



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISE GENÉTICA DE MARCADORES DO TIPO *STR* E
INDEL EM CROMOSSOMOS SEXUAIS HUMANOS EM
POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS**

Guilherme Galvarros Bueno Lobo Ribeiro

Brasília

2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISE GENÉTICA DE MARCADORES DO TIPO *STR* E
INDEL EM CROMOSSOMOS SEXUAIS HUMANOS EM
POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Genética.

Guilherme Galvarros Bueno Lobo Ribeiro

Brasília
2009

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Genética da Universidade de Brasília (UnB), de Ciências Genômicas da Universidade Católica de Brasília (UCB) e de Genética Forense da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com suporte financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FINATEC (Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos).

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silviene Fabiana de Oliveira

Guilherme Galvarros Bueno Lobo Ribeiro

**ANÁLISE GENÉTICA DE MARCADORES DO TIPO STR E
INDEL EM CROMOSSOMOS SEXUAIS HUMANOS EM
POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS**

Prof^a. Dr^a. Silviene Fabiana de Oliveira

Presidente/Orientadora

UnB

Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Examinador

USP

Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia

Examinador

UnB

Prof. Dr. Luzitano Brandão Ferreira

Examinador

UNICEUB

Prof. Dr. Juliana F Mazzeu de Araújo

Examinador

UnB

Ninguém ouviu
Um soluçar de dor
No canto do Brasil

Um lamento triste
Sempre ecoou
Desde que o índio guerreiro
Foi pro cativoiro
E de lá cantou

Negro entoou
Um canto de revolta pelos ares
No Quilombo dos Palmares
Onde se refugiou

Fora a luta dos Inconfidentes
Pela quebra das correntes
Nada adiantou

E de guerra em paz
De paz em guerra
Todo o povo dessa terra
Quando pode cantar
Canta de dor

E ecoa noite e dia
É ensurdecedor
Ai, mas que agonia
O canto do trabalhador

Esse canto que devia
Ser um canto de alegria
Soa apenas
Como um soluçar de dor

Canto Das Três Raças
Mauro Duarte e Paulo César Pinheiro

Nos antigos rincões da mata virgem
Foi um sêmen plantado com meu nome
A raiz de tão dura ninguém come
Porque nela plantei a minha origem
Quem tentar chegar perto tem vertigem
Ensinar o caminho, eu não sei
Das mil vezes que por lá eu passei
Nunca pude guardar o seu desenho
Como posso saber de onde venho
Se a semente profunda eu não toquei?

Esse longo caminho que eu traço
Muda constantemente de feição
E eu não posso saber que direção
Tem o rumo que firmo no espaço
Tem momentos que sinto que desfaço
O castelo que eu mesmo levantei
O importante é que nunca esquecerei
Que encontrar o caminho é meu empenho
Como posso saber de onde venho
Se a semente profunda eu não toquei?

Como posso saber a minha idade
Se meu tempo passado eu não conheço
Como posso me ver desde o começo
Se a lembrança não tem capacidade
Se não olho pra trás com claridade
Um futuro obscuro aguardarei
Mas aquela semente que sonhei
É a chave do tesouro que eu tenho
Como posso saber de onde venho
Se a semente profunda eu não toquei?

Tantos povos se cruzam nessa terra
Que o mais puro padrão é o mestiço
Deixe o mundo rodar que dá é nisso
A roleta dos genes nunca erra
Nasce tanto galego em pé-de-serra
E por isso eu jamais estranharei
Sertanejo com olhos de nissei
Cantador com suingue caribenho
Como posso saber de onde venho
Se a semente profunda eu não toquei?

Como posso pensar ser brasileiro
Enxergar minha própria diferença
Se olhando ao redor vejo a imensa
Semelhança ligando o mundo inteiro
Como posso saber quem vem primeiro
Se o começo eu jamais alcançarei
Tantos povos no mundo e eu não sei
Qual a força que move o meu engenho
Como posso saber de onde venho
Se a semente profunda eu não toquei?

E eu
Não sei o que fazer
Nesta situação
Meu pé...
Meu pé não pisa o chão

Sêmen
Mestre Ambrósio

DEDICATÓRIA

A todos que acreditaram, incentivaram e apoiaram a realização deste trabalho, meus pais Wilmar e Eleonora, especialmente, e aos membros das comunidades remanescentes de quilombos analisadas.

AGRADECIMENTOS

Sou grato pelo apoio, oportunidade, incentivo e ajuda oferecidos por todos aqueles que fizeram parte da minha vida nestes anos de intenso trabalho. Agradeço:

Minha família, por tudo.

Minha irmã Juliana e Sydney, pelo apoio incondicional e pela amizade.

Marina, pela companhia, incentivo e amor.

Meus primos Leonardo e Giovanna, Vó Lécia, Paty e Ramon, pela hospedagem, carinho e ajuda.

Dra. Silviene Fabiana de Oliveira, pela orientação exemplar e amizade.

Dr. Rodrigo Soares de Moura Neto e Dr. Rinaldo Wellerson Pereira, pelo espaço, material e tempo cedidos em seus laboratórios.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e à Universidade de Brasília, juntamente com os professores e funcionários, pelos ensinamentos recebidos e pela atenção despendida.

CAPES, CNPq e FINATEC, pelo apoio financeiro.

Meus amigos e amigas, colegas de infância, de laboratório, da universidade e do CNPq, pelos momentos que passamos juntos, pelas críticas, sugestões, ajuda, incentivo e colaboração.

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 CROMOSSOMOS SEXUAIS.....	5
1.2 MARCADORES GENÉTICOS.....	10
1.3 POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	28
HIPÓTESE E OBJETIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS ESTUDADAS.....	30
3.2 COLETA DE AMOSTRAS.....	31
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E EXTRAÇÃO DE DNA	32
3.4 MARCADORES GENÉTICOS	33
3.5 REAÇÃO DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)	37
3.6 REAÇÃO DE GENOTIPAGEM.....	39
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
VARIABILIDADE GENÉTICA	42
ANÁLISE DE DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR	42
MISTURA GENÉTICA	43
ÍNDICE DE ANCESTRALIDADE AFRICANA	44
3.8 GENÉTICA E QUILOMBOS	45
INDELS DO CROMOSSOMO X	46
4 RESULTADOS	47
4.1 VARIABILIDADE GENÉTICA.....	47
4.2 ANÁLISE DE DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR.....	56
4.3 MISTURA GENÉTICA	59
4.4 ÍNDICE DE ANCESTRALIDADE AFRICANA	64
5 DISCUSSÃO	67
5.1 VARIABILIDADE GENÉTICA.....	68
5.2 ANÁLISE DE DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR.....	73

5.3	MISTURA GENÉTICA	76
5.4	ÍNDICE DE ANCESTRALIDADE AFRICANA	81
	<u>STRS DO CROMOSSOMO Y</u>	<u>84</u>
6	<u>RESULTADOS</u>	<u>85</u>
6.1	VARIABILIDADE GENÉTICA	85
6.2	ANÁLISE DE DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR.....	98
6.3	MISTURA GENÉTICA	101
7	<u>DISCUSSÃO</u>	<u>105</u>
7.1	VARIABILIDADE GENÉTICA	106
7.2	ANÁLISE DE DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR.....	111
7.3	MISTURA GENÉTICA	113
8	<u>CONCLUSÃO.....</u>	<u>120</u>
	<u>GENÉTICA E QUILOMBOS</u>	<u>123</u>
9	<u>CONTEXTUALIZAÇÃO</u>	<u>124</u>
10	<u>CONCLUSÃO.....</u>	<u>143</u>
11	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u>	<u>145</u>
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>147</u>
	<u>ANEXO A:</u>	<u>159</u>
	<u>ANEXO B:.....</u>	<u>160</u>
	<u>ANEXO C:</u>	<u>162</u>

SUMÁRIO DE FIGURAS

FIGURA 1: PRINCIPAIS ORIGENS E DESTINOS DO TRÁFICO DE ESCRAVOS PARA O BRASIL (FONTE: UNESCO, 2000).	23
FIGURA 2: MAPA DO BRASIL REPRESENTANDO EM VERMELHO AS REGIÕES MAIS DENSAMENTE OCUPADAS POR REMANESCENTES DE QUILOMBOS (ANJOS, 2009).	25
FIGURA 3: ESTRUTURA DO CROMOSSOMO X HUMANO E LOCALIZAÇÃO APROXIMADA, NO MESMO, DAS INDELS OBJETOS DE ESTUDO DESTES TRABALHOS (BASEADO EM SZIBOR <i>ET AL.</i> , 2006).	33
FIGURA 4: ESTRUTURA DO CROMOSSOMO Y HUMANO E LOCALIZAÇÃO DE ALGUNS STRS (FONTE: SHORT TANDEM REPEAT DNA INTERNET DATABASE HTTP://WWW.CSTL.NIST.GOV/DIV831/STRBASE/YSTRPOS1.HTM ACESSADO EM MAIO DE 2009).	34
FIGURA 5: ELETROFEROGRAMA DEMONSTRANDO A MULTIPLEXAÇÃO DO SISTEMA ORIGINAL DE OITO INDELS DO CROMOSSOMO X EM TRÊS INDIVÍDUOS DIFERENTES (MONTEIRO, 2007). DESTACA-SE QUE AS DUAS PRIMEIRAS AMOSTRAS SÃO FEMININAS E A TERCEIRA MASCULINA. AS INDELS IDENTIFICADAS POR IDX015 E IDX016 FORAM EXCLUÍDAS DO PROCESSO DE ANÁLISE.	40
FIGURA 6: ELETROFEROGRAMA DEMONSTRANDO A MULTIPLEXAÇÃO DO SISTEMA <i>POWERPLEX® Y</i> DE DOZE STRS DO CROMOSSOMO Y E SEUS RESPECTIVOS ALELOS (SCHILZ <i>ET AL.</i> , 2006).	41
FIGURA 7: DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS <i>LOCI</i> INDEL NAS QUATRO COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS, NA POPULAÇÃO URBANA BRASILEIRA (MONTEIRO, 2007) E NOS TRÊS GRUPOS PARENTAIS (HUMAN GENOME DATABASE OF SNPs HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PROJECTS/GENOME/GUIDE/HUMAN/ ACESSADO EM ABRIL DE 2009).	50
FIGURA 8: REDE DA RELAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE OS HAPLÓTIPOS OBSERVADOS NAS COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS FORMADA PARA OS MARCADORES INDELS DO CROMOSSOMO X.	55
FIGURA 9: GRÁFICO DE MISTURA GENÉTICA NOS REMANESCENTES DE QUILOMBOS E NO BRASIL A PARTIR DE ESTIMATIVAS OBTIDAS PARA DADOS DE INDELS DO CROMOSSOMO X.	62
FIGURA 10: ÁRVORE FILOGENÉTICA EM UPGMA REPRESENTANDO A RELAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE AS COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS E AS DEVIDAS POPULAÇÕES PARENTAIS OBTIDA A PARTIR DE DADOS DE INDELS DO CROMOSSOMO X.	63
FIGURA 11: GRÁFICO MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DOS ÍNDICES DE ANCESTRALIDADE AFRICANA (IAA) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS MASCULINAS PERTENCENTES ÀS QUATRO COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS. CADA CAIXA REPRESENTA OS VALORES MAIS CENTRAIS DA DISTRIBUIÇÃO, SENDO QUE O TRAÇO INTERNO SE REFERE À MEDIANA E OS LIMITES INFERIOR E SUPERIOR REPRESENTAM O PRIMEIRO E O TERCEIRO QUARTIS, RESPECTIVAMENTE. EM MOCAMBO A MEDIANA COINCIDIU COM O LIMITE INFERIOR DA CAIXA DE DISTRIBUIÇÃO. OS RISCOS FORA DOS QUARTIS REFEREM-SE AOS VALORES EXTREMOS ENCONTRADOS NA OBSERVAÇÃO.	65
FIGURA 12: GRÁFICO MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DOS ÍNDICES DE ANCESTRALIDADE AFRICANA (IAA) OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS FEMININAS PERTENCENTES ÀS QUATRO COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS.	66
FIGURA 13: REDE REPRESENTATIVA DA RELAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE OS HAPLÓTIPOS OBSERVADOS NAS COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS FORMADA PARA OS MARCADORES STRS Y-ESPECÍFICOS.	98
FIGURA 14: GRÁFICO DE MISTURA GENÉTICA NOS REMANESCENTES DE QUILOMBOS E NO BRASIL A PARTIR DE ESTIMATIVAS OBTIDAS PARA DADOS DOS MARCADORES STR Y-ESPECÍFICOS.	103
FIGURA 15: ÁRVORE FILOGENÉTICA EM UPGMA REPRESENTANDO A RELAÇÃO EVOLUTIVA ENTRE AS COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS E AS DEVIDAS POPULAÇÕES PARENTAIS OBTIDA A PARTIR DE DADOS DOS MARCADORES STR Y-ESPECÍFICOS.	104
FIGURA 16: LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA APROXIMADA DAS COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS DO BRASIL E DA VENEZUELA JÁ ESTUDADAS. O MAPA FOI MONTADO A PARTIR DA BASE OBTIDA POR MEIO DO SOFTWARE <i>GOOGLEEARTH®</i> , DISPONIBILIZADO GRATUITAMENTE NA REDE MUNDIAL DE COMPUTADORES.	125
FIGURA 17: REGIÕES GEOGRÁFICAS DA AMÉRICA LATINA DIVIDIDAS DE ACORDO COM O PROCESSO DE COLONIZAÇÃO DESTES CONTINENTES. O MAPA FOI MONTADO A PARTIR DA BASE OBTIDA POR MEIO DO SOFTWARE <i>GOOGLEEARTH®</i> , DISPONIBILIZADO GRATUITAMENTE NA REDE MUNDIAL DE COMPUTADORES.	138

