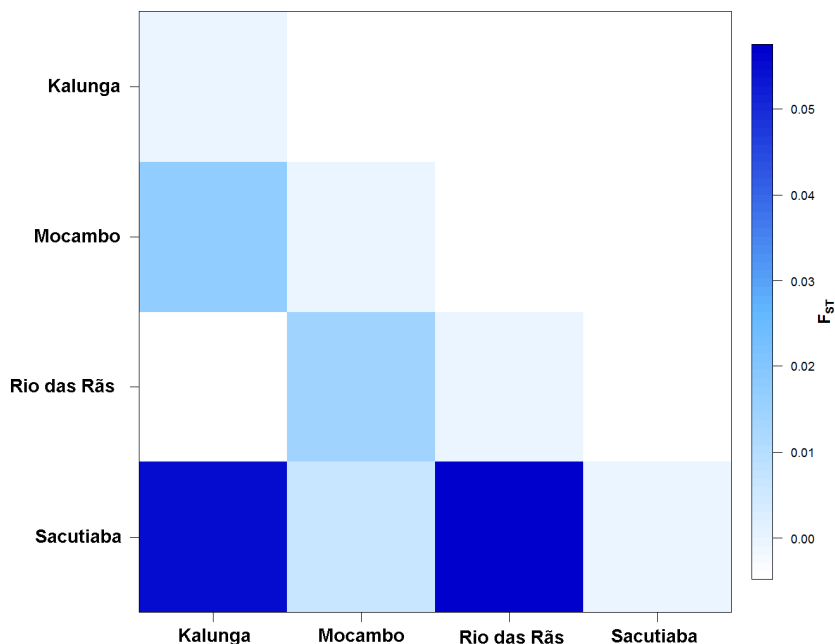


Figura 13. Matriz de diferenciação populacional baseado em  $F_{st}$  para populações quilombolas brasileiras analisadas para os marcadores do gene *SLC45A2*.

#### *Análises haplotípicas*

Para os quatro quilombos, foram estimados 18 haplótipos denominados de 1 a 18, apresentados na Tabela 9 com suas frequências populacionais. O maior número de haplótipos foi observado na população de Mocambo: 11 no total. Em Kalunga e Rio das Rãs foram observados 10 haplótipos, enquanto que em Sacutiaba oito. Os haplótipos 1, 2, 3, 6 e 7 foram observados em todas as populações, sendo que os haplótipos 1, 2 e 3 apresentaram as maiores frequências. Os haplótipos exclusivos foram: 16, 17 e 18 em Kalunga, 5, 10 e 15 em Mocambo e 11, 13 e 14 em Rio das Rãs. Com relação ao compartilhamento de haplótipos, foi observado que o haplótipo 4 é compartilhado entre Kalunga, Mocambo e Sacutiaba; 8 entre Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba; 9 entre Kalunga e Rio das Rãs e 12 entre Mocambo e Sacutiaba.

Tabela 9. Haplótipos do gene *SLC45A2* e suas frequências nas populações Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Sacutiaba.

Haplótipos	SNPs						Frequências			
	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982	rs35394	Kalunga <i>n</i> =70	Mocambo <i>n</i> =81	Rio das Rãs <i>n</i> =81	Sacutiaba <i>n</i> =30
1	T	T	T	C	C	T	0,3467	0,2883	0,4146	0,2284
2	T	C	T	C	C	T	0,3286	0,2286	0,2994	0,1629
3	T	T	T	C	G	T	0,1854	0,2472	0,1809	0,2840
4	T	T	T	C	C	C	0,0396	0,0388	-	0,0199
5	T	T	T	T	C	T	-	0,0215	-	-
6	T	T	T	T	C	C	0,0301	0,0777	0,0218	0,1677
7	T	C	T	T	C	C	0,0286	0,0262	0,015	0,0291
8	T	C	T	T	C	T	-	0,0173	0,0126	0,0865
9	T	T	C	T	C	C	0,0056	-	0,0185	-
10	T	T	C	T	G	C	-	0,0062	-	-
11	T	C	T	C	C	C	-	-	0,0126	-
12	T	C	T	C	G	T	-	0,0366	-	0,0215
13	T	T	C	C	G	T	-	-	0,0185	-
14	T	T	C	C	G	C	-	-	0,0062	-
15	T	T	T	T	G	C	-	0,0117	-	-
16	T	T	C	C	C	T	0,0179	-	-	-
17	T	T	T	C	G	C	0,0124	-	-	-
18	T	T	C	C	C	C	0,0051	-	-	-

*Diferenciação populacional haplotípica (Fst)*

A Tabela 10 mostra o Teste de diferenciação populacional (*Fst*) utilizando os haplótipos. Foi observado que houve diferença significativa entre os haplótipos para as populações Kalunga/Sacutiaba ( $p = 0,00038$ ), Rio das Rãs/Sacutiaba ( $p = 0,00051$ ) e Mocambo/Rio das Rãs ( $p = 0,01692$ ).

Tabela 10. Teste Exato de diferenciação populacional para os haplótipos do gene *SLC45A2* em quatro quilombos brasileiros. Os valores de *Fst* estatisticamente significativos encontram-se em negritos.

	<b>Kalunga</b>	<b>Mocambo</b>	<b>Rio das Rãs</b>
<b>Kalunga</b>	--		
<b>Mocambo</b>	0,12999 ± 0,0100	--	
<b>Rio das Rãs</b>	0,33023 ± 0,0172	<b>0,01692 ± 0,0026</b>	--
<b>Sacutiaba</b>	<b>0,00038 ± 0,0004</b>	0,23011 ± 0,0098	<b>0,00051 ± 0,0003</b>

*Análise de associação entre a classificação fenotípica com relação ao gene SLC45A2**Classificação fenotípica x Dados do IBGE*

A Tabela 11 e a Figura 13 apresentam as comparações dos dados obtidos nos quilombos com a população brasileira como um todo e com as populações dos estados onde os quilombos se encontram. Foi observado que a proporção de indivíduos classificados em cada categoria de cor de pele nos quilombos difere da população brasileira ( $p < 0,0001$ ). Também foi observado que essas populações são diferentes entre si. Exceção foi o quilombo de Sacutiaba que não mostrou diferença estatística com relação ao Estado da Bahia ( $p = 0,0910$ ).



Tabela 11. Comparação dos quilombos e a população brasileira com relação à classificação fenotípica de indivíduos distribuídos em quatro categorias de cor da pele (Grau de Liberdade = 3).

Populações	Classificação fenotípica (Cor da pele)	Observado	Esperado	$\chi^2$	<i>p</i> -valor
Brasil x Quilombos	Branços	9	120,210	102,887	< 0,0001
	Negros	92	19,040	279,631	
	Mistos	152	109,870	16,158	
	Índios + amarelos	NA	3,880	3,882	
	Total	253	253,000	402,497	
Goiás x Kalunga	Branços	1	22,924	20,968	< 0,0001
	Negros	31	3,591	209,168	
	Mistos	23	27,506	0,738	
	Índios + amarelos	NA	0,979	0,979	
	Total	55	55,000	231,852	
Bahia x Sacutiaba	Branços	2	6,216	2,859	0,0910
	Negros	3	4,788	0,667	
	Mistos	23	16,564	2,499	
	Índios + amarelos	NA	0,431	0,431	
	Total	28	28,000	6,458	
Bahia x Rio das Rãs	Branços	1	17,316	15,373	< 0,0001
	Negros	43	13,338	65,964	
	Mistos	34	46,145	3,196	
	Índios + amarelos	NA	1,201	1,201	
	Total	78	78,000	85,735	
Sergipe x Mocambo	Branços	7	23,190	10,994	< 0,0006
	Negros	10	7,314	1,080	
	Mistos	64	50,496	4,097	
	Índios + amarelos	NA	1,215	1,215	
	Total	81	81,000	15,901	

A Figura 14 mostra a comparação entre os quilombos e o Brasil, assim como dos quilombos e dos estados brasileiros nos quais a população está inserida. Observa-se que a proporção de indivíduos brancos nos quilombos é pequena em comparação a da população brasileira e dos estados como apresentado na Figura 14A, 14B, 14C, 14D e 14E respectivamente. Como esperado, a proporção de indivíduos negros é maior nos quilombos, Figura 14A, 14C e 14D, do que nos estados brasileiros. No entanto, Bahia e Sacutiaba, Figura 14B, apresentaram uma proporção de indivíduos semelhantes.