SUMÁRIO DE TABELAS

TABELA 1: COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES TIPOS DE MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS NOS ESTUDOS POPULACIONAIS (SCHAFFNER, 2004).	12
TABELA 2: COMPOSIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL (%) DA POPULAÇÃO BRASILEIRA BASEADA EM DADOS GENÉTICOS* PRODUZIDOS POR BARCELOS (2006), CARVALHO-SILVA <i>ET AL</i> (2001) E ALVES-SILVA <i>ET AL</i> (2000) PARA O LINHAGENS UNIPARENTAIS.	21
TABELA 3: ESTADOS BRASILEIROS COM O MAIOR NÚMERO DE COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS OBSERVADAS NO SEGUNDO CADASTRO MUNICIPAL DOS TERRITÓRIOS QUILOMBOLAS DO BRASIL (ANJOS, 2009).	26
TABELA 4: INFORMAÇÃO DEMOGRÁFICA, GEOGRÁFICA E AMOSTRAL DAS POPULAÇÕES AFRO DESCENDENTES ANALISADAS.	31
TABELA 5: INFORMAÇÕES SOBRE AS ÍNDELS DO CROMOSSOMO X SELECIONADAS PARA ESSE TRABALHO: ALTERNATIVAS ALÉLICAS, LOCALIZAÇÃO CITOGÉNÉTICA, SEQÜÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E RESPECTIVOS FLUOROCROMOS, CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS (PB) E AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS PARA CADA INICIADOR (μM).	35
TABELA 6: INFORMAÇÕES SOBRE OS MARCADORES Y-STR SELECIONADOS PARA ANÁLISE: COORDENADA CITOGÉNÉTICA, SEQÜÊNCIA CERNE DE REPETIÇÃO, VARIAÇÃO ALÉLICA, TAMANHO DO FRAGMENTO, FLUOROCROMO E REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.	36
TABELA 7: RECEITA DAS MISTURAS DE REAGENTES (EM μL) UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS VIA PCR PARA OS SISTEMAS DE MULTIPLEXAÇÃO DOS CROMOSSOMOS X E Y ANALISADOS.....	38
TABELA 8: CONDIÇÕES DA PCR PARA OS SISTEMAS DE MULTIPLEXAÇÃO DO CROMOSSOMO X E Y... 39	
TABELA 9: DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE CADA UMA DAS ÍNDELS ANALISADAS PARA AS COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS; HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA (H_O) E ESPERADA (H_E); E DADOS ESTATÍSTICOS REFERENTES AS PROPORÇÕES GENOTÍPICAS.	48
TABELA 10: DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO CROMOSSOMO X NOS REMANESCENTES DE QUILOMBOS ANALISADOS.	52
TABELA 11: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) OBTIDOS PARA OS CONJUNTOS AMOSTRAIS DAS POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS (RQ) E TAMBÉM PARA A COMPARAÇÃO DESSAS COM DADOS DA POPULAÇÃO URBANA BRASILEIRA.	57
TABELA 12: ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA CADA ÍNDEL DO CROMOSSOMO X OBTIDA NA COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS DAS POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS (RQ) E ENTRE ESTAS E DADOS DA POPULAÇÃO BRASILEIRA (BR - MONTEIRO, 2007). V_{INTRA} SIGNIFICA VARIAÇÃO INTRAPOPULACIONAL.	58
TABELA 13: ESTIMATIVAS DE F_{ST} PARA OS PARES DE POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS E BRASILEIRA. A DIAGONAL INFERIOR APRESENTA AS ESTIMATIVAS DE F_{ST} E A DIAGONAL SUPERIOR OS VALORES DE P CORRESPONDENTES.	58
TABELA 14: DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS ALELOS DE INSERÇÃO DE CADA UMA DAS ÍNDELS ANALISADAS PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA E PARA AS REPRESENTANTES PARENTAIS DOS REMANESCENTES DE QUILOMBOS (NCBI SNP <i>DATABASE</i> , 2009; MONTEIRO, 2007).....	59
TABELA 15: ESTIMATIVAS DE MISTURA GENÉTICA GERADAS PELO PROGRAMA <i>ADMIX</i> (CHAKRABORTY, 1985), UTILIZANDO DADOS DOS MARCADORES ÍNDELS PARA OS QUATRO REMANESCENTES DE QUILOMBOS E PARA A AMOSTRA DA POPULAÇÃO URBANA BRASILEIRA (MONTEIRO, 2007).....	60
TABELA 16: ESTIMATIVAS DE MISTURA GENÉTICA GERADAS PELO PROGRAMA <i>ADMIX</i> (CHAKRABORTY, 1985), UTILIZANDO DADOS DOS MARCADORES ÍNDELS PARA AS AMOSTRAS MASCULINAS DOS QUATRO REMANESCENTES DE QUILOMBOS.	61
TABELA 17: ESTIMATIVAS DE MISTURA GENÉTICA GERADAS PELO PROGRAMA <i>ADMIX</i> (CHAKRABORTY, 1985), UTILIZANDO DADOS DOS MARCADORES ÍNDELS PARA AS AMOSTRAS FEMININAS DOS QUATRO REMANESCENTES DE QUILOMBOS.	62
TABELA 18: DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE CADA UM DOS STR Y-ESPECÍFICOS ANALISADOS PARA AS COMUNIDADES REMANESCENTES DE QUILOMBOS, ASSIM COMO PARA AS POPULAÇÕES PARENTAIS E A POPULAÇÃO URBANA BRASILEIRA.	86

TABELA 19: DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO CROMOSSOMO Y NOS REMANESCENTES DE QUILOMBOS ANALISADOS.	95
TABELA 20: RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) RELATIVAS A DISTRIBUIÇÃO HAPLOTÍPICA DOS MARCADORES MICROSATÉLITES DO CROMOSSOMO Y OBTIDAS PARA AS POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS (RQ) E TAMBÉM PARA A COMPARAÇÃO ENTRE ESSAS E A POPULAÇÃO BRASILEIRA.	99
TABELA 21: ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA CADA STR DO CROMOSSOMO Y OBTIDA NA COMPARAÇÃO ENTRE OS DADOS DAS POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS (RQ). V_{INTRA} SIGNIFICA VARIAÇÃO INTRAPOPULACIONAL.	100
TABELA 22: ESTIMATIVAS DE F_{ST} PARA OS PARES DE POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS CALCULADAS A PARTIR DE DADOS HAPLOTÍPICOS. A DIAGONAL INFERIOR APRESENTA AS ESTIMATIVAS DE F_{ST} E A DIAGONAL SUPERIOR OS VALORES DE P CORRESPONDENTES.	100
TABELA 23: ESTIMATIVAS DE MISTURA GENÉTICA GERADAS PELO PROGRAMA <i>ADMIX</i> (CHAKRABORTY, 1985), UTILIZANDO DADOS DOS MARCADORES STR Y-ESPECÍFICOS PARA OS REMANESCENTES DE QUILOMBOS E PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA (GRATTAPAGLIA <i>ET AL.</i> , 2004).	101
TABELA 24: CONTRIBUIÇÃO PARENTAL AFRICANA, EUROPÉIA E AMERÍNDIA EM REMANESCENTES DE QUILOMBOS DO BRASIL ESTIMADAS A PARTIR DE DADOS DE MARCADORES CLÁSSICOS.	127
TABELA 25: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL PARA A FORMAÇÃO DE POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS POR MEIO DE MARCADORES STRS AUTOSSÔMICOS (PEDROSA, 2006).	128
TABELA 26: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL PARA A FORMAÇÃO DE POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS POR MEIO DE MARCADORES AIMS AUTOSSÔMICOS (PEDROSA, 2006).	129
TABELA 27: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL PARA A FORMAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS ANALISADAS POR MEIO DE MARCADORES BIALÉLICOS DO CROMOSSOMO Y (RIBEIRO, 2005; ABE-SANDES <i>ET AL.</i> , 2004).	130
TABELA 28: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL PARA A FORMAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS ANALISADAS POR MEIO DE MARCADORES DO DNAMT (FERREIRA, 2006; SILVA JR <i>ET AL.</i> , 2006; ABE-SANDES <i>ET AL.</i> , 2004).	131
TABELA 29: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL OBSERVADA PARA QUATRO POPULAÇÕES REMANESCENTES DE QUILOMBOS POR MEIO DA MÉDIA ENTRE AS CONTRIBUIÇÕES DA LINHAGEM MATERNA E PATERNA.	132
TABELA 30: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL OBSERVADO PARA QUATRO REMANESCENTES DE QUILOMBOS POR MEIO DE APROXIMAÇÕES MATEMÁTICAS ENTRE AS CONTRIBUIÇÕES OBTIDAS PARA OS DADOS DE MARCADORES BIALÉLICOS DOS CROMOSSOMOS X E Y.	134
TABELA 31: CONTRIBUIÇÃO PARENTAL AFRICANA, EUROPÉIA E AMERÍNDIA EM REMANESCENTES DE QUILOMBOS ESTIMADAS A PARTIR DE TODOS OS DADOS COMPARÁVEIS OBTIDOS NO LEVANTAMENTO DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS ANALISADOS GENETICAMENTE POR MEIO DO PROGRAMA <i>ADMIX</i> (CHAKRABORTY, 1985).	136
TABELA 32: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL PARA A FORMAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS DE CADA UMA DAS REGIÕES ADMINISTRATIVAS BRASILEIRAS E VENEZUELANA.	139
TABELA 33: PERCENTUAL DE CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA ANCESTRAL PARA A FORMAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE REMANESCENTES DE QUILOMBOS DE CADA UMA DAS REGIÕES DIVIDIDAS QUANTO AOS PERÍODOS COLONIAIS.	141

RESUMO

Apesar do fim da escravidão ter ocorrido há mais de um século, ainda existem algumas comunidades rurais afro derivadas isoladas no Brasil, assim como em outros países da América do Sul. Estas são conhecidas como remanescentes de quilombos e foram fundadas, principalmente, por escravos fugitivos durante o período de escravidão. A composição genética de populações afro derivadas brasileiras é pouco estudada e, com o objetivo de aprimorar o conhecimento acerca dessas populações, doze marcadores STRs do cromossomo Y – kit PowerPlex® Y, e seis Indels do cromossomo X foram analisados geneticamente em quatro remanescentes de quilombos brasileiros – Mocambo, Rio das Rãs, Kalunga e Riacho de Sacutiaba, para estimar parâmetros populacionais, como a contribuição genética ancestral na constituição dessas comunidades. De um total de 118 cromossomos Y analisados, foram identificados 85 haplótipos diferentes e apenas um foi compartilhado entre duas ou mais populações. As análises do cromossomo X resultaram em apenas 53 haplótipos para os 321 cromossomos e a maioria deles foi compartilhada entre as comunidades. Os dados de estrutura populacional indicaram diferenças entre as populações para ambas as análises ($F_{st}Y = 0,0296$, $P < 0,05$; $F_{st}X = 0,0014$ $P < 0,05$), as quais foram estatisticamente corroboradas por dados de oito STRs e apenas duas Indels, respectivamente. Esta diversidade genética pode ser explicada pelo fluxo gênico e mutações, que introduziram ao acaso alternativas genéticas em cada comunidade. Finalmente, análises de mistura genética indicaram a participação de grupos não africanos na constituição dessas quatro populações afro derivadas para as distribuições de ambos os cromossomos sexuais. A contribuição européia e ameríndia pode ser explicada pelo cruzamento direcional entre homens euro descendentes e mulheres escravas africanas antes da fundação destas comunidades, o que pode ter ocasionado efeitos de fundador, e também pelo fluxo gênico. As análises do cromossomo X e Y complementaram outros estudos genéticos realizados com estas mesmas comunidades e aprimoraram o conhecimento sobre as populações afro derivadas por meio de dados genéticos peculiares que apenas estes cromossomos podem fornecer. Além disso, este trabalho demonstrou a utilidade de ferramentas forenses na complementação de dados de análises genético populacionais.

ABSTRACT

Despite the end of slavery happened more than a century ago, there are still some rural Afro-derived isolated communities in Brazil, as in other South American countries. They are known as *quilombos`* remnants and were founded, mainly, by fugitive slaves during the slavery period. The genetic constitution of Afro-derived Brazilian populations is barely studied and in order to improve knowledge about those populations, we investigated twelve Y-chromosome STRs - PowerPlex® Y kit, and six X-chromosome Indels to estimate population genetics parameters, such as ancestral contribution in the constitution of four Brazilian *quilombos`* remnants - Mocambo, Rio das Rãs, Kalunga and Riacho de Sacutiaba. In a total of 118 Y-chromosome analyzed, 85 different haplotypes were identified and only one was shared between two or more communities. X-chromosome data indicated only 53 haplotypes for 321 analyzed chromosomes and the majority of them was shared among communities. Population comparison indicated genetic differences between those populations for both analyses ($F_{st}Y = 0.0296$, $P < 0.05$; $F_{st}X = 0.0014$ $P < 0.05$), which were statistically supported by eight STRs data and only two Indels, respectively. This genetic diversity might be explained by gene flow and mutation, which introduced random genetic alternatives to each community. Finally, *ADMIXture* analyses also indicated non-African contribution in the constitution of those four Afro-derived populations for both sexual chromosomes distributions. European and Amerindian contribution might be explained by directional mating between European males and African female slaves before the foundation of those communities, which might had led to founder effects, and also by gene flow. The analyses of X and Y chromosomes complemented other genetic studies performed for those communities and improved knowledge about afro-derived population genetics through unique genetic parameters that only these chromosomes can reach. Besides that, this survey was useful to introduce forensic tools to population genetics in order to complement genetic analyses.

1. INTRODUÇÃO

O campo da genética de populações surgiu entre as décadas de 1920 e 1930 graças a Ronald Fisher, John Burdon Sanderson Haldane e Sewall Wright. Os trabalhos destes pesquisadores forneceram embasamento suficiente para a criação da Teoria Sintética da Evolução ou Síntese Evolutiva Moderna. Esta pode ser compreendida basicamente por princípios que aliam a teoria da evolução das espécies de Charles Darwin às leis de herança biológica de Gregor Mendel e à própria genética populacional. Esta última está fundamentada na descrição da variabilidade genética existente e na investigação dos mecanismos que a influenciam. Para isso, os trabalhos baseiam-se na observação da distribuição dos polimorfismos genéticos de indivíduos pertencentes a uma determinada população e suas variações sob a influência de forças evolutivas como seleção natural, deriva genética, mutação e fluxo gênico.

No contexto histórico, os estudos envolvendo populações, até a década de 1980, eram fundamentados nas análises das características demográficas e nos dados de polimorfismos protéicos. Foram utilizados diversos tipos de marcadores clássicos, como os grupos sanguíneos - ABO e RH, proteínas e enzimas séricas e eritrocitárias, imunoglobulinas e sistemas de histocompatibilidade (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). Porém, o avanço científico permitiu a ampliação do espectro de ação das análises genéticas, visto que, como afirmado por Coon (1965), a constituição genética individual apresenta uma variação igual ou superior à variabilidade morfológica, até então o alvo dos estudos genéticos. Portanto, o acesso a estas informações pôde auxiliar evolucionistas e, ainda, consiste na maior fonte geradora de conhecimento científico acerca dos seres vivos e dos seus mecanismos biológicos.