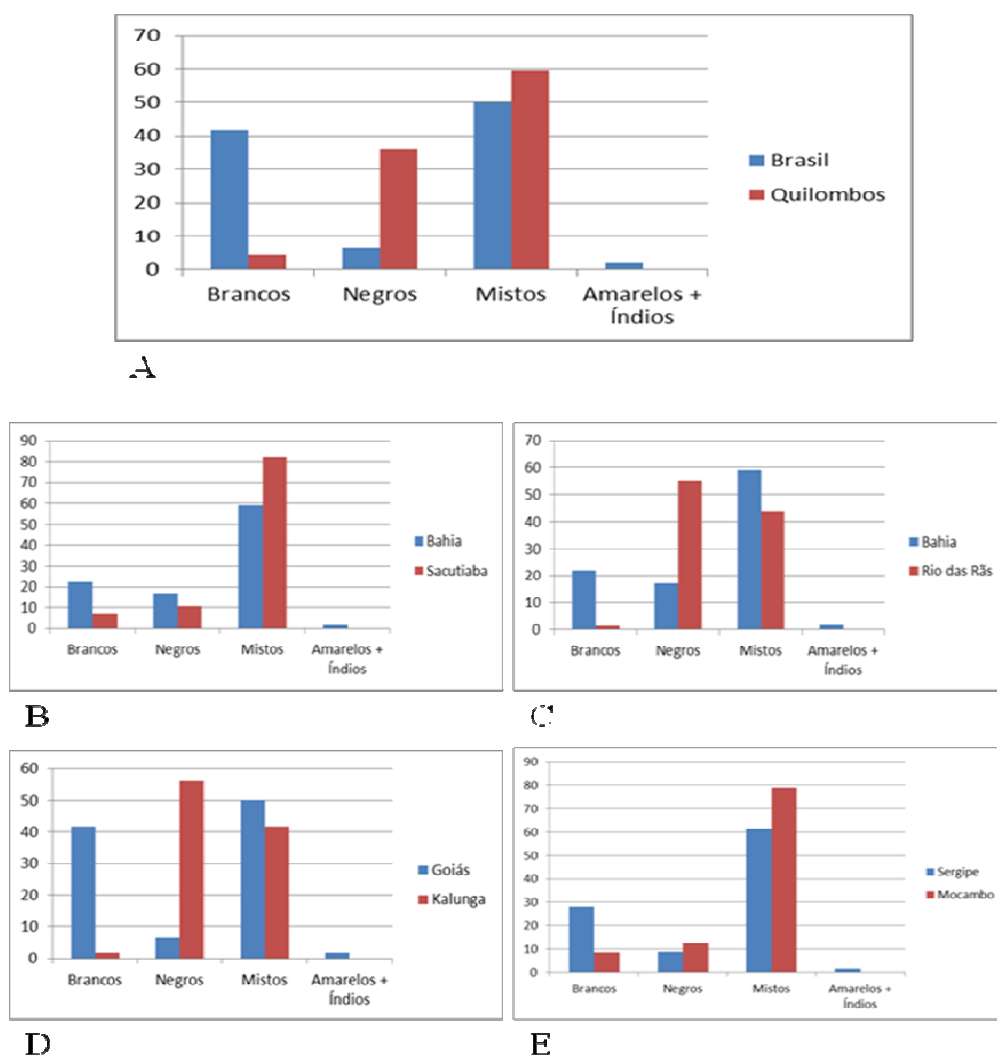


Figura 14. Comparação da classificação fenotípica da cor de pele entre os quilombos e o Brasil, assim como dos quilombos e dos estados brasileiros nos quais a população está inserida.

*Classificação fenotípica x SNPs*

Na Tabela 12, encontram-se os resultados da análise de associação entre classificação fenotípica e genótipos e alelos, de acordo com o Teste Exato de Fisher e *Odds Ratio* (OR). Para essa análise foram considerados todos os indivíduos analisados, independente de qual quilombo o mesmo pertence. Isso é a partir dessa análise não foram consideradas as populações e sim o fato de que os indivíduos compõem um grupo com ancestralidade africana predominante.

Para o marcador rs181832, foi observada uma associação da classificação fenotípica negra com o alelo C ( $p = 0,0255$ ). Nesse caso, o indivíduo que apresentar o alelo C tem a probabilidade maior de 1,58 vezes de ser classificado como negro e se possuir o genótipo C/T ( $p = 0,0048$ ) 2,2. A classificação fenotípica mista mostrou associação com o alelo T ( $p = 0,0173$ ). O indivíduo que possui o alelo T tem a probabilidade maior de 1,61 vezes de ser classificado como misto e se possuir o genótipo T/T ( $p = 0,0023$ ) tem 2,33.

Para o marcador rs26722, foi observada uma associação da classificação fenotípica negra com o alelo C ( $p = 0,0012$ ). O indivíduo que apresentar o alelo C tem a probabilidade maior de 5,05 vezes de ser classificado como negro e se possuir o genótipo C/C ( $p = 0,0052$ ) tem 2,91. A classificação fenotípica mista está associada com o alelo T ( $p = 0,0003$ ). O indivíduo que possui o alelo T tem a probabilidade maior de 3,34 vezes de ser classificado como misto e se possui o genótipo C/T ( $p = 0,0118$ ) tem 2,59.

Para análise do marcador rs16891982, foi encontrada uma associação da classificação fenotípica branca com o alelo G ( $p = 0,0092$ ). O indivíduo que possui o alelo G tem a probabilidade maior de 3,27 vezes de ser classificado como branco e se possui o genótipo G/G ( $p = 0,0170$ ) tem 8,03. A classificação fenotípica negra está

associada com o alelo C ( $p = 0,0053$ ). O indivíduo que possui o alelo C tem a probabilidade maior de 1,94 vezes de ser classificado como negro e se possui o genótipo C/C ( $p = 0,0050$ ) tem 1,82.

Observando o marcador rs35394, uma associação da classificação fenotípica negra com o alelo T ( $p = 0,0256$ ). O indivíduo que possui o alelo T tem a probabilidade maior de 2,04 vezes de ser classificado como negro e não houve associação estatisticamente significativa para os genótipos. A classificação fenotípica mista está associada com o alelo C ( $p = 0,0063$ ). O indivíduo que possui o alelo C tem a probabilidade maior de 2,31 vezes de ser classificado como misto e se possui o genótipo C/C ( $p = 0,0228$ ) tem 12,27 vezes mais chance de misto.

#### *Análise de associação entre o Índice de Ancestralidade Africana com relação ao gene SLC45A2*

##### *IAA x SNPs*

Os indivíduos pertencentes à população Rio das Rãs foram excluídos dessa análise por não terem disponibilidade de dados de IAA. A Tabela 13 apresenta os resultados da análise de associação entre os SNPs e o índice de ancestralidade africana.

O marcador rs16891982 apresentou associação estatisticamente significativa ( $p = 0,011$ ) entre o SNP e a ancestralidade africana baixa, em especial, com o genótipo G/G. Para os demais marcadores não foram observados associação estatisticamente significativa.

*IAA x haplótipos*

Para as análises de associação entre haplótipos e o IAA, os indivíduos pertencentes à população Rio das Rãs também foram excluídos. Com isso, foram observados oito diferentes haplótipos, como mostrados na Tabela 14. Os haplótipos 6 e 12 mostraram associação significativa com a ancestralidade africana, apresentando um *p*-valor de 0,043 e 0,006 respectivamente.

Tabela 12. Análise de associação entre classificação fenotípica e genótipos e alelos dos SNPs do gene *SLC45A2* com frequências polimórficas em quilombos brasileiros.