Esta hipótese defendida por Coon (1965) pôde ser melhor avaliada com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, ou seja, estes avanços permitiram estudar a variabilidade genética do ácido desoxirribonucléico - DNA. Os resultados obtidos com o emprego de marcadores genéticos polimórficos de DNA permitiram concluir que os dados protéicos e morfológicos, realmente, consistiam apenas em uma subestimativa da variabilidade genética real. Portanto, esta

metodologia, em um contexto geral, tornou-se um importante instrumento no auxílio ao entendimento das relações evolutivas populacionais (Ribeiro *et al.*, 2009; Abe-Sandes *et al.*, 2004; Silva Jr. *et al.*, 1999), no diagnóstico de patologias humanas (Bydlowski *et al.*, 1996), identificação humana (Silva e Moura-Neto, 1998; Jeffreys *et al.*, 1985) e mapeamento genético (Telenius *et al.*, 1990; Donis-Keller *et al.*, 1987).

Estes avanços na área de biologia molecular foram acompanhados por novas metodologias estatísticas. Essas visam comparar os padrões mais prováveis de variação genética em populações reais com dados empíricos, tornando possível a exploração mais precisa de novas hipóteses evolutivas, como a quantificação do grau de diferenciação dentro e entre as populações ou, até mesmo, a contribuição genética ancestral na formação de uma determinada população.

O melhor conhecimento do processo evolutivo é o cerne de todas as pesquisas no ramo da genética de populações humanas. Desta forma, os avanços científicos trouxeram a possibilidade de avaliação e estudo de uma das questões mais pertinentes do homem moderno, a de conhecer a história de sua dispersão pela Terra.

A biogeografia vem sendo bastante utilizada em estudos populacionais, a qual é baseada na premissa de que a distribuição geográfica da população humana é compatível com modelos de estruturação genética (Rosenberg *et al.*, 2002). Portanto, não apenas as características morfológicas variam de acordo com a distribuição geográfica, mas também as freqüências alélicas de determinadas regiões genômicas.

Os polimorfismos genéticos ocorrem quando as regiões genômicas apresentam duas ou mais alternativas alélicas. O conceito de alelo é empregado para qualquer variante da seqüência de nucleotídeos de um determinado *locus* do DNA. Salienta-se que, em termos práticos, o polimorfismo de um determinado marcador genético deve ser considerado como existente apenas se o seu alelo mais freqüente não ocorrer em mais de 99% dos casos (Kendrew, 1994).

Visto isso, é possível acessar a constituição genética populacional por meio dos marcadores genéticos e estimar a mistura genética, determinando a contribuição de cada grupo parental para a formação da população de interesse com base nas

freqüências alélicas e haplotípicas desses marcadores. Estes também podem ser utilizados em estudos de filogenia, nos quais objetiva-se agrupar duas ou mais populações em função das suas freqüências alélicas, ou melhor, da similaridade dessas freqüências. Além disso, estudos populacionais baseados em tecnologia de DNA constituem uma fonte de dados que permitem inferir sobre eventos que ocorreram no passado, como efeitos de gargalos populacionais, efeitos de fundador, migrações e expansões demográficas (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).

Ultimamente, os diversos grupos de genética de populações vêm alterando os seus focos para análises de marcadores antes negligenciados. Marcadores presentes no DNA mitocondrial (DNAmt) e, mais recentemente, nos cromossomos sexuais (X e Y) estão sendo amplamente avaliados para diversas populações e com vários objetivos.

Com relação aos estudos de genética de populações que envolvem a análise de populações ditas sensíveis por estarem semi-isoladas, como ameríndias e remanescentes de quilombos, é interessante notar que estas estão cada vez mais expostas aos efeitos da miscigenação provocados pelo fluxo gênico que vem se intensificando com o passar do tempo. Torna-se, portanto, urgente a análise destas populações, com o intuito de melhor acessar os prováveis dados genéticos preservados nestas populações que serão úteis para auxiliar o melhor entendimento do passado histórico brasileiro.

1.1 Cromossomos Sexuais

Há menos de 300 milhões de anos, os cromossomos definidores do sexo masculino e feminino começaram a evoluir de um par "ordinário" de cromossomos idênticos em um organismo assexuado (Lahn e Page, 1999). Mudanças em um gene de um dos cromossomos deste par originaram a cascata molecular que levou ao dimorfismo sexual e, na seqüência, à degeneração do cromossomo Y em seu estado atual em humanos (Ross *et al.*, 2005).

As características ancestrais que eram compartilhadas entre o cromossomo X e o Y foram praticamente erradicadas pelo processo evolutivo. Citogeneticamente, o cromossomo Y constitui-se em um grande bloco heterocromático que pode variar de

tamanho entre indivíduos e é consideravelmente menor que o X, que, por sua vez, apresenta uma porção eucromática seis vezes maior que a do Y. Além disso, apenas 58 genes do X apresentam homologia com o Y (Ross *et al.*, 2005). A história evolutiva destes cromossomos, portanto, foi trilhada por diferentes caminhos, enquanto o cromossomo Y perdia o seu conteúdo genético, o X mantinha as suas características autossômicas primordiais. Esse é o cromossomo, entre os mamíferos placentários, fisicamente mais estável do conjunto nuclear e, além disso, é o único a manter sintonia completa de larga escala entre os humanos e os roedores (Schaffner, 2004).

Na espécie *Homo sapiens*, assim como nos demais mamíferos, o sexo masculino é o heterogamético (XY). O cromossomo Y humano é pequeno (60 Mpb – pares de bases nitrogenadas), representa somente 2% do genoma humano (Morton, 1991), apresenta poucos genes funcionais, porém, um excesso de seqüências repetitivas que equivale a 50% deste. Estas repetições localizam-se principalmente na região da heterocromatina e no centrômero (Smith *et al.*, 1987). O cromossomo Y é herdado de forma uniparental por via paterna e exclusivamente transmitidos à prole masculina. Este é, em quase sua totalidade, não recombinante, exceto nas regiões terminais dos braços que são conhecidas como regiões pseudoautossômicas que realizam troca de material genético com o seu par cromossômico, o X. Por isso, a transmissão caracteriza-se por ser em bloco, ou melhor, em haplótipos cromossômicos, uma vez que alterações derivadas da recombinação não ocorrem na maior parte do corpo cromossômico.

No processo de replicação do DNA, que ocorre de uma geração para outra, alguns erros, entretanto, ocorrem ao acaso. Como o cromossomo Y praticamente não realiza *crossing-over*, estes erros são basicamente a única forma de mudança no genoma deste cromossomo que poderá ser transmitido para a próxima geração. Algumas dessas mutações, com o passar das gerações, aumentam de freqüência na população e a região passa a apresentar polimorfismo principalmente devido aos efeitos da deriva genética (Futuyma, 1998). A análise destas mudanças dentro de regiões Y-específicas pode nos revelar a genealogia paterna e as relações evolutivas entre diferentes grupos de indivíduos (Bradman e Thomas, 1998; Hammer, 1995).

O acúmulo seqüencial de mutações ao longo do tempo levou à constituição de linhagens independentes, caracterizadas por um conjunto de alelos de diferentes marcadores Y-específicos denominados de haplogrupos (Maca-Meyer *et al.*, 2001). Logo, se indivíduos compartilham o mesmo haplogrupo do cromossomo Y, estes, provavelmente, o fazem por ancestralidade comum, pois, o cromossomo Y de um homem representa a história única de sua linhagem patrilinear. Este cromossomo é uma das ferramentas genéticas mais analisadas atualmente, suas peculiaridades chamaram a atenção de um grupo de cientistas que conseguiram construir uma árvore genealógica de marcadores Y-específicos de evento único e correlacionaram as suas mutações com regiões geográficas, formando o que hoje se conhece como o consórcio do cromossomo Y (YCC, 2002).

O cromossomo X, por sua vez, também apresenta características biológicas únicas criadas pela sua evolução biológica. As mulheres normalmente herdam uma cópia do cromossomo X de cada pai, enquanto que os homens herdam apenas uma cópia, a materna. Possui aproximadamente 155 Mpb e representa cerca de 5% do genoma de células femininas humanas e, conseqüentemente, 2,5% de células masculinas. Apresenta poucos genes - 1.098, em comparação a outros cromossomos, os quais possuem uma média de 7,1 genes/Mb, e os *exons* representam apenas 1,7% do seu tamanho. A quantidade de regiões repetitivas, assim como o Y, também é alta - 56% de todo o DNA deste cromossomo, em comparação a média do genoma. Além disso, um total de 62.334 SNPs – *Single-Nucleotide Polymorphism*, já foram identificados no cromossomo X (Ross *et al.*, 2005).

Diferentemente do cromossomo Y, o X realiza recombinação quando presente o seu par homólogo. Este processo ocorre basicamente nas mulheres, pois, quando presente nos homens, este cromossomo geralmente apresenta-se em estado hemizigótico. O processo de herança do cromossomo X leva a um quadro de evolução do seu genoma peculiar em relação aos demais, uma vez que basicamente em 1/3 do tempo ele permanece em células masculinas, sob o comportamento de um cromossomo hemizigótico, e 2/3, em células femininas, sob comportamento autossômico.

O cromossomo X apresenta uma diversidade genética relativamente pequena. Isto se deve ao seu padrão de herança aliado às baixas taxas de mutação que, sabidamente, são maiores em células de linhagens masculinas, devido ao número maior de mitoses que estas são submetidas. O seu tamanho efetivo populacional - $\frac{3}{4}$ de um autossômico, também contribui para a sua baixa diversidade (Schaffner, 2004).

Outra consequência do reduzido tamanho efetivo populacional deste cromossomo é que a deriva genética ocorre mais rapidamente do que nos autossômicos. Tendo isto em vista, a estruturação populacional deve ser mais sensível aos dados de marcadores do cromossomo X, ou seja, as populações analisadas devem se diferenciar mais em seus cromossomos X do que nos autossômicos (Schaffner, 2004). Tais peculiaridades devem sempre ser consideradas, pois apesar de tornar este cromossomo uma ferramenta genética complementar, obriga análises mais complexas e cuidadosas.

Curiosamente, apesar da pequena quantidade de genes em seu genoma, uma quantidade desproporcionalmente alta de desordens genéticas já foi documentada e relacionada ao cromossomo X. Destas, 168 foram associadas a 113 genes ligados ao X, incluindo a Distrofia Muscular de Duchenne e a Hemofilia. A proporção de número de desordens por tamanho do cromossomo é muito alta ($\sim 2/\text{Mpb}$), a maior entre todos os cromossomos. A evolução do cromossomo X, ao contrário da do Y, manteve parte dos genes presentes durante a sua história. Aliado a isto, está o fato deste cromossomo estar presente em hemizigose em homens, o que leva a expressão mais fácil de genótipos recessivos, contribuindo assim para este grande número de desordens associadas descritas na literatura (Ross *et al.*, 2005).

Outra peculiaridade deste cromossomo é que as células da linhagem feminina no começo do processo de desenvolvimento sofrem um silenciamento aleatório de uma das cópias deste cromossomo que, posteriormente, permanece nesse estado, corpúsculo de Bahr, este processo é denominado por inativação do cromossomo X. Os genes presentes na região não recombinante apresentam um padrão de herança estritamente ligado ao X e alguns, como o *XIST*, ainda fogem à inativação (Ross *et al.*, 2005).

Diversos marcadores presentes no cromossomo X foram descobertos e passaram a ser utilizados para fins forenses (Hering e Szibor, 2000), como um eficiente instrumento de complementação de análises genéticas de marcadores autossômicos e Y específicos. O cromossomo X é útil, por exemplo, na resolução de casos envolvendo parentesco complicado (Edelmann *et al.*, 2002). Entretanto, o papel deste cromossomo na genética de populações é um tanto curioso, pois apesar de estar presente em uma única cópia em homens, o que permite conclusões similares às realizadas com o cromossomo Y, estudos envolvendo marcadores X-específicos eram raros até o final da década de 1990, muito provavelmente devido às suas peculiaridades biológicas, citadas acima, que dificultam suas análises.

A própria hemizigose, característica compartilhada entre o cromossomo Y e o DNAMt, explica a sua crescente utilização em estudos de variabilidade genética, especialmente naqueles que buscam analisar a história de determinada população humana. O estado hemizigótico aliado a transmissão uniparental são de grande utilidade em estudos evolutivos e de identificação humana (Jobling e Tyler-Smith, 1995), uma vez que um padrão de desequilíbrio de ligação compartilhado entre duas ou mais populações pode ser informativo acerca da determinação do ancestral comum mais recente entre estas comunidades, além de serem úteis na reconstrução histórica de eventos migracionais (Pereira e Pena, 2006; Tishkoff *et al.*, 2000).

O cromossomo X, apesar de conter muito mais informação genética que ambos, continua sendo preterido nestes estudos ao cromossomo Y e ao DNA mitocondrial. Tal situação pode ser explicada pelo atraso na geração de dados úteis para estudos comparativos. A primeira árvore filogenética do DNAMt de humanos foi publicada em 1987 (Cann *et al.*, 1987) e do cromossomo Y, em 1989 (Lucotte *et al.*, 1989), enquanto que os primeiros estudos detalhados do cromossomo X tiveram que aguardar o advento da tecnologia do seqüenciamento de DNA. Em 1998, foi publicado um trabalho sobre a diversidade de sete *loci* do cromossomo X em humanos focando evidências sobre a seleção natural (Nachman *et al.*, 1998) e, apenas em 1999, as primeiras árvores filogenéticas do cromossomo X foram produzidas (Harris e Hey, 1999).

Com a melhoria das técnicas de seqüenciamento e genotipagem, trabalhos científicos baseados na análise do cromossomo X foram ganhando espaço nos

periódicos com a melhoria das técnicas de seqüenciamento e genotipagem. Portanto, este é o momento crucial para estudos envolvendo o cromossomo X, uma vez que as técnicas estão bem estabelecidas e a sociedade científica está sedenta por novos conhecimentos acerca desta entidade genômica.

1.2 Marcadores Genéticos

Existem diferentes tipos de polimorfismos de DNA, que podem ser classificados de acordo com a natureza molecular e sua localização no genoma. A qualidade de um marcador genético para estudos de genética de populações depende de três características principais: o seu tempo de evolução, taxa de mutação e taxa de recombinação. A idade, ou tempo de evolução, de um *locus* corresponde à diferença temporal entre o momento da pesquisa e o do ancestral comum mais antigo, ou seja, define o período no qual suas variações genéticas ocorreram, delimitando assim o período histórico que pode ser investigado utilizando determinado *locus*. Estudos envolvendo populações humanas utilizam marcadores com escalas temporais de alguns milhares de anos para avaliar eventos históricos recentes, de 50.000 anos para avaliar a expansão do *Homo sapiens* para fora da África e de 100.000 a 200.000 anos para estudos sobre o surgimento de humano moderno.

A taxa de mutação pode transformar um marcador em não informativo tanto sendo muito baixa, como muito alta. No primeiro caso, a taxa, combinada com o pouco tempo de evolução, não permitirá que haja variação genética significativa no marcador. Entretanto, se a taxa for muito alta, assim como o tempo de evolução, mutações recorrentes poderão ter ocorrido em muitos nucleotídeos, o que tornará obscuro o processo de compreensão da relação entre os alelos. Na prática, as substituições de nucleotídeo simples apresentam taxas baixas o suficiente para tornar negligenciáveis a ocorrência de mutações recorrentes. A exceção está no DNAm_t, que evolui sob taxas maiores que o resto do genoma. Microsatélites, por outro lado, possuem taxas muito mais altas que tornam a ocorrência de mutações recorrentes problemáticas após poucas dezenas de milhares de anos (Schaffner, 2004).

Por último, a taxa de recombinação controla o tamanho de determinada região cromossômica que compartilha uma história genealógica única. Na ausência de recombinação, todo o cromossomo passa a pertencer a um único ramo da árvore filogeográfica. Por outro lado, a recombinação divide os cromossomos autossômicos e o X em regiões a cada geração, dificultando a reconstrução filogeográfica destes, tendo em vista que diferentes regiões cromossômicas representarão diferentes genealogias. Portanto, estudos histórico-evolutivos que envolvam análises de cromossomos que sofrem recombinação devem restringir-se a marcadores presentes em *loci* com alto desequilíbrio de ligação. A taxa de recombinação nas regiões pseudoautossômicas dos cromossomos X e Y é cerca de 20 vezes maior que a taxa média do genoma, por tal razão, marcadores desta região tendem a ser excluídos das análises genéticas (Schaffner, 2004).

As taxas de mutação e recombinação são determinadas biologicamente, enquanto que o tempo de evolução de um *locus* é baseado na aliança entre tamanho populacional e a deriva genética – populações maiores tendem a ter alternativas alélicas em *loci* neutros mais antigas por dificultarem o efeito da extinção de alelos ocasionado pela flutuação aleatória da frequência destes ao longo de gerações. A taxa de recombinação e o tempo de evolução são determinantes do tamanho do desequilíbrio de ligação que é observado entre pares de *loci*, uma vez que a recombinação, com o tempo, tende a quebrar este desequilíbrio genético (Schaffner, 2004).

O genoma celular humano pode ser dividido em intra e extra-nuclear, o primeiro ainda pode ser sub-dividido em cromossomos sexuais (X e Y) e autossômicos, enquanto que o material genético extra-nuclear é representado nos humanos apenas pelo DNA mitocondrial. Cada uma dessas subdivisões genéticas do genoma humano, utilizadas em genética de populações, foram comparados com relação a algumas características e estão disponíveis na tabela 1.

Os primeiros marcadores genéticos moleculares que foram utilizados visando o diagnóstico de patologias humanas (Bydlowski *et al.*, 1996), identificação humana (Silva e Moura-Neto, 1998; Jeffreys *et al.*, 1985) e mapeamento genético (Telenius *et al.*, 1990; Donis-Keller *et al.*, 1987) foram as variações no comprimento de fragmentos de restrição de DNA - RFLP (*Restriction Fragment Length*

Polymorphism). Atualmente, o método mais usado é o estudo de regiões repetitivas de DNA chamadas de minisatélites e microsátélites - *Short Tandem Repeats* ou STRs, variações no número de repetições *in tandem* (Pena e Chakraborty, 1994; Pena e Jeffreys, 1993). Mais recentemente, foram introduzidos na análise genética os marcadores bialélicos, destacam-se os abundantes polimorfismos de base única (SNPs; Hinds *et al.*, 2005) e os polimorfismos de inserção-deleção (Indels; Weber *et al.*, 2002), os quais têm emergido como alternativas interessantes nas análises de genética de população e forense.

Tabela 1: Comparação entre os diferentes tipos de marcadores genéticos utilizados nos estudos populacionais (Schaffner, 2004).

	Marcador			
	DNAmt	Cromossomo Y*	Cromossomo X*	Autossômicos
Tamanho (Mb)	0,017	60	150	3.000
Nº regiões analisáveis	1	1	centenas	milhares
Taxa de mutação (/Mb/geração)	1 - 300	0,003	0,015	0,020
Taxa de recombinação (cM/Mb)	0	0	0,8	1,1
Diversidade (%)	0,4	0,02	0,04	0,08
Haplótipos	Sim	Sim	Sim	Não
Deriva Genética	Alta	Alta	Moderada	Baixa
Tempo de Evolução	100.000	100.000	750.000	1.000.000
Tamanho Efetivo Populacional	¼	¼	¾	1

* Estes valores excluem as regiões pseudo-autossômicas dos cromossomos X e Y.

Determinados marcadores, em decorrência da diferença de freqüência entre dois grandes grupos populacionais - como europeus e africanos - ser superior a 50%, são considerados específicos de populações, denominados PSAs - *Population Specific Alleles*, ou mais recentemente, indicadores de ancestralidade, os AIMS - *Ancestry Informative Markers* (Shriver *et al.*, 1997). Salienta-se que qualquer marcador molecular pode ser um AIM, como marcadores do tipo Indels e SNPs, desde que apresente essa divergência entre as freqüências parentais.

Dentre os tipos de marcadores genéticos utilizados na análise populacional destacam-se principalmente: os próprios RFLPs (Donis-Keller *et al.*, 1987; Jeffreys *et al.*, 1985a); os elementos Alu, restritos a primatas, compostos por uma seqüência de aproximadamente 300 pares de nucleotídeos inseridos em regiões específicas do genoma e que consistem em um evento mutacional único, estável e unidirecional (Tishkoff *et al.*, 2000); os SNPs que também são eventos de modificação nucleotídica única (Underhill *et al.*, 2001) e estima-se que ocorra, aproximadamente, um SNP a cada mil bases ao longo do genoma humano (Hammer e Zegura, 2002; Nielsen, 2000); as Indels que, ao contrário dos SNPs, ainda não foram avaliadas com intensidade, apesar de responder por uma grande parcela da variação genética de uma espécie (Mills *et al.*, 2007); e os STRs que são as ferramentas genéticas do genoma humano mais comuns nas análises.

De acordo com a sua taxa de mutação, os marcadores polimórficos são classificados como de evolução lenta, caracterizados pela baixa taxa de mutação (10^{-7} a 10^{-9}), ou de evolução rápida, com elevada taxa de mutação, cerca de 0,2% por geração (Santos e Tyler-Smith, 1996). Estudos que buscam avaliar as relações mais ancestrais entre populações a partir de marcadores genéticos, requerem, preferencialmente, a análise de polimorfismos com baixa probabilidade de mutações recorrentes, onde o estado ancestral possa ser determinado. O tempo está diretamente relacionado ao aumento do número de mutações, o que leva, nos STRs, a uma quantidade cada vez maior de alternativas alélicas, tornando as análises de parentesco e ancestralidade por meio destes marcadores mais difíceis, devido às divergências no perfil genético e à imprecisão. Estes marcadores de alta taxa de mutação são ferramentas úteis em estudos genéticos de identificação individual ou que buscam avaliar eventos populacionais mais recentes, pois estes possuem uma diversidade alélica que em conjunto permitem a criação de perfis genéticos individuais e até mesmo populacionais.

Os STRs pertencem a uma classe de polimorfismos de DNA de evolução rápida (Kayser *et al.*, 2000), conhecida por satélites, caracterizada por repetições adjacentes de uma seqüência núcleo de dois ou mais nucleotídeos. Esta família de marcadores genéticos é dividida em três grandes grupos, são eles: os satélites, os minisatélites e os microsátélites, esta divisão é baseada, principalmente, no tamanho

da seqüência base que se repete ao longo do *locus* genômico (Charlesworth *et al.*, 1994).

Os microsátélites são repetições pequenas cujo núcleo possui de 2 a 10 nucleotídeos. As repetições variam geralmente entre 10 e 100 vezes. São encontrados nos genomas eucromáticos de vertebrados, insetos e plantas. O genoma humano apresenta no mínimo 30.000 microsátélites. São os marcadores genéticos mais utilizados em estudos populacionais, pois o número de repetições de cada microsátélite é bastante variável dentro e entre as populações (Drobic e Budowle, 2000; Charlesworth *et al.* 1994).

Os STRs apresentam outra peculiaridade perante os demais tipos de marcadores, eles são altamente polimórficos (Lins *et al.*, 1996; Ferreira e Grattapaglia, 1995). Uma provável causa destas variações nos *loci* STRs são mutações envolvendo a inserção ou deleção de unidades, ou parte delas, que alteram o número de repetições e conseqüentemente o tamanho do alelo (Drobic e Budowle, 2000). Como são seqüências repetitivas, é comum o sistema de replicação da célula cometer erros do tipo deslizamento - *slippage*, criando a mutação nos STRs e proporcionando pequenas mudanças na ordem das unidades de repetição (Pumpernik *et al.*, 2008).

Por serem caracterizados como *loci* hipervariáveis, codominantes, multialélicos (Ferreira e Grattapaglia, 1995) e com uma alta heterozigose (Hammer e Zegura, 2002), os STRs tornaram-se bastante utilizados em diversos estudos genéticos, em especial, de genética forense (Hammer e Zegura, 2002) e de identificação de grupos aparentados nas populações (Chantratita *et al.*, 2001; Gusmão *et al.*, 2001). A vantagem da utilização de microsátélites sobre os outros marcadores desta família está no fato de que o tamanho de cada alelo é muito menor, o que os torna mais fiéis as reações de PCR. Além disso, por serem menores podem ser melhor preservados em amostras degradadas. Tais peculiaridades destes marcadores permitem a formação de uma impressão genômica - *DNA fingerprint*, única para praticamente cada indivíduo.

Os microsátélites estão, também, envolvidos em alguns casos de doenças genéticas humanas, o que tem sido mostrado ser devido à variação no número de

repetições (Cummings e Zoghbi, 2000). Até o final do século XX, 14 desordens neurológicas foram associadas à expansão de repetições instáveis de trinucleotídeos presentes nas regiões codificantes ou até mesmo nas não codificantes. A taxa de variação do tamanho de microsatélites pode estar relacionada, também, com alguns tipos de cânceres, devido a defeitos em enzimas que corrigem erros de replicação do DNA (Moxon e Wills, 1999).

A análise dos STRs tornou-se uma rotina amplamente utilizada na genética humana, devido ao seu alto poder de individualização e praticidade (Szibor *et al.*, 2005). Entretanto, a grande maioria dos estudos aborda apenas STRs localizados no cromossomo Y e em autossomos, deixando o cromossomo X, novamente, em segundo plano.

Como o cromossomo X apresenta uma riqueza em regiões repetitivas, os STRs são marcadores muito comuns neste cromossomo, sendo encontrados a cada 300-500 Kb (Britten *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2001). Muitos STRs do X têm sido validados para a utilização na prática forense. Por isso, a maioria dos trabalhos com marcadores deste cromossomo utiliza os microsatélites, entretanto, novos estudos foram surgindo e, atualmente, outros marcadores do cromossomo X vêm ganhando atenção (Zarrabeitia *et al.*, 2005; Toni *et al.*, 2003). Há a necessidade, contudo, da ampliação destas validações para outros tipos de marcadores, como as Indels, e mais estudos sobre frequências alélicas e taxas de mutação para avaliar a extensão dos polimorfismos em diferentes populações e estabelecer banco de dados úteis para aplicações forenses e estudos antropológicos (Bini *et al.*, 2005).

Em se tratando de STRs do cromossomo Y, Roewer *et al.* (1992) descreveram o primeiro marcador polimórfico do cromossomo Y, denominado inicialmente por Y-27H389, atualmente melhor conhecido como DYS19. Durante os 10 anos seguintes, o progresso na descrição de novos marcadores STRs do cromossomo Y progrediu muito mais lentamente do que os presentes nos autossômicos (Butler, 2003).

Em 1997, a comunidade forense européia determinou um haplótipo mínimo, que inclui os seguintes STRs: DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, e o DYS385 a/b (Roewer *et al.*, 2001; de Knijff *et al.*, 1997; Kayser *et al.*,

1997). Estes marcadores foram utilizados para formar mais de 16.000 perfis genéticos de populações europeias, americanas e asiáticas. Nos últimos anos, novos marcadores, além daqueles, foram incluídos nas análises genéticas populacionais e forense, com o objetivo de formar um conjunto de marcadores do cromossomo Y que propiciasse o melhor fornecimento de informações.

Como novos marcadores foram utilizados indiscriminadamente por cada grupo de pesquisa, as análises comparativas entre as populações tornaram-se um tanto mais difíceis, se não impossíveis (Redd *et al.*, 2002). Visando preencher essa lacuna nas análises, as empresas comerciais, que atuam na área de genética, desenvolveram uma proposta metodológica que consistiu no desenvolvimento de *kits multiplex* de PCR não só para Y-STR como para diversos outros marcadores. Esta metodologia baseia-se na utilização de vários pares de iniciadores orientando simultaneamente reações de amplificação, gerando produtos de múltiplos *loci*, que são analisados conjuntamente. A finalidade desta iniciativa foi a de padronizar os marcadores utilizados e facilitar as análises comparativas.

A partir de então foi estabelecido um haplótipo mínimo para determinação da frequência de microsátélites do cromossomo Y, compreendendo um conjunto de pelo menos nove marcadores Y-STR. Além disso, foi criado um banco de dados *Y-STR Haplotype Reference Database* (<http://www.yhrd.org> – acessado em abril de 2009) por Willuweit e Roewer (2007), que auxilia nos estudos comparativos populacionais e na verificação da origem de haplótipos observados em determinadas populações.