Marcador		Branco		Negro		Pardo		
		<i>p</i>	OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>	OR	
rs181832	Alelos	C	0,6458	1,22	<b>0,0255</b>	<b>1,58</b>		
		T					0,0173	1,61
	Genótipos	CC	0,5365	1,44	1,0000	1,07	0,7972	0,87
		CT	1,0000	1,17	<b>0,0048</b>	<b>2,20</b>	0,0040	0,46
		TT	0,7630	0,76	0,0030	0,43	<b>0,0023</b>	<b>2,33</b>
rs3756462	Alelos	C			0,7534	1,50	0,5374	1,83
		T	1,0000	0,0				
	Genótipos	CC	1,0000	0,0	1,0000	0	1,0000	-
		CT	1,0000	0,0	1,0000	0,88	0,7425	1,37
		TT	1,0000	-	1,0000	1,32	0,7440	0,61
rs26722	Alelos	C	0,4986	2,99	<b>0,0012</b>	<b>3,05</b>		
		T					<b>0,0003</b>	<b>3,34</b>
	Genótipos	CC	0,4644	2,87	<b>0,0052</b>	<b>2,91</b>	0,0013	0,31
		CT	0,6956	0,41	0,0264	0,42	<b>0,0118</b>	<b>2,59</b>
		TT	1,0000	1,50	0,0894	0,00	0,0840	9,38
rs16891982	Alelos	C			<b>0,0053</b>	<b>1,94</b>		
		G	<b>0,0092</b>	<b>3,27</b>			0,1564	1,40
	Genótipos	CC	0,0628	0,28	<b>0,0396</b>	<b>1,82</b>	0,2302	0,72
		CG	0,7527	1,36	0,4033	0,78	0,5848	1,20
		GG	<b>0,0170</b>	<b>8,03</b>	0,0050	0,06	0,2506	2,36
rs35394	Alelos	C					<b>0,0063</b>	<b>2,31</b>
		T	0,3375	3,38	<b>0,0256</b>	<b>2,04</b>		
	Genótipos	CC	1,0000	1,14	0,0534	0,10	<b>0,0228</b>	<b>12,27</b>
		CT	0,6995	0,38	0,4099	0,74	0,2547	1,52
		TT	0,4662	3,20	0,1138	1,78	0,0314	0,49

Tabela 13. Análise de associação dos SNPs situados no gene *SLC45A2* com o Índice de Ancestralidade Africana estimado em indivíduos de quilombos brasileiros.

SNPs	Genótipo	<i>n</i>	Média IAA	Diferença (95% CI)	<i>p</i> -valor
rs732740	---	---	---	---	---
rs181832	T/T	75	0,47 (0,02)	0,00	0,27
	C/T	89	0,51 (0,02)	0,04 (-0,01 – 0,09)	
rs3756462	C/C	14	0,49 (0,05)	0,02 (-0,07 – 0,11)	0,13
	T/T	173	0,49 (0,01)	0,00	
	C/T	5	0,60 (0,07)	0,11 (-0,03 – 0,25)	
rs26722	C/C	132	0,51 (0,01)	0,00	0,32
	C/T	39	0,46 (0,02)	-0,04 (-0,10 – 0,01)	
	T/T	5	0,47 (0,02)	-0,03 (-0,18 – 0,11)	
<b>rs16891982</b>	C/C	92	0,51 (0,02)	0,00	<b>0,019</b>
	C/G	68	0,48 (0,02)	-0,03 (-0,08 – 0,02)	
	<b>G/G</b>	<b>10</b>	<b>0,37 (0,04)</b>	<b>-0,14 (-0,25 – -0,04)</b>	
rs35394	T/T	130	0,50 (0,01)	0,00	0,46
	C/T	41	0,49 (0,03)	-0,02 (-0,07 – 0,04)	
	C/C	7	0,43 (0,04)	-0,07 (-0,19 – 0,05)	

Tabela 14. Associação dos haplótipos do gene *SLC45A2* com os Índices de Ancestralidade Africana em indivíduos afrodescendentes brasileiros.

Haplótipos	rs732740	rs181832	rs3756462	rs26722	rs16891982	rs35394	Frequência	Diferença (95% CI)	p-valor
1	T	T	T	C	C	T	0,308	0,00	---
2	T	C	T	C	C	T	0,256	0,01 (-0,03 – 0,06)	0,55
3	T	T	T	C	G	T	0,226	-0,04 (-0,09 – 0,01)	0,12
4	T	T	T	C	C	C	0,035	-0,05 (-0,14 – 0,03)	0,21
<b>6</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>0,074</b>	<b>-0,07 (-0,14 – 0)</b>	<b>0,043</b>
7	T	C	T	T	C	C	0,028	0,03 (-0,08 – 0,14)	0,63
8	T	C	T	T	C	T	0,024	-0,04 (-0,15 – 0,07)	0,45
<b>12</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>0,018</b>	<b>-0,21 (-0,36 – -0,06)</b>	<b>0,006</b>
raro	*	*	*	*	*	*	0,027	0,02 (-0,09 – 0,13)	0,68
Associação global dos haplótipos p-valor=0,68									



## DISCUSSÃO

*Análise populacional de quilombos brasileiros com relação a marcadores genéticos situados no gene SLC45A2*

### *Análise dos SNPs*

Espera-se que a frequência alélica de qualquer *locus*, em populações miscigenadas, apresente valor intermediário ao encontrado nas populações parentais. Neste trabalho, as frequências alélicas observadas para cada marcador para as quatro populações seguem, de forma geral, essa previsão, como mostrado na Tabela 15 que compara as populações aqui analisadas com outras populações disponíveis na literatura quanto às frequências dos alelos mutantes dos marcadores genéticos. De acordo com Yuasa *et al.* (2006), alelos mutantes, nesse caso, são aqueles que apresentam os menores valores alélicos encontrados em Africanos. Ainda é interessante destacar que populações de diferentes constituições genéticas derivadas de diferentes ancestralidades apresentaram valores similares na frequência do alelo mais comum.

As populações quilombolas apresentam maior similaridade quanto às frequências do alelo mutante dos marcadores rs732740, rs181832, rs3756462 e o rs26722, com a população africana, exceto quanto ao rs26722 nas populações de Sacutiaba e Mocambo. Por outro lado, as frequências alélicas para o marcador rs16891982 nos quilombos apresentaram-se similares aos observados na população urbana de Ribeirão Preto. Esse achado relaciona-se com a presença de intensa miscigenação em todas essas populações brasileiras.

Tabela 15. Frequência do alelo mutante de SNPs situados no gene *SLC45A2* em populações quilombolas e em outras populações.

SNP	Mutação	Frequência do alelo mutante										
		Kalunga	Mocambo	Rio das Rãs	Sacutiaba	Ribeirão Preto <sup>a</sup>	África <sup>b</sup>	Japão <sup>b</sup>	Alemanha <sup>b</sup>	Europa <sup>c</sup>	África <sup>c</sup>	
<b>rs732740</b>	T > C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA	NA
<b>rs181832</b>	T > C	0,36	0,31	0,34	0,30	NA	0,32	0,16	0,02	NA	NA	NA
<b>rs3756462</b>	T > C	0,03	0,01	0,04	0,00	0,04	0,00	0,21	0,04	NA	NA	NA
<b>rs26722 (E272K)</b>	G > A	0,06	0,16	0,07	0,30	NA	0,05	0,38	0,03	0,03	0,03	0,05
<b>rs16891982 (L374F)</b>	G > C	0,19	0,30	0,21	0,27	0,36	0,00	0,00	0,96	0,94	0,94	0,00
<b>rs35394</b>	A > G	0,12	0,16	0,07	0,22	0,10	0,03	0,40	0,02	NA	NA	NA

<sup>a</sup>Andrade et al. 2011; <sup>b</sup>Yuasa et al. 2006; <sup>c</sup>Soejima et al. 2006;

De acordo com as análises aqui apresentadas, todos os marcadores estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas quatro populações, apesar do pequeno tamanho amostral de Sacutiaba. O tamanho amostral pequeno é um dos fatores que deixam uma população mais susceptível aos efeitos da deriva genética (Futuyma, 1998), podendo se encontrar, mesmo que momentaneamente, fora do equilíbrio de HardyWeinberg.