Uma desvantagem intrínseca aos STRs do cromossomo Y, quando comparado aos autossômicos, é o seu reduzido poder de discriminação devido à relativa ausência de recombinação (Mulero *et al.*, 2006). Desta forma e com o objetivo de elevar o poder de discriminação do cromossomo Y, as pesquisas que avaliavam marcadores Y específicos passaram a analisar um número cada vez maior destes marcadores, ou seja, basicamente aumenta-se o número de *loci* analisados para que as combinações alélicas de cada um deles forneçam perfis genéticos individuais.

Com relação aos estudos envolvendo o cromossomo X, com exceção aos que abordam doenças cujo padrão de herança seja ligado ao sexo, a utilização de marcadores desse cromossomo, como visto anteriormente, não é tão difundida quanto a dos demais cromossomos e concentra-se, principalmente, na análise de STRs. Pode-se perceber isso com relação à quantidade de publicações existentes que utilizaram marcadores desse cromossomo em comparação a de outros. Entretanto, na última década a genética forense elegeu este cromossomo como um forte instrumento genético, principalmente, para aplicação em casos complexos de parentesco (Britten *et al.*, 2003). Argumenta-se que a genotipagem deste pode complementar de forma muito eficiente as análises dos marcadores autossômicos e, em especial, do cromossomo Y.

Desta forma, estudos utilizando marcadores do cromossomo X para aplicação forense ganharam importância (Tun *et al.*, 1999) e, conseqüentemente, iniciativas para a utilização destes em outras áreas aumentaram. Entretanto, em contraste com os STRs autossômicos e os STRs e SNPs Y-específicos, estudos que objetivam fazer uma revisão ou um apanhado geral da freqüência dos alelos de marcadores presentes no cromossomo X ainda são raros, sendo que a *ChrX-STR Organization* (Szibor *et al.*, 2006, veja <http://www.chrx-str.org/> acessado em dezembro de 2008) constitui uma exceção.

Os marcadores do cromossomo X, quando comparados aos dos cromossomos autossômicos, apresentam a desvantagem de possuir um relativo reduzido poder de discriminação devido à taxa de recombinação menor (Mulero *et al.*, 2006). Muitos destes marcadores, próximos das regiões pseudo-autossômicas, apresentam uma grande chance de possuir uma cópia no cromossomo Y, como por exemplo, o DYS393 que foi demonstrado ter uma contraparte do cromossomo X, conhecida por DXYS267 (Butler, 2003; Cali *et al.*, 2002; Dupuy *et al.*, 2000, Carvalho-Silva *et al.*, 2000).

Os microsátélites podem ser considerados como os principais marcadores genéticos nas análises populacionais. Entretanto, este espaço vem sendo almejado por novos marcadores que fornecem informações diferentes das obtidas com STR. Atualmente, em função do Projeto Genoma Humano, que reportou a caracterização de aproximadamente 2.000 polimorfismos bialélicos de inserção-deleção (Indels) no

genoma humano, diversos autores passaram a explorar este novo instrumento de análise genética por considerá-lo uma poderosa ferramenta diagnóstica para estudos populacionais. Estes marcadores pertencem à classe de polimorfismos de DNA de evolução lenta e são constituídos de fragmentos de DNA que podem ter sido acrescentados ou eliminados de uma seqüência do genoma (Bastos-Rodrigues *et al.*, 2006; Weber, *et al.*, 2002).

Os polimorfismos de Indels variam de poucas bases até grandes pedaços do cromossomo. As Indels localizadas no interior de regiões codificadoras de algum gene podem causar alteração na fase de leitura ou adição/subtração de algum códon o que, conseqüentemente, irá alterar o produto protéico. Além disso, as Indels em regiões não traduzidas podem afetar a estrutura e estabilidade da molécula de DNA ou comprometer a expressão de RNAs regulatórios não codificadores. Evidências genéticas sugerem que as Indels constituem uma fonte considerável de defeitos genéticos, ou seja, uma força produtora de mudanças evolutivas significantes (Britten *et al.*, 2003).

O número de Indels presente no genoma humano é de cerca de 1/12 o número de SNPs e apresenta um tamanho médio de 36 nucleotídeos. Entretanto, recentemente foi demonstrado que as Indels são responsáveis por mais do que o dobro de alterações nucleotídicas entre o genoma humano e o dos chimpanzés, do que os SNPs (Britten *et al.*, 2003).

Os SNPs e as Indels apresentam a grande vantagem de que podem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos (50pb ou menos) e assim apresentam distintas vantagens sobre os microsatélites no estudo de DNA extremamente degradado. Por tal razão, diversos estudos de genética de populações vêm incluindo os polimorfismos de inserção/deleção nas análises amostrais. Além disso, este tipo de marcador em muitas vezes mostrou-se eficiente para informações de contribuição genética ancestral por apresentar diferenças significativas nas freqüências alélicas dos principais grupos parentais humanos (Bastos-Rodrigues *et al.*, 2006; Bamshad *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2002). É esperado que a sua baixa taxa de evolução, associada à distribuição alélica, possa vir a refletir grandes eventos evolutivos da história demográfica humana (Romualdi *et al.*, 2002).

Um fator limitante que, apesar de bem documentado, é pouco esclarecido em muitos estudos que empregam os marcadores genéticos de DNA, é a probabilidade de ocorrência de mutações recorrentes e reversas. As primeiras são caracterizadas por uma mesma alteração na seqüência de DNA ocorrer mais de uma vez independentemente, sem necessariamente ter a mesma origem filogenética. Portanto, este evento mutacional pode proporcionar situações em que dois indivíduos apresentam o mesmo alelo para determinado *locus*, porém não compartilham qualquer ascendente próximo em comum. As mutações reversas, por sua vez, também podem trazer complicações para a interpretação dos dados genéticos, pois mascaram a seqüência já alterada como nativa. Estes fatores ganham importância à medida que a taxa de mutação do marcador estudado for maior, como é o caso dos STRs, por aumentar a probabilidade desses eventos evolutivos ocorrerem.

As dificuldades trazidas por estes eventos para as análises genéticas podem ser retificadas quando se analisa mais de um *locus* próximos fisicamente que, devido ao grau de desequilíbrio de ligação entre os marcadores, facilita a compreensão da real relação entre os indivíduos analisados. A probabilidade de compartilharem, portanto, o mesmo haplótipo, sem possuírem um ascendente em comum, torna-se menor à medida que novos marcadores são introduzidos na análise (Budowle e Brown, 2001). Isto representa uma das grandes vantagens nas análises de haplótipos em estudos genéticos, pois, como correspondem a regiões de alto desequilíbrio de ligação, apresentam uma diversidade limitada (Altshuler *et al.*, 2005).

O emprego de marcadores genéticos de evolução lenta, como as Indels, em estudos populacionais diminui a probabilidade de mutação recorrente, mas se limita a uma menor diversidade de alelos, pois cada marcador apresenta apenas dois alelos - bialélicos. Estes marcadores, dependendo da idade das mutações, são ferramentas úteis para a genética de populações, pois os alelos mais recentes têm uma distribuição geográfica restrita, enquanto que os alelos que surgiram há mais tempo já foram espalhados por meio dos movimentos migratórios e apresentam-se em freqüências elevadas na região próxima ao seu surgimento.

1.3 População brasileira

A colonização do território brasileiro pelos portugueses, entre os séculos XVI a XIX, propiciou a ocorrência de diversos eventos demográficos que hoje somados podem ser considerados como os responsáveis pela alta variabilidade fenotípica encontrada na população brasileira. Em síntese, adicionalmente à chegada dos europeus, presenciou-se a eliminação parcial dos nativos – ameríndios, e posteriormente o início do tráfico de escravos africanos. O contingente de escravos trazidos para o Brasil foi estimado em aproximadamente quatro milhões de indivíduos (Fausto, 2004), o que representa em torno de 40 a 60% do total de escravos vindos para a América. Outro dado interessante é que daqueles, cerca de 66% eram homens (Reis e Gomes, 1996; Queirós Mattoso, 1982). Deste modo, a formação da população brasileira passou a contar, basicamente, com a participação de três componentes parentais já citados anteriormente.

A constituição genética atual das linhagens paterna e materna da população brasileira urbana de todas as regiões administrativas foi descrita por Barcelos (2006), Carvalho-Silva *et al* (2001) e Alves-Silva *et al* (2000). Por meio dos dados desses trabalhos pode-se inferir que a contribuição europeia é a mais expressiva na linhagem patrilinear para todas as regiões. Por sua vez, a contribuição paterna africana aparece em segundo plano, seguida da participação ameríndia. A contribuição materna estimada, por outro lado, apresenta-se divergente do observado para o cromossomo Y e um tanto que equilibrada entre as três bases parentais. Portanto, observa-se um forte componente europeu na linhagem paterna brasileira e uma clara divisão entre os três grupos parentais na linhagem materna, que varia de região para região.

A distribuição destes grupos, como mostra os estudos acima indicados, não foi por igual no território brasileiro, o que provavelmente refletiu na composição da população atual. Por meio de aproximações matemáticas, pode-se perceber, a partir dos dados apresentados por Barcelos (2006), Carvalho-Silva *et al* (2001) e Alves-Silva *et al* (2000), que há certa discrepância, o que é esperado, entre a composição genética regional calculada com base nos dados moleculares das linhagens paterna e materna - tabela 2.

Vários autores enfatizam a natureza tri-íbrida da população brasileira, a partir dos ameríndios, europeus e africanos. Estes dados históricos, corroborados pelos genéticos, indicam logicamente que ocorreu um processo de incorporação de várias culturas à brasileira e, conseqüentemente, suas características genotípicas e fenotípicas também foram adicionadas à nossa população (Bonfim, 1997; Ribeiro, 1995; Salzano, 1986). Portanto, por ser originada desta miscigenação peculiar e tal processo ter ocorrido em elevada escala e ser considerado relativamente recente, a população brasileira tornou-se um objeto de desejo para análises populacionais.

Tabela 2: Composição genética ancestral (%) da população brasileira baseada em dados genéticos* produzidos por Barcelos (2006), Carvalho-Silva *et al* (2001) e Alves-Silva *et al* (2000) para o linhagens uniparentais.

	Européia	Africana	Ameríndia/Asiática	Não definido
Brasil	52,44	24,60	21,19	1,77
Norte	58,28	13,99	27,73	0,00
Nordeste	60,73	28,16	11,11	0,00
Centro-Oeste	44,75	27,25	24,25	3,75
Sudeste	48,88	29,27	21,85	0,00
Sul	74,20	14,04	11,76	0,00

* destaca-se que a seleção amostral dos grupos de pesquisa envolvidos nestes trabalhos são diferentes e podem acarretar divergências nas estimativas de mistura genética.

Os dados apresentados na tabela acima foram obtidos por meio de médias matemáticas calculadas a partir de resultados de mistura genética para marcadores moleculares do cromossomo Y e do DNAm. Tais dados dão respaldo científico a esta noção de miscigenação da população brasileira e acrescentam um importante

detalhe: a contribuição europeia foi basicamente por meio de homens e a ameríndia e africana foi principalmente de mulheres.

Os dados históricos corroboram esta percepção genética do processo colonial, visto que os primeiros imigrantes portugueses não trouxeram suas mulheres, e registros indicam que iniciaram rapidamente um processo de miscigenação com mulheres indígenas. Com a vinda dos escravos, a partir da segunda metade do século 16, a miscigenação estendeu-se às africanas. Callegari-Jacques e Salzano (1999) estimam que 40% dos imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1978 eram africanos, 58% europeus, e apenas 2% asiáticos.

Dentre os europeus, a grande maioria era proveniente de Portugal, Itália e Espanha, enquanto que a origem geográfica dos escravos africanos foi muito mais variada - figura 1. Acredita-se que a maioria deles era originária da região dos bantus - África equatorial e tropical, e o restante sudaneses - África ocidental. Segundo estimativas, 80% dos indivíduos vieram da região Centro-Oeste africana, 15% do Oeste e 5% do Leste (Silva *et al.*, 2006).

A distribuição destes no território brasileiro não obedeceu a padrão algum, e as diferenças regionais quanto à procedência também foram modificadas pelo tráfico interno e movimentos migratórios que ocorriam de acordo com a necessidade econômica local. As regiões que receberam o maior número de africanos foram os atuais estados de Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, São Paulo e Pará (Pante-de-Sousa, 1999; Andrade, 1988; Queirós Mattoso, 1982; Curtin, 1969).

Apesar da “aceitação” do trabalho compulsório por parte de muitos, as revoltas e rebeliões eram comuns nos cativeiros. Em consequência à brutalidade em que estavam submetidos, os escravos enxergavam na fuga um modo de busca à sobrevivência (Vila Real, 1996; Neme e Andrade, 1987; Queirós Mattoso, 1982). O quilombo formou, portanto, a unidade básica de resistência coletiva deste povo (Moura, 1993).

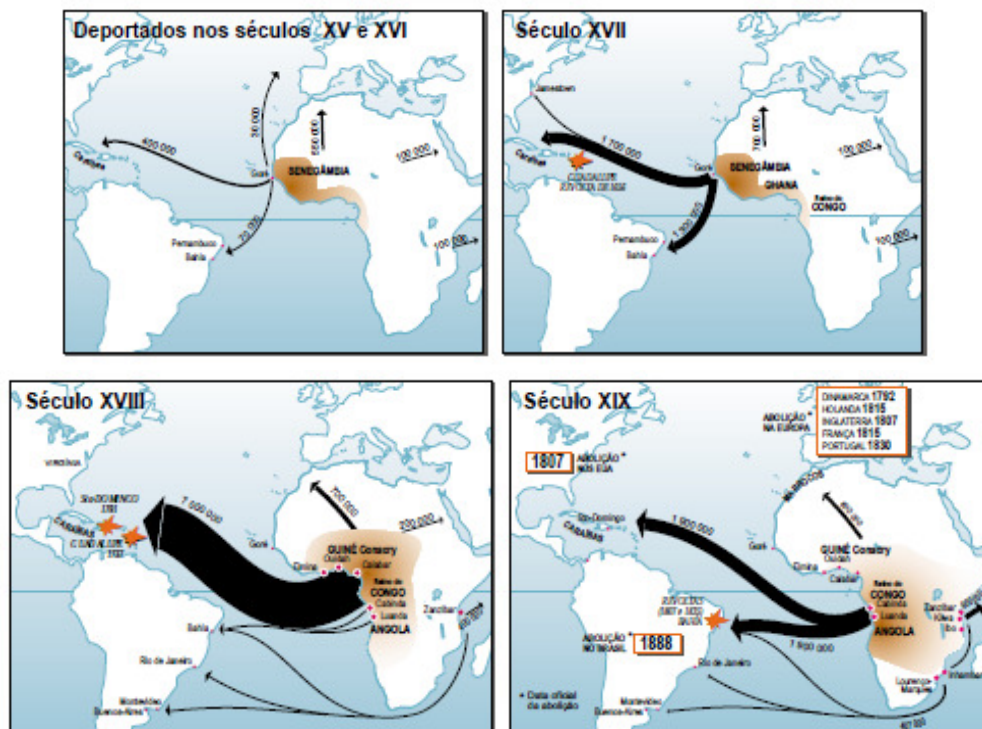


Figura 1: Principais origens e destinos do tráfico de escravos para o Brasil (Fonte: Unesco, 2000).