A população total dos quilombos a época da coleta se distinguia bastante. Sacutiaba (cerca de 200 indivíduos) e Mocambo (cerca de 500 indivíduos) são consideravelmente menores que Kalunga (cerca de 5.300 indivíduos) e Rio das Rãs (cerca de 4.000 indivíduos). Dessa forma, a amostra de Sacutiaba e Mocambo representam em média 15% e 16,2% da população total, respectivamente, provavelmente representando a variabilidade total de seus habitantes. Já a amostra de Kalunga e Rio das Rãs, representa uma porcentagem menor da população 1,32% e 2,02% respectivamente, e não devem representar a variabilidade genética total da mesma.

A heterozigose observada, de forma geral, foi levemente maior que a esperada. Contudo, essa diferença não foi significativa. Por isso, baseado nesses dados não é possível afirmar se o pequeno excesso de heterozigotos nas quatro populações é sinal de ação de mecanismos evolutivos mantendo esse padrão em populações distintas.

#### *Teste de Desequilíbrio de Ligação*

O teste de desequilíbrio de ligação indica se a segregação entre os marcadores avaliados está ocorrendo de forma independente ou não. Seria de se esperar que fosse encontrado DL entre todos os pares de *loci* nessas populações, visto que há dois

mecanismos básicos que levam a ocorrência de DL, e os dois são teoricamente observados nos casos aqui apresentados: proximidade física e miscigenação recente.

A proximidade física entre regiões genômicas diminui a probabilidade de recombinação entre elas. O gene *SLC45A2* tem uma extensão total máxima de 40kb, portanto uma região pequena. Com relação à história recente, mostra que essas populações foram fundadas há cerca de 150 anos atrás por indivíduos provavelmente já miscigenados. Essa proposta é corroborada por dados observados em marcadores no cromossomo Y, mostrando grande incidência de origem europeia (Ribeiro, 2009).

Neste trabalho, dos 60 pares de loci analisados, para 46 pares não foram encontrados DL. Embora as razões para esta ausência de DL não ser conhecida, as sugestões de explicação para esse achado baseiam-se no tempo desde a miscigenação. O modelo de *hybrid-isolation* – HI (Pffaf *et al.* 2001), Figura 15A, sugere que o desequilíbrio ocorre no momento da miscigenação e tende a desaparecer ao longo do tempo, e nesse caso o DL tende a diminuir ao longo das gerações, mesmo entre *loci* fisicamente próximos, como é o caso dos marcadores que foram aqui analisados. Outro modelo é o *continuous-gene-flow* – CGF, Figura 15B, em que ocorre influxo gênico ao longo das gerações. De acordo com esse modelo, o DL tende a aumentar nas primeiras gerações e, com o passar do tempo, a decair, ainda que em taxas mais baixas que as do modelo citado anteriormente. Nos dois modelos, pode ter havido DL, mas como previsto pelos modelos, decorreu tempo suficiente para que essas associações deixassem de existir. Porém, 150 anos desde a fundação dos quilombos seria equivalente a cerca de seis gerações, tempo supostamente insuficiente para que o DL desaparecesse.

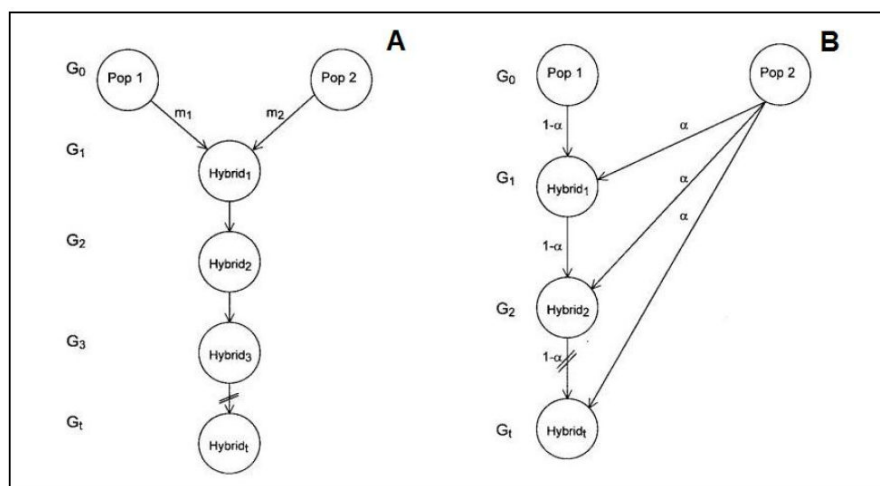


Figura 15. Modelos explicativos do decaimento de Desequilíbrio de Ligação por miscigenação. Adaptado de Pffaf *et al.* 2001.

Outra proposta é a de *hotspot* de recombinação. Foram identificados mais de 25.000 pontos de *hotspot* de recombinação em todo o genoma, o que sugere uma densidade média de cerca de um em cada 50 kb (Myers *et al.* 2005). Além disso, observaram que *hotspots* de recombinação em humanos parecem ocorrer preferencialmente próximo (dentro de 50 kb) de genes, mas são preferencialmente localizados fora do domínio transcrito (Myers *et al.* 2005). A Figura 16 mostra a variação da taxa de recombinação ao longo do cromossomo 5. O gene *SLC45A2* está localizado na região cromossômica 5p13.3, onde a taxa de recombinação, mostrada em preto, é alta, podendo justificar a deficiência de DL nesta região de apenas 40Kb. Observação similar a aqui realizada foi feita por Miretti *et al.* (2005) que encontrou deficiência de DL em genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade e sugeriu como explicação a alta taxa de recombinação nessa região genômica.

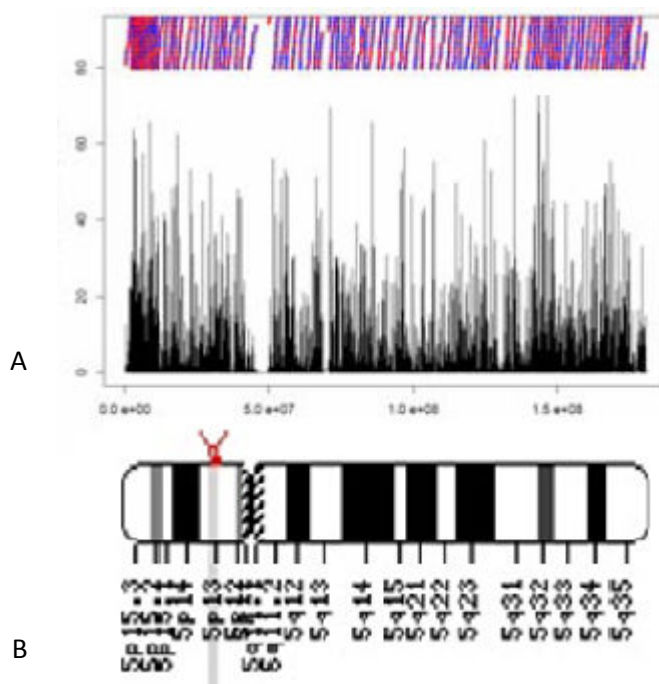


Figura 16. A. Taxa de recombinação ao longo do cromossomo 5 mostrada em preto; pontos azuis sinalizam região de baixa recombinação e pontos vermelhos de alta (adaptado de Myers *et al.* 2005). B. ideograma do cromossomo 5 sinalizando, em vermelho, a região genômica do gene *SLC45A2* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ainda há outra explicação para a ausência de DL, a presença de alelos raros, com frequência menor que 5%, como observado em alguns dos marcadores analisados nesse trabalho. A frequência alélica reduzida influencia no poder estatístico para detectar DL (Goddard *et al.* 2000; Lewontin 1995). Para tentar contornar essa ausência pode-se aumentar o tamanho amostral.