A visão de que os quilombos constituíam um refúgio exclusivo de africanos permanece arraigada no senso comum. Os quilombos existentes no período colonial, entretanto, não eram frutos apenas de negros rebeldes fugidos. As comunidades de quilombo se constituíram a partir de uma grande diversidade de processos, que incluem também as heranças, doações, recebimentos de terras como pagamento de serviços prestados ao Estado, simples permanência nas terras que ocupavam e cultivavam no interior de grandes propriedades, bem como a compra de terras, tanto durante a vigência do sistema escravocrata quanto após sua abolição. Várias destas comunidades, mesmo após a abolição da escravatura em 1888, mantiveram-se isoladas, formando assim as atuais comunidades remanescentes de quilombos.

O conceito mais atual, e muito utilizado para definir o que vem a ser remanescente de quilombo, é a definição da Associação Brasileira de Antropologia – ABA, de 1994, que diz ser quilombo:

“Toda comunidade negra rural que agrupe descendentes de escravos vivendo da cultura de subsistência e onde as manifestações culturais têm forte vínculo com o passado”.

Adicionalmente, o poder público, representado pelo Ministério da Cultura, define quilombos como:

“grupos étnico-raciais, segundo critérios de auto-atribuição, com trajetória histórica própria, dotados de relações territoriais específicas, com presunção de ancestralidade negra relacionada com a resistência à opressão histórica sofrida” (Ministério da Cultura, portaria 6/2004, artigo 2º).

De acordo com dados da Fundação Cultural Palmares, 1.342 comunidades afro descendentes já foram identificadas em todo o Brasil, sendo que o número de habitantes destas aproxima-se de dois milhões de pessoas. Dentro do total identificado, a grande maioria está presente na Região Administrativa do Nordeste, enquanto que as regiões Centro-Oeste e Sul são as que apresentam o menor número de comunidades quilombolas. Destas comunidades identificadas, apenas 1.124 possuem as suas certidões publicadas no Diário Oficial da União (Fundação Cultural Palmares – <http://www.fcp.gov.br>, acessado em junho 2009).

O projeto Geografia Afro-brasileira e Educação (Anjos, 2009) desenvolveu o Cadastro Municipal dos Territórios Quilombolas do Brasil que está em seu segundo levantamento. Os resultados observados evidenciam números ainda maiores do que aqueles publicados pela Fundação Cultural Palmares. A primeira etapa foi realizada em 2000 e registrou 1.388 comunidades remanescentes de quilombos, enquanto que em 2005 foram cadastradas 2.228. Esta diferença entre os dois levantamentos pode ser explicada por políticas afirmativas e outras ações da sociedade pelo fortalecimento da identidade negra.

Na figura 2 pode-se observar a distribuição das comunidades no território brasileiro enquanto que a tabela 3 apresenta os estados da federação que possuem o maior número de comunidades quilombolas. Destaca-se o Maranhão e a Bahia que são os estados com o maior número de registros.

Espera-se que estas comunidades, assim como conseguiram manter muito de sua identidade cultural, possam ter preservado características genéticas das populações ancestrais africanas. Entretanto, diferentemente do ideal popular, como exposto anteriormente, os quilombos não eram constituídos apenas por escravos desertores. Também viviam por lá indivíduos de qualquer grupo populacional que por algum interesse preferiam os quilombos às cidades, como escravos forros, criminosos fugitivos da corte e comerciantes que vendiam suas mercadorias (Queirós Mattoso, 1982).

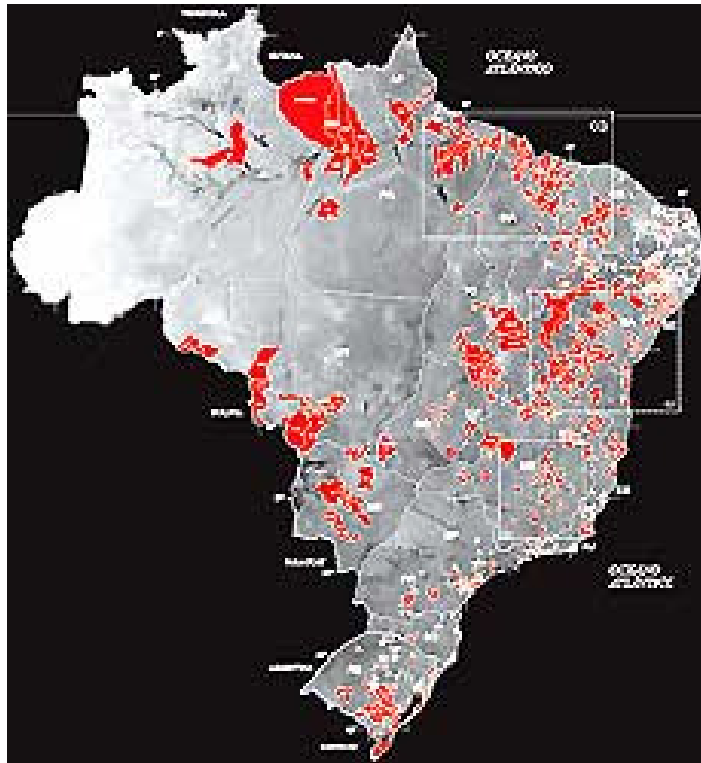


Figura 2: Mapa do Brasil representando em vermelho as regiões mais densamente ocupadas por remanescentes de quilombos (Anjos, 2009).

Além disso, relatos orais e históricos indicam que a formação ancestral, cultural e genética destas comunidades contou, em grande parte, com a contribuição de ameríndios (Palacín e Moraes, 1994). Contribuições estas que certamente representaram fluxos gênicos e, obviamente, provocaram miscigenação genética dentro dessas comunidades.

A análise das informações genéticas dessas populações, além de permitir o acesso às características genéticas das populações ancestrais de cada comunidade, pode vir a fornecer informações a respeito de alguns eventos históricos e evolutivos que ocorreram no passado dessas populações e, assim, contribuir para a reconstrução histórica do povoamento africano no Brasil. Isto se deve ao fato de que a variação genética guarda informações a respeito da história de determinada espécie e dos processos que criaram e modelaram esta variação (Schaffner, 2004).

Tabela 3: Estados brasileiros com o maior número de comunidades remanescentes de quilombos observadas no Segundo Cadastro Municipal dos Territórios Quilombolas do Brasil (Anjos, 2009).

Estado	N° de comunidades quilombolas
Maranhão	642
Bahia	396
Pará	294
Minas Gerais	135
Pernambuco	91
Rio Grande do Sul	90
Piauí	78
São Paulo	70
Rio Grande do Norte	64
Mato Grosso	59

Assim como ocorreu no processo histórico das análises genético populacionais, os trabalhos com remanescentes de quilombos descreveram inicialmente a constituição genética de certas comunidades com base nos polimorfismos de grupos sanguíneos e proteínas séricas (Oliveira *et al.*, 2002; Sousa, 2001; Guerreiro *et al.*, 1999; Arpini-Sampaio *et al.*, 1999; Pedrosa, 1998;

Bortolini *et al.*, 1998; Souza e Culpi, 1992; Bortolini *et al.*, 1992 e Schneider *et al.*, 1987).

Posteriormente, a análise do material genético nuclear e extra-nuclear passou a figurar como foco das análises genéticas, com destaque aos polimorfismos de DNA nuclear com base nos dados de VNTR e STR, Arpini-Sampaio *et al.* (1999) e Silva Jr *et al.* (1999); à diversidade do DNAm, Bortolini *et al.* (1997a e 1997b) e Silva Jr, (1999); e, à variabilidade do cromossomo Y, Ribeiro *et al.*, 2009, Abe-Sandes *et al.*, (2004), Oliveira *et al.* (2003) e Ribeiro-dos-Santos *et al.* (2002), entre outros (Silva Jr *et al.*, 2006; Pedrosa, 2006; Ferreira, 2006; Barbosa *et al.*, 2006; Cotrim *et al.*, 2004; Cayres-Vallinoto *et al.*, 2003; Souza, 2003; Abe-Sandes, 2002 e Bortolini *et al.*, 1998). Destaca-se que nenhum trabalho de genética de populações de remanescentes de quilombos, que tenha analisado profundamente qualquer grupo de marcadores do cromossomo X, foi publicado anteriormente.

Do total de remanescentes de quilombos brasileiros identificados pela Fundação Cultural Palmares, apenas 27, ou seja, aproximadamente 2% já foram alvos de algum tipo de análise genética. Conseqüentemente, estudos como este ganham importância e tornam-se urgentes, tendo em vista que o desenvolvimento econômico e a urbanização podem trazer conseqüências danosas e irreversíveis à constituição destas comunidades, como destacado por Anjos (2009).

2. JUSTIFICATIVA

A genética de populações fornece subsídios para que se tenha uma visão mais aprofundada da formação e constituição das comunidades humanas. Neste sentido, as populações remanescentes de quilombos podem representar de forma mais conservada uma porção da história colonial brasileira. Neste trabalho a análise da constituição genética de quatro comunidades afro derivadas brasileiras - Kalunga, Riacho de Sacutiaba, Rio das Rãs e Mocambo - foi ampliada com a averiguação do comportamento populacional de alelos de marcadores situados nos dois cromossomos sexuais.

Estudos anteriores, baseados em marcadores do DNAMt, autossômicos e do cromossomo Y (Ferreira, 2006; Pedrosa, 2006; Ribeiro, 2005, respectivamente) indicaram valores de contribuição genética ancestral distintos, sendo que a participação européia é bastante importante quando analisada as linhagens paternas e dados autossômicos, enquanto que ausente na análise das linhagens maternas (mitocondrial). Estes dados, apesar de serem congruentes com os dados das populações brasileiras em geral e apresentarem uma explicação histórica até certo ponto convincente, continuam sendo intrigantes na medida em que as características fenotípicas dessas populações indicam um caminho distinto.

Para melhor avaliar a diferenciação populacional, foram escolhidos marcadores polimórficos tanto com baixas taxas de mutação, Indels, com o intuito de buscar avaliar as relações mais ancestrais entre as populações alvos, como com altas taxas de mutação, STRs, para melhor avaliar os eventos recentes que contribuíram para a diferenciação interpopulacional. O escopo do projeto é complementar as análises genéticas realizadas previamente, avaliando agora um amplo conjunto de marcadores STR Y-específicos para as quatro populações remanescentes de quilombos citadas anteriormente, além de estudar marcadores Indels do cromossomo X, na busca de informações ainda não acessadas para este tipo de população.

A análise do cromossomo Y será útil para complementar o quadro genético obtido com as análises prévias deste cromossomo e melhor entender as linhagens paternas formadoras destas populações. Já com relação ao cromossomo X,

destaca-se que o seu padrão de herança o torna um sistema ideal para estudar as diferenças genético populacionais entre amostras masculinas e femininas (Schaffner, 2004).

Hipótese e objetivos

A hipótese, portanto, a ser testada é a de que apesar das histórias de formação de cada uma das populações afro descendentes e o semi-isolamento a qual se submeteram por décadas, a miscigenação pré-fundação provocou uma congruência nos perfis genéticos populacionais a serem observados. Além disso, espera-se evidenciar um processo de diferenciação populacional mais perceptível nas análises dos marcadores de microsátélites do que nas Indels, uma vez que estas apresentam baixas taxas de mutação.

Desta forma, tem-se como objetivo geral traçar um perfil da constituição genética, X e Y específica, das populações remanescentes de quilombos alvo deste trabalho e avaliar o perfil das comunidades quilombolas no Brasil e em outros países da América do Sul. Para tanto, temos como objetivos específicos:

Caracterizar as populações remanescentes de quilombos Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Riacho de Sacutiaba baseando-se na estimativa da distribuição das frequências alélicas de marcadores genéticos do cromossomo X e do Y;

Estimar a diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional destas populações quanto a estes marcadores;

Quantificar a contribuição africana, europeia e ameríndia nessas populações baseado nesses marcadores;

Comparar os resultados obtidos com aqueles verificados nestas mesmas populações com diferentes marcadores;

Traçar o perfil genético de populações remanescentes de quilombo brasileiras e da América do Sul, especialmente da Venezuela, baseado nos dados disponíveis na literatura assim como com os dados aqui gerados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos de análises empregados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, com número 151/07. O termo de aprovação encontra-se no Anexo A.

3.1 Populações Remanescentes de Quilombos estudadas

Como apresentado anteriormente, o Nordeste é a região brasileira onde se encontra o maior número de remanescentes de quilombos, aproximadamente 70% de todas as comunidades do Brasil (Anjos, 2000). O Vale do Rio São Francisco é uma região especialmente rica em remanescentes, dentre as quais as comunidades de Rio das Rãs e Riacho de Sacutiaba, no oeste do estado da Bahia, e Mocambo, no norte do estado de Sergipe, objetos de estudo no presente trabalho.

Rio das Rãs foi reconhecida oficialmente como um remanescente de quilombo em 2000. Esta comunidade está localizada próxima à margem do Rio São Francisco, no município de Bom Jesus da Lapa-BA. A provável origem deste remanescente é no século XVIII (Doria e Carvalho, 1995). Riacho de Sacutiaba, por sua vez, foi reconhecida oficialmente em 2004 e localiza-se no município de Wanderley-BA, apresenta uma população pequena que reflete nos laços de consangüinidade entre os indivíduos. Dados históricos sugerem que Sacutiaba tenha pelo menos 150 anos (Silva *et al.*, 1997a). Enquanto que Mocambo está situada próxima ao município de Porto da Folha-SE, e também foi oficialmente reconhecida como remanescente de quilombo em 2000 e segundo relatos históricos teve sua origem no final do século XVII (Silva *et al.*, 1997b).

A região Centro-Oeste, ao contrário, é apenas a segunda região com o menor quantidade destas comunidades. Dos cinco remanescentes do estado de Goiás, destaca-se, numérica e historicamente, Kalunga, também objeto de estudo do presente trabalho.

Acredita-se que Kalunga foi fundada por escravos que teriam fugido do trabalho nas minas de ouro no interior do Brasil ou que foram abandonados ao fim da exploração aurífera, no final do século XVIII. Esta ocupa uma área de

aproximadamente 258.000 hectares na zona rural dos municípios de Cavalcante, Teresina e Monte Alegre, no nordeste do Estado de Goiás. Kalunga também foi oficialmente reconhecida no ano de 2000 e é considerada patrimônio cultural do estado de Goiás. Informações acerca do posicionamento geográfico, tamanho populacional e amostral das comunidades remanescentes de quilombos analisadas neste trabalho estão disponíveis na tabela 4.

Tabela 4: Informação demográfica, geográfica e amostral das populações afro descendentes analisadas.

	População	Latitude	Longitude	Amostra		
				Masculina*	Feminina	Total
Mocambo	500	9°45' S	37°25' W	26	32	58
Rio das Rãs	5.300	13°41' S	47°15' W	44	37	81
Kalunga	4.000	13°41' S	43°20' W	39	29	68
Riacho de Sacutiaba	209	11°29' S	43°20' W	9	9	18

* Para o sistema de marcadores do cromossomo X, apenas 25 amostras masculinas de Mocambo foram analisadas, 35 de Rio das Rãs e 8 de Riacho de Sacutiaba.

3.2 Coleta de Amostras

As comunidades de Rio das Rãs, Riacho de Sacutiaba e Mocambo foram visitadas em 1999 pela equipe do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. A comunidade remanescente de quilombo de Kalunga foi visitada nos anos de 2001 e 2002.

Durante as visitas, o grupo de pesquisa esclareceu para a comunidade os objetivos deste estudo e enfatizou o caráter voluntário da doação. No caso das três

comunidades do Nordeste, as lideranças locais autorizaram o trabalho e foi feita uma exposição oral para todos os membros das comunidades. Aqueles que aceitavam participar foram submetidos a um questionário demográfico e a um novo esclarecimento, porém, individualizado.

Na comunidade *Kalunga*, além dos procedimentos listados, foi também utilizado um termo de consentimento livre e esclarecido - aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, processo número 151/07, para utilização de seu material genético biológico e dos demais dados fornecidos para este estudo que foi assinado pelo indivíduo cujo sangue e dados foram coletados ou, no caso de analfabetos, por um indivíduo indicado por ele. Dos indivíduos assim identificados foram coletados aproximadamente 5ml de sangue periférico de cada um, por meio de um sistema de punção venosa com tubo a vácuo (*Vacutainer*), com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 5% como anticoagulante, devidamente identificados e refrigerados o mais breve possível.

3.3 Processamento das amostras biológicas e extração de DNA

O processamento do material biológico coletado foi realizado no laboratório de Genética da Universidade de Brasília, logo após o retorno do trabalho de campo. Esta etapa caracterizou-se por sucessivos processos de centrifugação e lavagem com solução salina, cujo intuito era a separação em três frações, são elas: plasma, creme leucocitário e hemácias.

A amostra total foi centrifugada e o plasma foi retirado e estocado para análise de proteínas séricas e possível fonte de DNA. Em seguida o creme leucocitário foi retirado e estocado para posterior extração do DNA. O restante da amostra foi lavado três vezes com solução salina e, após a última centrifugação, foi glicerolizado em tampão glicerol 40% com citrato tripotássio (0,1M), KH_2PO_4 (0,0345M), K_2HPO_4 (0,0344M) e estocado para análise de proteínas eritrocitárias. Todo o material foi devidamente identificado e estocado em freezer -20°C até o momento do uso.

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit comercial *Illustra Blood*TM adquirido da *GE-Healthcare*TM. Os procedimentos realizados foram aqueles

descritos no manual de instrução do produto – anexo B. Após a extração as amostras de DNA foram quantificadas em um aparelho *NanoDrop Spectrophotometer* e diluídas para a concentração de 10ng/μl.

3.4 Marcadores genéticos

Um esquema que representa a localização cromossômica dos marcadores polimórficos de inserção-deleção do cromossomo X está apresentado na figura 3. A tabela 5 apresenta as informações básicas úteis para a análise destas Indels. Os marcadores RS16460, RS17394, RS2307707, RS5743760, RS2307741 e RS621 foram padronizados para utilização em sistema *hexaplex*, baseado no *octoplex* montado por Monteiro (2007).

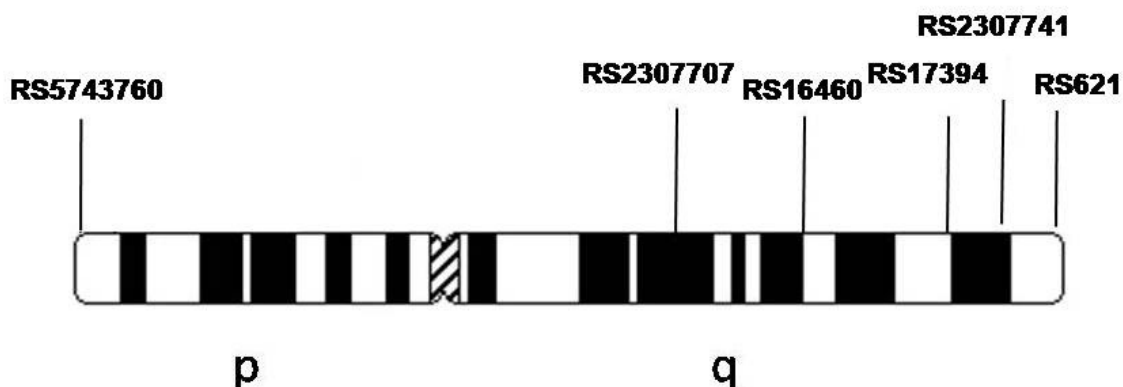


Figura 3: Estrutura do cromossomo X humano e localização aproximada, no mesmo, das Indels objetos de estudo deste trabalho (baseado em Szibor *et al.*, 2006).

As posições relativas dos STRs do cromossomo Y analisados neste trabalho estão disponíveis na figura 4. A tabela 6 apresenta as informações básicas úteis para a análise dos STRs Y-específicos do *kit multiplex PowerPlex® Y* (Promega Corporation).

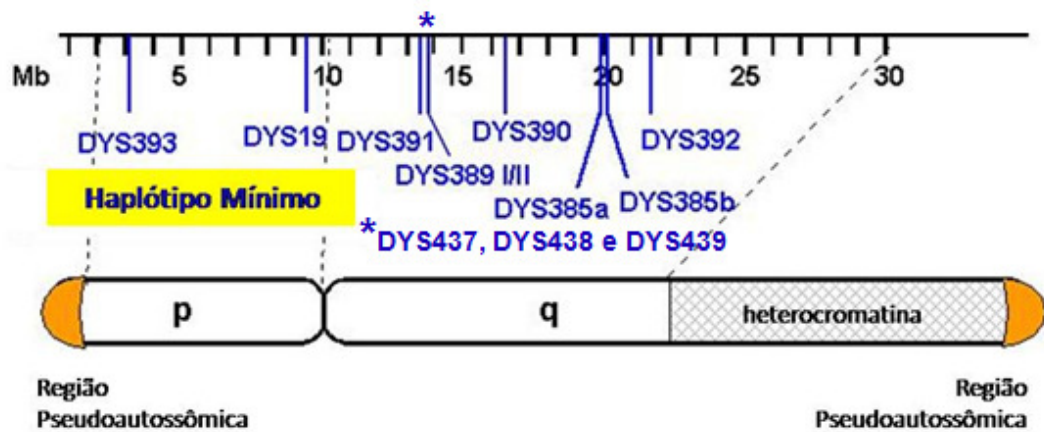


Figura 4: Estrutura do cromossomo Y humano e localização de alguns STRs (Fonte: Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase <http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/ystrpos1.htm> acessado em maio de 2009).

Tabela 5: Informações sobre as Indels do cromossomo X selecionadas para esse trabalho: alternativas alélicas, localização citogenética, seqüência dos iniciadores utilizados na amplificação e respectivos fluorocromos, caracterização dos produtos amplificados (pb) e as concentrações utilizadas para cada iniciador (μM).

Indel	Alelos	Coordenada Citogenética	Seqüência Iniciadores e fluorescência	Tamanho Fragmentos	Conc. Inic.
RS16460	[-/TTC]	Xq23 -24	5` [6-FAM]-GACAGCCTCAGTTAATCATTGG 3` 3` GACTGTAAATGTAGCGGTGCT 5`	81-84	0,15
RS17394	[-/AAAAG]	Xq26.3-q27.1	5` [6-FAM]-AAAATCGGCAACCAAAAAGA 3` 3` TCCTGTTGGGGTTGAGTCAT 5`	88-93	0,65
RS2307707	[-/GTCT]	Xq21.32	5` [6-FAM]-GCCTGGGATTTTTCTTTAT 3` 3` CCAGGATACAGGGGAGAACA 5`	97-101	0,50
RS5743760	[-/GAGGAGAAA]	Xp22.3	5` [6-FAM]-TGTGCCATCCCTAGCTCATT 3` 3` CCAGTGAAATTTGGGAGGAA 5`	167-176	0,90
RS2307741	[-/CCTCTGAAC]	Xq27-28	5` [VIC]-TCATCATCCTCAGACCATGACA 3` 3` GGGAATTCTTCATAGTTCTTAGCTAGT 5`	95-104	0,20
RS621	[-/AAC]	Xq28	5` [VIC]-AATGGAACCCATGTCTTGGA 3` 3` AAAGCAGCTCCACTAGGAAGAC 5`	121-124	0,15

* 6-FANTM (6-Carboxifluoresceína); VIC[®] (GFP - proteína verde fluorescente).

Tabela 6: Informações sobre os marcadores Y-STR selecionados para análise: coordenada citogenética, seqüência cerne de repetição, variação alélica, tamanho do fragmento, fluorocromo e referência bibliográfica.

<i>Loci</i>	Coordenada Citogenética	Repetição	Variação alélica	Tamanho do Fragmento	Fluorocromos	Referência
DYS19	Yp11.2	[TAGA] ₃ tagg[TAGA] _n	10–19	175 - 220	JOE	Roewer e Epplen (1992)
DYS385 a/b	Yq11.222	GAAA	7–28	230 - 325	TMR	Schneider <i>et al.</i> , 1998
DYS389 I	Yq11.21	(TCTG) (TCTA)	9–17	130 - 170	FL	Kayser <i>et al.</i> , 1997
DYS389 II	Yq11.21	(TCTG) (TCTA)	24–34	245 - 300	FL	Kayser <i>et al.</i> , 1997
DYS390	Yq11.23	(TCTA) (TCTG)	17–28	180 - 240	TMR	Kayser <i>et al.</i> , 1997
DYS391	Yq11.21	TCTA	6–14	145 - 180	FL	Kayser <i>et al.</i> , 1997
DYS392	Yq11.221	TAT	6–17	280 - 335	JOE	Kayser <i>et al.</i> , 1997
DYS393	Yp11.2	AGAT	9–17	95 - 140	TMR	Kayser <i>et al.</i> , 1997
DYS437	Yq11.21	TCTA	13–17	170 - 210	TMR	Ayub <i>et al.</i> , 2000
DYS438	Yq11.21	TTTTTC	6–14	215 - 255	TMR	Ayub <i>et al.</i> , 2000
DYS439	Yq11.21	AGAT	9–14	190 - 235	FL	Ayub <i>et al.</i> , 2000

* TMR (Carboxi-tetrametil-rodamina); FL (Fluoresceína); JOE (6-carboxi-4',5'-dicoloro-2',7').

3.5 Reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

O desenvolvimento no final da década de 1980 do método de amplificação molecular, denominado reação em cadeia da polimerase (PCR; revisado por Mullis, 1990) abriu as portas para os estudos de novos marcadores moleculares, como os microsátélites. A metodologia de PCR apresenta vantagens intrínsecas, como: a identificação simples dos alelos; e a elevada sensibilidade, permitindo que o exame seja feito com quantidades mínimas de DNA genômico. Assim, a metodologia da PCR tornou possível realizar a determinação de identidade genética pelo DNA em situações anteriormente impossíveis. Entretanto, a técnica de PCR apresenta as desvantagens de estar limitada ao estudo de pequenas regiões genéticas e, por ser altamente sensível, a PCR é suscetível à contaminação, o que exige cuidados especiais no laboratório (Pena e Jeffreys, 1993).

Os seqüenciadores automáticos de DNA aliados à utilização de vários marcadores de tamanhos diferentes em uma mesma reação de amplificação e uma única corrida eletroforética trouxe rapidez e facilidade na utilização dos microsátélites e outros marcadores em estudos genéticos. Desta forma, as Indels do X e os STRs do Y foram amplificados por meio de sistemas *multiplex* de reações de PCR realizadas em sistemas únicos para cada amostra. Esta amplificação da região genética a ser analisada é conduzida por uma mistura de reagentes adicionados ao DNA amostral que são submetidos a variações de temperatura específicas para desnaturação do DNA, anelamento dos iniciadores e extensão da cadeia de DNA copiada.

As amplificações foram realizadas em um termociclador *GeneAmp 9700* (*Applied Biosystems*) empregando as condições de reação de PCR descritas nas tabelas 7 e 8. As reações para amplificação das Indels do cromossomo X por multiplex PCR tiveram 12,5 µl como volume final, com 1,5 U de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*), 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 0,25 µM de dNTPs, 0,32 mg/µL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) e 10 ng de DNA genômico com as concentrações dos iniciadores oscilando entre 0,15 µM e 0,90 µM. Enquanto que as amplificações dos STRs do cromossomo Y (*PowerPlex[®] Y*) foram

realizadas em um volume final de 5 μ L de acordo com instruções disponíveis em Butler *et al.*, (2002) e Butler (2005).

Tabela 7: Receita das misturas de reagentes (em μ l) utilizadas para amplificação de fragmentos específicos via PCR para os sistemas de multiplexação dos cromossomos X e Y analisados.