### *Análises haplotípicas*

Os haplótipos mais frequentes foram aqueles encontrados simultaneamente em todas as quatro populações. Para Kalunga, Mocambo e Rio das Rãs, o haplótipo mais frequente foi o 1, já para Sacutiaba foi o 3. O segundo haplótipo mais frequente para Kalunga e Rio das Rãs foi o 2, para Mocambo o 3 e para Sacutiaba o 1.

O número de haplótipos encontrados mostrou-se relacionado ao tamanho amostral. O maior número de haplótipos foi observado em Mocambo: 11 no total. Em Kalunga e Rio das Rãs foram observados 10 haplótipos e em Sacutiaba, que apresenta o menor tamanho amostral, foram observados oito haplótipos. Porém, observa-se que a maioria dos haplótipos apresenta baixa frequência. A soma dos três haplótipos mais frequentes em Mocambo representa 76% dos haplótipos encontrados. A somatória dos três haplótipos mais comuns para Sacutiaba representa 67%, para Kalunga 86% e para Rio das Rãs 89% do total de haplótipos encontrados.

Com relação ao compartilhamento de haplótipos, foi observado que Mocambo e Sacutiaba compartilham oito haplótipos do total de 18, sugerindo uma maior semelhança entre essas duas populações. As demais populações compartilham um total de seis haplótipos. A semelhança quanto aos principais haplótipos nas quatro populações poderia ser explicada pelo histórico de formação e pela ancestralidade semelhante.

### *Diferenciação populacional haplotípica ( $F_{st}$ )*

A diferenciação populacional detectada na análise dos haplótipos mostrou que há uma diferença estatisticamente significativa entre os pares de populações Kalunga/Sacutiaba ( $p = 0,00038$ ), Rio das Rãs/Sacutiaba ( $p = 0,00051$ ) e Mocambo/Rio das Rãs ( $p = 0,01692$ ). Diferenças significativas, como as observadas neste trabalho, foram também encontradas entre essas populações afrodescendentes quando analisadas para marcadores AIMs e STRs autossômicos (Pedrosa, 2006), STRs específicos e *Indels* do cromossomo X (Ribeiro, 2009).

### *Análise de associação entre a classificação fenotípica com relação ao gene SLC45A2*

#### *Classificação fenotípica x Dados do IBGE*

Há diferença significativa quanto à classificação fenotípica cor de pele, entre a população brasileira e o pool de indivíduos quilombolas, assim como entre as comunidades e as populações dos estados onde as comunidades se localizam. A exceção observada foi a comunidade Sacutiaba.

Essa semelhança da população de Sacutiaba com as populações próximas da região pode ser justificada pela alta taxa de imigrantes (30%) neste remanescente, de modo que o impacto da imigração sobre as frequências alélicas é mais elevado do que os demais (Amorim 2009; Amorim *et al.* 2011).



*Classificação fenotípica x Dados do IBGE*

Em relação à análise amostral como um todo, o presente estudo mostrou que há associação estatisticamente significativa entre a classificação fenotípica cor de pele e quatro dos seis marcadores analisados para o gene *SLC45A2*. Esse achado sugere que variações nestes marcadores estão relacionadas com a classificação fenotípica cor de pele negra.

O marcador rs3756462 não apresentou associação significativa com nenhuma classificação fenotípica em relação à cor de pele. Resultado similar foi observado para a população urbana de Ribeirão Preto (Andrade 2010). Contudo, foi observado que o genótipo CT ocorreu apenas em indivíduos com fenótipos mais escuros tanto na população de Ribeirão Preto como nos indivíduos quilombolas analisados neste trabalho. Dessa forma, a ausência de resultados estatisticamente significativos, pode ser justificada pela baixa frequência do alelo C.

Para o marcador rs26722, observou-se associação significativa entre o alelo C e o genótipo CC com a cor de pele negra. Em um estudo realizado com a população urbana de Ribeirão Preto, foi observada associação significativa entre o genótipo TT e a cor de pele branca ( $p = 0,0738$ ), com a autodeclaração branca ( $p = 0,0166$  e alelo T:  $p = 0,0229$ ) e com a ancestralidade europeia ( $p = 0,0853$ ) (Andrade *et al.* 2011). Esses resultados são complementares e foram observados, provavelmente, pelo perfil de ancestralidade das amostras analisadas. Isso é, enquanto que na amostra de quilombolas há uma predominância da ancestralidade africana, em Ribeirão Preto há da europeia.

Com relação ao marcador rs16891982, observou-se semelhança entre os resultados aqui encontrados e os descritos para a população urbana de Ribeirão Preto (Mendes-Junior 2010). Ambos os estudos mostraram associação significativa do alelo G (374Phe) e o genótipo GG com fenótipos claros, e o alelo C (374Leu) e o genótipo CC

associados com a ocorrência de fenótipos escuros. No entanto, como a quantidade de indivíduos brancos na amostra de quilombolas é pequena, a associação observada entre o alelo G e genótipo GG com cor da pele branca deve ser vista com cautela.

Por outro lado, essa associação foi observada também em outras populações, como por exemplo, altas frequências do alelo G em brancos sul africanos e alemães (de 0,89 e 0,96, respectivamente), e ausência em indivíduos não brancos (Gana, Japão e na ilha de Nova Guiné) (Yuasa *et al.* 2006). Já o alelo C é mais comum em populações com predominância de indivíduos classificados como negros e em populações não brancas (Graf *et al.* 2005).

A diferença marcante na distribuição do alelo G pode ser uma consequência da seleção natural e adaptação, ou seja, menor quantidade de radiação ultravioleta (Nakayama *et al.* 2002; Yuasa *et al.* 2004). Sugere-se que estas frequências estão associadas com a latitude, radiação ultravioleta e os níveis de cor da pele, porque MATP desempenha um papel importante na síntese de melanina. Alta frequência do alelo G entre os europeus pode ser uma resposta à seleção para a menor incidência de radiação ultravioleta associado com a despigmentação (Yuasa *et al.* 2006).

Com relação ao marcador rs35394, nesse trabalho foram observados resultados complementares a literatura. No presente trabalho, o alelo T apresentou associação significativa com a classificação fenotípica negra. No entanto, em Ribeirão Preto o alelo C apresentou associação significativa com pele clara (Fracasso *et al.* 2011).

*Análise de associação entre o Índice de Ancestralidade Africana com relação ao gene SLC45A2*

*IAA x SNPs*

O IAA é um parâmetro que sinaliza a contribuição da parental africana em uma dada população. No caso dos quilombos, espera-se que o índice seja mais alto que em populações que não sejam afrodescendentes. Como o índice de ancestralidade africana é maior à medida que a contribuição africana é maior, espera-se que indivíduos com alto IAA apresentem cor da pele escura. Estudos realizados no Brasil mostraram falta de congruência quanto à ancestralidade biogeográfica e a pigmentação da pele, isso pode ser justificado pelos diferentes marcadores AIMS utilizados nos trabalhos. Em um estudo realizado em Queixadinha e Vale do Jequitinhonha (Minas Gerais) foi observado uma falta de associação entre ancestralidade e cor da pele (Parra *et al.* 2003), assim como em uma amostragem do estado de São Paulo (Pimenta *et al.* 2006). Já em um trabalho realizado em população urbana de Salvador (Bahia) foi observada associação significativa (Bomfim 2008), assim como estudos realizados na região centro-oeste brasileira (Leite 2012; Chiabai 2008). Foi observado que há uma associação entre cor da pele e ancestralidade nos quilombos aqui analisados (Gontijo, comunicação pessoal).

O IAA mostrou associação estatisticamente significativa com o marcador rs16891982, mostrando que este está relacionado a maior quantidade de pigmentação na pele apesar da miscigenação nas populações quilombolas. Essa associação estatisticamente significativa com ancestralidade genética foi observada tanto no presente estudo como em Chiabai (2008). Em ambos o genótipo CC apresenta associação estatisticamente significativa com a classificação fenotípica negra (Tabela 10) e com o índice de ancestralidade africano alto (Tabela 11). O genótipo GG é o mais

frequente na população CEU (comunidade europeia) e o CC em populações africanas e asiáticas (site hapmap).

Yuasa *et al.* (2006) propõe que esse marcador seja útil para inferência de ancestralidade genética, porque o alelo G mostra frequências altas em grupos de brancos sul africanos e alemães, e ainda ressalta que essas frequências parecem estar associadas com a latitude, radiação ultravioleta e cor de pele. Para a população brasileira, bem como para populações quilombolas, este marcador também pode ser útil para inferência de ancestralidade genética.

#### *IAA x haplótipos*

Esse é o primeiro trabalho que contrasta haplótipos do gene *SCL45A2* baseado nesse conjunto de SNPs com índice de ancestralidade africana. O conjunto de haplótipos não apresentou associação estatisticamente significativa com o IAA. No entanto, quando analisados individualmente, os haplótipos 6 e 12 apresentaram associação estatisticamente significativa com IAA. De acordo com a análise realizada, foi verificado que o haplótipo 12 (TCTCGT) ocorre em indivíduos com uma média de IAA 21% menor do que a média de IAA na amostra. Foram encontrados quatro indivíduos que portam esse haplótipo, todos em heterozigose com o haplótipo 3, que é um dos três haplótipos mais comuns em quilombos. Esses indivíduos foram classificados como branco (um indivíduo) e pardos (três indivíduos) e apresentam, em média, 27% de ancestralidade africana. Como a média de IAA na amostra foi de 48%, sugere-se que indivíduos portadores do haplótipo 12 tenha cor de pele mais clara. O outro haplótipo que mostrou associação foi o 6, com IAA 7% mais baixo do que a média. Não foi encontrada associação entre haplótipos e IAA altos, o que sugeriria haplótipos correlacionados com cor da pele mais escura.

Em análise dos dados de Yuasa *et al.* 2006, com os haplótipos determinados com os mesmos SNPs utilizados neste trabalho, observou-se que os 3 haplótipos mais frequentes das populações de origem africana são os mesmos detectados neste estudo.

## CONCLUSÃO

1. As quatro populações compartilharam o alelo mais comum para todos os marcadores analisados e que todos os marcadores estão em EHW.
2. Não foi observado DL entre os pares de *loci* nas populações quilombolas, fato este que pode ser explicado pelo decaimento de desequilíbrio de ligação após a miscigenação ao longo das gerações ou por este gene estar localizado em uma região com altas taxas de recombinação sendo considerada *hotspot*, ou ainda pela presença de alelos raros que não possuem força estatística para detectar o DL.
3. As populações de Kalunga e Rio das Rãs apresentaram a menor diferenciação populacional enquanto Sacutiaba apresentou maior diferenciação populacional com todas as outras populações.
4. Os haplótipos mais frequentes foram compartilhados entre as quatro populações.
5. Há diferença significativa quanto a classificação da cor da pele entre a população brasileira e o pool de indivíduos quilombolas, assim como entre as comunidades e as populações dos estados onde as comunidades se localizam. A exceção observada foi a comunidade Sacutiaba.
6. Há associação estatisticamente significativa entre a classificação fenotípica cor de pele e quatro dos seis marcadores analisados para o gene *SLC45A2*. Sugere-se que o genótipo CT do marcador rs3756462, o alelo C e genótipo CC dos marcadores rs26722 e rs16891982 e por fim o alelo T do marcador rs35394, ocorram em pele mais escura.
7. O IAA mostrou associação estatisticamente significativa com o marcador rs16891982, revelando que este está relacionado a maior quantidade de pigmentação na pele apesar da miscigenação nas populações quilombolas.

8. Observou-se associação entre os haplótipos 6 e 12, obtidos a partir da análise dos SNPs, e as estimativas de ancestralidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe-Sandes K (2002) Diversidade genética de afro-brasileiros: DNA mitocondrial e cromossomo Y. Tese de doutorado em Genética de Populações. Universidade de São Paulo.
- Alencastro LF (2000) O trato dos Viventes: A formação do Brasil do Atlântico Sul. 1ed. Companhia das Letras, São Paulo-SP.
- Allocco DJ; Song Q; *et al.* (2007) Geography and genography: prediction of continental origin using randomly selected single nucleotide polymorphisms. BMC Genomics 8:68.
- Amorim CEG (2009) Genética de populações e reinterpretação da história demográfica de remanescentes de quilombos: Uma comparação entre três populações do nordeste Brasileiro. Tese de mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília.
- Amorim CEG *et al.* (2011) Migration in Afro-Brazilian Rural Communities: Crossing Demographic and Genetic Data. Human Biology 83: 509 –521.
- Andrade ES *et al.* (2011) Avaliação do valor preditivo de ancestralidade e de características relacionadas à pigmentação humana do SNP rs26722 (E272K) do gene *SLC45A2*. Resumo publicado em Anais de Congresso. III Congresso Brasileiro de Genética Forense e II Jornada Lationoamericana de Genética Forense. Porto Alegre.
- Andrade ES (2010) Caracterização forense de SNPs do gene *SLC45A2* e sua relação com a pigmentação humana. Apresentação oral em Congresso. III Seminário Nacional de DNA e Laboratório Forense. Brasília-DF.



- Anjos RSA; Cipriano A (2006) Quilombolas, tradições e cultura da resistência. São Paulo: Aori Comunicação.
- Ang KC; Ngu MS; Reid KP; Teh MS; Aida ZS; *et al.* (2012) Skin Color Variation in Orang Asli Tribes of Peninsular Malaysia. PLoS ONE 7(8).
- Aoki K (2002) Sexual selection as a cause of human skin color variation: Darwin's hypothesis revisited. *Ann Hum Biol*, 589–608.
- Arruti JM (2006) Mocambo: Antropologia e história do processo de formação quilombola. Bauru, SP: Edusc, 370p.
- Barreto HMP (1995) O negro em Sergipe. Aracaju, Universidade Federal de Sergipe. Museu de Antropologia.
- Barsh GS (2003) What controls variation in human skin color? *PLoS Biol*, 1:19-22.
- Beleza S; Santos AM; McEvoy B; Alves I; Martinho C; Cameron E; Shriver MD; Parra EJ; Rocha J (2012) The Timing of Pigmentation Lightening in Europeans. *Mol. Biol. Evol.* 30(1):24–35.
- Bortolini MC; Weimer TA; Franco MHLP; Salzano FM; Layrisse Z; Schneider H; Schneider MPC; Harada ML (1992) Genetic studies in three American black populations. *Gene Geogr* 6:1-16.
- Brasileiro S; Sampaio JAL (2002) Sacutiaba e Riacho de Sacutiaba: Uma comunidade negra rural no oeste baiano. Em *Quilombos: Identidade Étnica e territorialidade*. Editor: O Dwyer. Rio de Janeiro FGV/ABA 83-108
- Bonfim TF (2012) Ancestralidade genômica em uma amostra de portadores do HIV-1 do Estado da Bahia. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em

Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. Fundação Oswaldo Cruz.  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, Bahia-BA.

Bouakaze C; Keyser C; Crubezy E; Montagnon D; Ludes B (2009) Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: inferences from multiplexed autosomal SNP analysis. *Int J Legal Med* 123: 315-25.

Branicki W; Brudnik U; Kupiec T; Wolanska-Nowak P; Wojas-Pelc A (2007) Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci* 52: 349-54.

Campbell CD; Ogburn EL; *et al.* (2005) Demonstrating stratification in a European American population. *Nat Genet* 37(8): 868-872.

Chiabai MA (2008) Genética da pigmentação da pele em uma amostra da população brasileira. Monografia como conclusão de curso em Ciências Biológicas. Universidade Católica de Brasília.

Curtin PD (1969) *The Atlantic slave trade: a census*. University of Wisconsin Press, Madison.

Excoffier L; Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Fausto C (1998) Fragmentos de História e Cultura Tupinambá: Da etnologia como instrumento crítico de conhecimento etno-histórico. In: *Letras Cd (Ed.) História dos índios no Brasil*. Companhia das Letras. Secretaria Municipal de Cultura: FAPESP, São Paulo.

Ferdinand KC (2008) Fixed-dose isosorbide dinitrate-hydralazine: race-based cardiovascular medicine benefit or mirage? *J Law Med Ethics* 36(3):458-463.

- Ferreira LB (2006) Diversidade do DNA Mitocondrial de populações brasileiras Ameríndias e afrodescendentes. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Ferrell PB Jr; McLeod HL (2008) Carbamazepine, *HLA-B\*1502* and risk of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: US FDA recommendations. *Pharmacogenomics* 9(10):1543–1546.
- Fracasso NCA *et al.* (2011) SNP do gene *SLC45A2* e sua relação com a pigmentação humana para fins forenses. Resumo publicado em Anais de Congresso. III Congresso Brasileiro de Genética Forense e II Jornada Lationoamericana de Genética Forense. Porto Alegre.
- Frudakis TN (2008) Molecular photofitting: predicting ancestry and phenotype using DNA. Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Fukamachi S; Shimada A; Shima A (2001) Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in Medaka. *Nat Genet* 28: 381–385.
- Futuyma DJ (1998) *Evolutionary Biology*. 3ed Sinauer. Sunderland. MA. 751.
- Gerstenblith MR; Goldstein AM; Fargnoli MC; Peris K; Landi MT (2007) Comprehensive Evaluation of Allele Frequency Differences of *MC1R* Variants Across Populations Human Mutation. 28: 495-505.
- Giardina E *et al.* (2008) Haplotypes in *SLC24A5* Gene as Ancestry Informative Markers in Different Populations. *Curr Genomics* 9: 110-4.
- Goddard KAB; Hopkins PJ; Hall JM; Witte1 JS (2000) Linkage Disequilibrium and Allele-Frequency Distributions for 114 Single-Nucleotide Polymorphisms in Five Populations. *Am J Hum Genet* 66:216–234.

- Godinho NMO (2008) O impacto das migrações na constituição genética de populações latino-americanas. Tese de doutorado em Biologia Animal. Universidade de Brasília.
- Gontijo CC (2008) Composição genética de duas populações afrodescendentes brasileiras inferidas a partir de marcadores informativos de ancestralidade. Tese de mestrado em Biologia Animal. Universidade de Brasília.
- González-Andrade F; Sánchez D; González-Solórzano J; Gascón S; Martínez-Jarreta B (2007) Sex specific genetic admixture of Mestizos, Amerindian Kichwas and Afro-Ecuadorans from Ecuador. *Human Biology* 79: 51-77.
- Harada M; Li YF; El-Gamil M; Rosenberg AS; Robbins PF (2001) Use of an in vitro immuno selected tumor line to identify shared melanoma antigens recognized by *HLA-A\*0201*-restricted T cells. *Cancer Res* 61: 1089–1094.
- Holick MF (2003) Vitamin D, A millennium perspective. *J Cell Biochem* 88: 296–307
- Jablonski NG; Chaplin G (2000) The evolution of human skin coloration. *Journal of Human Evolution* 39: 57–106.
- Jobling MA; Gill P (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics* 5: 739-751.
- Kushimoto T; Valencia JC; Costin GE; *et al.* (2003) The Seiji Memorial Lecture - The melanosome: An ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell* 16: 237–244.
- Leite TKM (2012) Variabilidade Genética na População Brasileira: ancestralidade genômica e fenótipos de capacidade cardiovascular. Tese de doutorado em Educação Física. Universidade Católica de Brasília.

- Lewontin RC (1995) The Detection of Linkage Disequilibrium in Molecular Sequence Data. *Genetics* 140: 377-388.
- Lima RR (2002) A contribuição masculina na formação de três remanescentes de quilombos do Vale do São Francisco (nordeste do Brasil) avaliada por marcadores do cromossomo Y. Tese de mestrado em Genética de Populações. Universidade de Brasília.
- Lucotte G; Mercier G; Diéterlen F; Yuasa I (2011) A decreasing gradient of 374F allele frequencies in the skin pigmentation gene *SLC45A2*, from the north of West Europe to North Africa. *Biochem Genet* 48: 26–33.
- Luizon MR (2007) Dinâmica da Mistura Étnica em Comunidades Remanescentes de Quilombo Brasileiras. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Ribeirão Preto – SP.
- McEvoy B; Beleza S; Shriver MD (2006) The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. *Human Molecular Genetics* 15: 2 176-181.
- McHenry HM; Berger LR (1998) Body proportions in *Australopithecus afarensis* and *A. africanus* and the origin of the genus *Homo*. *J Hum Evol* 35: 1–22.
- Meegen-Silva A (1999) Kalunga: Identidade Étnica de uma comunidade Remanescentes de Quilombos. Dissertação de mestrado em Antropologia Cultural Vrije Universiteit. Amsterdã, Holanda.
- Mendes-Junior CT; Fracasso NCA; Zanao LR; Andrade CCF; Silva MS; Marano LA; Wiezel CEV; Donadi EA; Simões AL (2010) Alleles from SNPs at the *SLC24A5* and *SLC45A2* genes are associated with the presence of freckles and eye, hair and skin pigmentation in Brazil. In: 60th Annual Meeting of the American Society of

Human Genetics. Washington, DC. Program of the 60th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. Bethesda: The American Society of Human Genetics 169-169.

Nakayama K; Fukamachi S; Kimura H; Koda Y; Soemantri A; Ishida T (2002) Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. *J Hum Genet* 47: 92-4.

Newton JM; Cohen-Barak O; Hagiwara N; Gardner JM; Davisson MT; King RA; Brilliant MH (2001) Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene underlie a new form of oculocutaneous albinism, *OCA4*. *Am J Hum Genet* 69: 981–988.

Oliveira SF; Ribeiro GGBL; Ferreira LB; Klautau-Guimarães MN; Simões AL (2005) History reconstruction of afro-derived isolated Brazilian populations: the contrast among female and male genetic contribution. *Espanha. Diversidad Biológica y Salud Humana*.

Parra EJ (2011) Evolution of pigmentation in humans. *Piel* 26(2): 66–79.

Park SH; Chae H; Kim Y; Kim M (2012) Molecular analysis of Korean patients with oculocutaneous albinism. *Jpn J Ophthalmol* 56: 98–103.

Pedrosa MAF (2006) Composição Genética de Quatro Populações Remanescentes de Quilombo do Brasil com Base em Microsatélites e Marcadores de Ancestralidade. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular. Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, Brasília – DF.

Pereira R; Phillips C; Pinto N; Santos C; Santos SEBd; *et al.* (2012) Straight forward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry Informative Insertion Deletion Multiplexing. *PLoS ONE* 7: 1.

- Pfaff CL; Parra E J; Bonilla C; Hiester K; Mckeigue PM; Kamboh MI; Hutchinson RG; Ferrell RE; Boerwinkle E; Shriver MD (2001) Population structure in admixed populations: effect of admixture dynamics on the pattern of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 68: 198-207.
- Phillips C; Sala A; Sánchez JJ; Fondevila M; Gómez-Tato A; Álvarez-Dios J; Calaza M; Casares de Cal M; Ballard D; Lareu MV; Carracedo Á; (2007) The SNP for ID Consortium. Inferring ancestral origin using a single multiplex as 49 say of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Science International Genetics* 1: 273-280.
- Pimenta JR; Zuccherato LW; Debes AA; Maselli L; Soares RP; Moura-Neto RS; Rocha J; Bydlowski S; Pena SDJ (2006) Color and Genomic Ancestry in Brazilians: A Study with Forensic Microsatellites. *Hum Hered* 62: 190–195.
- Post PW; Daniels F; Binford RT (1975) Cold injury and the evolution of ‘white’ skin. *Hum Biol* 39: 131–43.
- Pritchard JK; Stephens M; Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pulker H; Lareu MV; Phillips C; Carracedo A (2007) Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. *Forensic Sci Int Genet* 1: 100-4.
- Rana BK; Hewett-Emmett D; Jin L; Chang BH; Sambuughin N; *et al.* (1999) High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics* 151: 1547–57.
- Rees JL (2003) Genetics of Hair and Skin Color. *Annu Rev Genet* 37: 67–90.

- Ribeiro D (1995) O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. São Paulo. Companhia das letras.
- Ribeiro GGBL (2005) Contribuição genética masculina baseada em marcadores Y-específicos na constituição de quatro comunidades afrodescendentes brasileiras. Dissertação de mestrado. Programa de Biologia Animal. Universidade de Brasília.
- Ribeiro GGBL (2009) Análises Genéticas de marcadores do tipo STR e *indel* em cromossomos sexuais humanos em populações remanescentes de quilombos. Tese de doutorado. Programa de Biologia Animal. Universidade de Brasília.
- Rogers AR; Iltis D; Wooding S (2004) Genetic variation at the *MC1R* locus and the time since loss of human body hair. *Curr Anthropol* 45: 105–7.
- Ruff CB; Trinkaus E; Holliday TW (1997) Body mass and encephalization in Pleistocene Homo. *Nature* 387: 173–76.
- Ruff CB; Trinkaus E; Walker A; Larsen CS (1993) Postcranial robusticity in Homo, I: Temporal trends and mechanical interpretation. *Am J Anthropol* 91: 21–53.
- Santos SEB; Guerreiro JF (1995) The indigenous contribution to the formation of the population of the Brazilian amazon region. *Genetics and Molecular Biology* 18: 311-315.
- Sanguinetti CJ; Dias Neto E; Simpson AJ (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 914-21.
- Shriver MD; Smith MW; Jin L; Marcini A; Akey JM; Deka R; Ferrel RE (1997) Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *AM J Hum Genet* 60: 957-964.



- Silva VS (1997) Do Mocambo de Pau Preto ao Rio das Rãs: liberdade e escravidão na construção de identidade negra de um quilombo contemporâneo. Dissertação de mestrado em Sociologia. Universidade Federal da Bahia.
- Silva WA Jr *et al.* (2002, 2003) Mitochondrial genome diversity of native Americans supports a single early entry of founder populations into America. *Am J Hum Genet* 71(1): 187-92. Comment in: *Am J Hum Genet* 72(5): 1341-6.
- Soares AA (1995) Kalunga: O direito de Existir, (Questões Antropológicas e Jurídicas sobre Remanescentes de Quilombo. Goiânia MinC/Fundação Cultural Palmares 235.
- Sobrino B; Brion M; Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 154: 181-94.
- Soejima M; Tachida H; Ishida T; Sano A; Koda Y (2006) Evidence for recent positive selection at the human AIM1 locus in a European population. *Mol Biol Evol* 23: 179-88.
- Soejima M; Koda Y (2007) Population differences of two coding SNPs in pigmentation related genes *SLC24A5* and *SLC45A2*. *Int J Legal Med* 121: 36-9.
- Solé X; Guinó E; Valls J; Iniesta R; Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Oxford Journals Life Sciences & Mathematics & Physical Sciences* 22(15): 1928-1929.
- Spichenok O; Budimlija ZM; Mitchell AA; Jenny A; Kovacevic L; Marjanovic D; Caragine T; Prinz M; Wurmbach E (2010) Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Science International Genetic* 658.

- Stokowski RP; Pant PVK; Dadd T; Fereday A; Hinds DA; Jarman C; *et al.* (2007) A Genomewide Association Study of Skin Pigmentation in a South Asian Population. *The American Journal of Human Genetics* 81(6): 1119-1132.
- Sturm RA (2006) A golden age of human pigmentation genetics. *Trends Genet* 22: 464-8.
- Sturm RA (2009) Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet* 18: R9-17.
- Sturm RA; Larsson M (2009) Genetics of Human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 544–562.
- Tang H; Choudhry S; Mei R; Morgan M; Rodriguez-cintron W; Burchard EG; Risch NJ (2007) *The American Journal of Human Genetics* 81.
- Tian C; Hinds DA; *et al.* (2007) A genomewide single-nucleotide-polymorphism panel for Mexican American admixture mapping. *Am J Hum Genet* 80(6): 1014-1023.
- Tully G (2007) Genotype versus phenotype: human pigmentation. *Forensic Sci Int Genet* 1: 105-10.
- Valenzuela RK *et al.* (2010) Predicting Phenotype from Genotype: Normal Pigmentation. *J Forensic Sci* 55: 315-322.
- Vila Real RNS (1996) *Cultura e Currículo: um estudo da escolar Kalunga*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
- Walsberg GE (1988) Consequences of skin color and fur properties for solar heat gain and ultraviolet irradiance in two mammals. *J Comp Physiol B* 158: 213–21.
- Walter H (1971) Remarks on the environmental adaptation of man. *Humangenetik* 13: 85–97.

- Wang S *et al.* (2008) Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4:3.
- Wassermann HP (1965) Human pigmentation and environmental adaptation. *Arch Environ Health* 11: 691–4.
- Wheeler PE (1984) The evolution of bipedality and loss of functional body hair in hominids. *J Hum Evol* 13: 91–98.
- Yamaguchi Y; Brenner M; Hearing VJ (2007) The regulation of skin pigmentation. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 27557–27561.
- Yuasa I *et al.* (2006) Distribution of the F374 allele of the *SLC45A2* (MATP) gene and founder-haplotype analysis. *Ann Hum Genet* 70: 802-11.

## **SÍTIOS DA INTERNET**

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo 2010, <http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/datas/indio/numeros.html> acessado em agosto de 2013.

FUNAI - Fundação Nacional do Índio, <http://www.funai.gov.br/index.html> acessado em agosto de 2013.

NCBI - National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> acessado em agosto de 2013.

## ANEXO 1

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília para a manipulação das amostras selecionadas.



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 151/07

Título do Projeto: ANCESTRABILIDADE BIOLÓGICA DE POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOLAS BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES LOCALIZADOS EM CROMOSSOMOS SEXUAIS E AUTOSSÔMICOS.

Pesquisador Responsável: Silviene Fabiana de Oliveira

Data de Entrada: 30/11/2007

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 151/2007 com o título: “Ancestrabilidade Biológica de Populações Remanescentes de Quilombolas Baseada em Marcadores Moleculares Localizados em Cromossomos Sexuais e Autoossômicos”, analisado na 11ª Reunião Ordinária, realizada no dia 11 de Dezembro de 2007.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 12 de Dezembro de 2008.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB

## ANEXO 2

Teste de desequilíbrio de ligação *locus a locus* realizado para as quatro populações miscigenadas. Apresentados apenas valores que indicam existência de DL. EP: erro padrão.

locus vs. locus		População								Total
		Kalunga		Mocambo		Rio das Rãs		Sacutiaba		
		<i>p</i>	EP	<i>p</i>	EP	<i>p</i>	EP	<i>p</i>	EP	
rs3756462	rs35394					0.00040	0.00019			1
rs181832	rs16891982	0.04059	0.00203			0.00000	0.00000			2
	rs3756462					0.04743	0.00223			1
rs26722	rs16891982			0.04248	0.00213			0.00396	0.00066	2
	rs35394	0.0000	0.0000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	4
	rs3756462			0.04208	0.00200	0.00069	0.00025			2
rs16891982	rs35394			0.00703	0.00084			0.00485	0.00065	2
Total		2		4		5		3		

**ANEXO 3**

Matriz de diferenciação populacional baseado em *Fst* para populações quilombolas brasileiras, analisadas para os marcadores do gene *SLC45A2*. Acima p-valor e erro padrão e abaixo valor de *Fst*.

	<b>Kalunga</b>	<b>Mocambo</b>	<b>Rio das Rãs</b>	<b>Sacutiaba</b>
<b>Kalunga</b>	0.00000	0.09108±0.0056	0.45837±0.0213	0.00043±0.0002
<b>Mocambo</b>	0.01700	0.00000	0.02112±0.0043	0.24071±0.0124
<b>Rio das Rãs</b>	-0.00481	0.01407	0.00000	0.00020±0.0001
<b>Sacutiaba</b>	0.05516	0.00677	0.05747	0.00000