Reagentes	Hexaplex X	PowerPlex[®] Y
H ₂ O (deionizada)	4,648	2,890
Tampão de reação	1,250	--
MgCl ₂	0,875	--
dNTP	2,500	--
BSA	1,600	--
<i>Gold Star 10x Buffer</i>	--	0,500
<i>PowerPlex Y 10x Primer Pair Mix</i>		0,500
DNA Polimerase (Taq Plat)	0,300	--
DNA Polimerase (Taq Gold)	--	0,110
RS16460 (Iniciador)	0,019	--
RS17394 (Iniciador)	0,082	--
RS2307707 (Iniciador)	0,063	--
RS5743760 (Iniciador)	0,113	--
RS2307741 (Iniciador)	0,025	--
RS621 (Iniciador)	0,025	--
DNA	1,000	1,000
Volume Final	12,500	5,000

Tabela 8: Condições da PCR para os sistemas de multiplexação do cromossomo X e Y.

Sistema	Condições de PCR
<i>Hexaplex Indels Cromossomo X</i>	Passo 1: 94°C - 3' Passo 2: 94°C - 1' Passo 3: 65°C - 1' Passo 4: 72°C - 1' Repete-se 30 vezes os passos 2, 3 e 4. Passo 5: 72°C - 60'
<i>PowerPlex® Y</i>	Passo 1: 92°C - 2' Passo 2: 94°C - 30" Passo 3: 55°C - 1'15" Passo 4: 72°C - 15" Repete-se 32 vezes os passos 2, 3 e 4. Passo 5: 72°C - 10'

3.6 Reação de Genotipagem

Os produtos amplificados para as Indels foram analisados em um seqüenciador *ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* e para os Y-STR, em um *ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Os dados gerados foram analisados por meio do programa *GeneScan® 3.7 (Applied Biosystems)* e os alelos foram designados utilizando o *Genotyper® 3.7 (Applied Biosystems)*.

Para genotipagem, as amostras foram preparadas com 8,85 µL de formamida *Hi-Di™ (Applied Biosystems, P/N4311320)*; 0,15 µL de padrão de peso molecular *GS 500 LIZ (Applied Biosystems, P/N 4322682)* e 1,0 µL de produto amplificado de PCR, no caso das Indels, e em 9,50 µL de formamida *Hi-Di™ (Applied Biosystems,*

P/N4311320); 0,50 µL de padrão de peso molecular ILS 600 (*Promega*) e 1,0 µL de produto amplificado de PCR. Posteriormente, as amostras foram injetadas por 22 s, a 5 kilovolts e corridas a 15 kilovolts por 25 min. A definição dos alelos para as Indels X foi feita por meio da comparação com amostras previamente analisadas (Monteiro, 2007), enquanto que para os STRs do cromossomo Y esta definição foi feita por meio de comparação com a escada alélica fornecida pelo fabricante. As figuras 5 e 6 apresentam exemplos de eletroferogramas observados na genotipagem dos marcadores Indels do cromossomo X e Y, respectivamente.

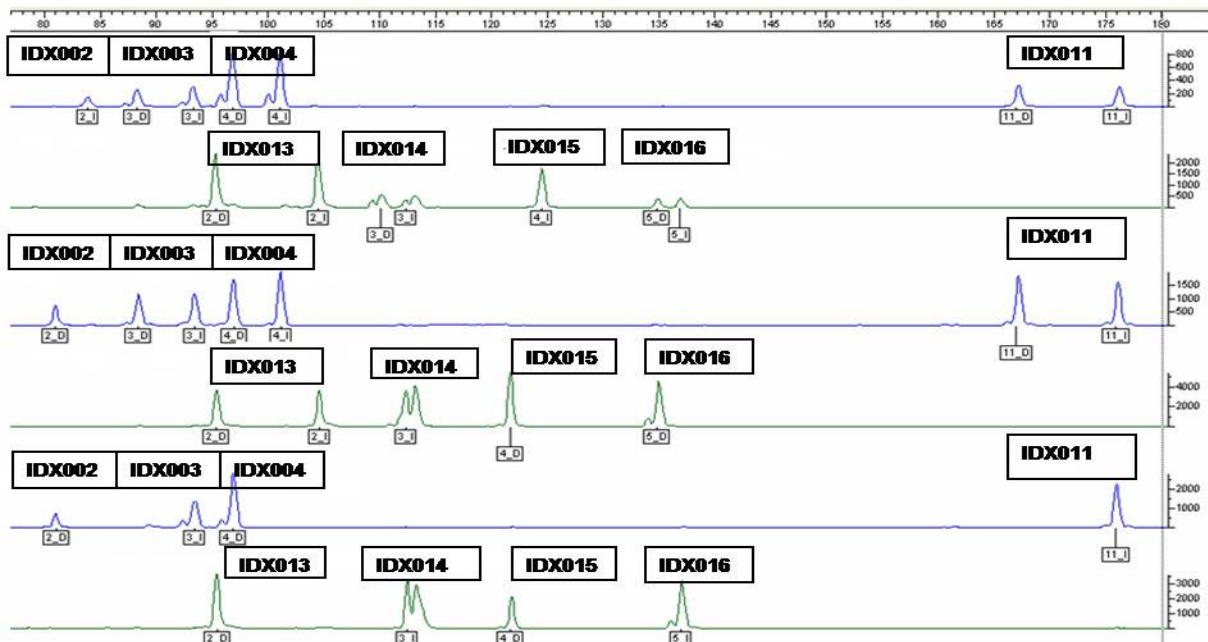


Figura 5: Eletroferograma demonstrando a multiplexação do sistema original de oito Indels do cromossomo X em três indivíduos diferentes (Monteiro, 2007). Destaca-se que as duas primeiras amostras são femininas e a terceira masculina. As Indels identificadas por IDX015 e IDX016 foram excluídas do processo de análise.

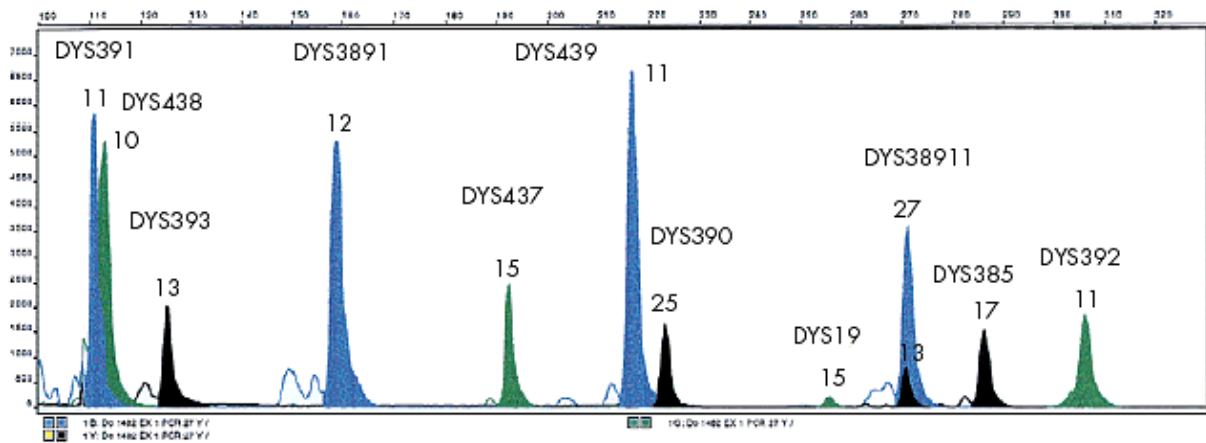


Figura 6: Eletroferograma demonstrando a multiplexação do sistema *PowerPlex® Y* de doze STRs do cromossomo Y e seus respectivos alelos (Schilz *et al.*, 2006).

3.7 Análise estatística

Como afirmado na introdução, as metodologias estatísticas acompanharam os avanços na área de biologia molecular e, atualmente, nos trabalhos de genética de populações utiliza-se principalmente a análise de estruturação populacional, contribuição genética ancestral e biogeografia.

Para a estruturação genética populacional utiliza-se a distribuição das freqüências alélicas de diversos marcadores genéticos com o intuito de quantificar as diferenças entre duas ou mais populações. A divergência estrutural nas populações pode ocorrer em grupos que possuem freqüências alélicas diferentes entre e dentro dos subgrupos ou em populações miscigenadas cujos contribuintes parentais para a sua formação são diferentes (Hartl e Clark, 1997). Para populações humanas, a maior parte da variabilidade genética ocorre entre os indivíduos de cada uma das populações, enquanto a menor parte é devido às diferenças entre estas (Rosenberg *et al.*, 2002).

Já a contribuição genética ancestral pode ser obtida por meio da comparação da freqüência de alelos de determinadas regiões genômicas entre a população alvo e as possíveis parentais, ou seja, aquelas que contribuíram de alguma forma com alguns indivíduos, genomas, para a formação da população alvo. O efeito fundador,

aliado à deriva genética, propicia que as frequências dos alelos específicos da população parental sejam mantidas em nível alto, enquanto que o fluxo gênico tende a equalizar as frequências alélicas populacionais.

A biogeografia, já elucidada anteriormente, busca aliar a distribuição geográfica da população humana com dados de estrutura genética populacional. Deste modo, alguns marcadores genéticos são capazes de fornecer dados que permitem observar a convergência da distribuição das proporções alélicas destas regiões genômicas com o posicionamento geográfica de populações objeto de estudo e parentais.

Variabilidade genética

As frequências alélicas dos marcadores Indels do cromossomo X e STRs do Y em cada comunidade remanescente de quilombo foram calculadas utilizando-se o programa *Arlequin 3.01* (Excoffier *et al.*, 2005 e 1992). Esse mesmo programa também foi utilizado para o cálculo da heterozigose observada, heterozigose estimada, teste das frequências genotípicas quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, determinação haplotípica dos dados genotípicos (Slatkin e Excoffier, 1996 e Excoffier e Slatkin, 1995) e distribuição haplotípica. Foi construída uma rede de relações haplotípicas para cada conjunto de marcadores por meio do programa *Network 4.5.1.0* (Bandelt *et al.*, 1999).

A correção de Bonferroni foi empregada para ajustar o nível de significância de 5% para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido à quantidade relativamente alta de testes realizados. Esse ajuste é recomendável para minimizar a ocorrência de resultados significativos devido a flutuações estatísticas. Para essa correção foi utilizado o procedimento disponível no endereço eletrônico do *Simple Interactive Statistical Analysis* (SISA - home.clara.net/sisa/bonhlp.htm).

Análise de diferenciação genética molecular

Os conceitos de estrutura populacional foram desenvolvidos por Sewall Wright para quantificar diferenças genéticas entre subgrupos a partir dos níveis de heterozigose média e sua relação entre e dentro de populações. Estas relações foram matematicamente categorizadas e são conhecidas por estatística F de Wright

ou por índice de fixação. Este índice foi originalmente desenvolvido para determinar o nível de endocruzamento e acasalamento aleatório, mas sua aplicação foi posteriormente estendida para cálculos de estruturação populacional.

A análise da variância molecular foi aplicada para analisar a distribuição da diversidade intra e interpopulacional. Este método utiliza dados de distância genética e de estatística F da frequência dos alelos e dos haplótipos para avaliar a subestruturação populacional, levando em consideração diversos níveis de hierarquia previamente definidos (Excoffier *et al.*, 2005 e 1992).

O programa *Arlequin 3.01* foi utilizado para a análise de variância molecular (AMOVA) e para estimativas de F_{st} e diferenciação par a par entre as populações. Além disso, utilizou-se esse mesmo programa para realizar comparações entre os dados de frequências alélicas das Indels e dos STR entre os quatro remanescentes de quilombos e populações urbanas brasileiras. Para isso, foram realizadas estimativas de F_{st} para cada *locus* baseadas em tabelas de contingências, onde se analisa o número de populações estudadas e a frequência alélica de cada *locus*. As frequências alélicas dos *loci* Indels de X e Y-STR na população brasileira foram obtidas a partir dos trabalhos desenvolvidos por Monteiro, 2007 e Grattapaglia *et al.*, 2004, respectivamente.

A matriz de valores de F_{st} para cada par de populações de cada um dos conjuntos de marcadores, construída pelo *Arlequin 3.01*, foi utilizada para construir árvores filogenéticas por meio do programa *Genetic Data Analysis – GDA 1.1* (Lewis e Zaykin, 2001) e visualizados pelo *TreeView 1.6.6*. (Page, 1996).

Mistura genética

As estimativas de contribuição das populações parentais na constituição genética destes remanescentes de quilombos foram calculadas pelo método de identidade genética, utilizando-se o programa *ADMIX* (Chakraborty, 1985). Este utiliza a média ponderada de frequências gênicas das populações parentais para realizar uma comparação com os dados das populações estudadas. Para esta análise, serão considerados três grupos parentais: africanos (subsaarianos), europeus (preferencialmente, portugueses) e ameríndios da América do Sul.

As frequências alélicas dos marcadores Indels referentes às populações parentais dos remanescentes de quilombos foram obtidas a partir do banco de dados de SNPs do genoma humano disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/> (acessado em abril de 2009). Não foram encontradas as proporções alélicas dos sistemas RS17394 e RS621 para as populações africanas e ameríndia, portanto, estes foram retirados desta análise.

A distribuição das proporções alélicas para os marcadores do tipo microsatélite do cromossomo Y foram obtidas a partir de dados presentes nos trabalhos sobre a população portuguesa (Alves *et al.*, 2007), africana (Coelho *et al.*, 2009) e ameríndia (Leite *et al.*, 2008).

Índice de Ancestralidade Africana

Utilizando-se os dados obtidos a partir dos marcadores Indels, foi calculado para cada indivíduo dos quatro remanescentes de quilombos estudados um índice de ancestralidade africana (IAA), que é dado por:

$$IAA = \log_{10} (PA/PE)$$

onde PA é a probabilidade de um dado genótipo multi-*locus* ocorrer na população Africana e PE é a probabilidade desse mesmo genótipo ocorrer na população européia, como descrito por Parra *et al.* (2003). Desta forma, quanto maior o índice gerado, maior a contribuição africana na constituição genética do indivíduo.

Para o cálculo das probabilidades, foram utilizadas as mesmas frequências alélicas usadas nas estimativas de mistura genética, onde também foram excluídos os sistemas RS17394 e RS621. Cada probabilidade de ocorrência de um genótipo multi-*locus* corresponde à multiplicação das probabilidades de ocorrência de cada alelo separadamente.

3.8 Genética e Quilombos

Como ressaltado na introdução deste trabalho, algumas comunidades remanescentes de quilombos já foram estudadas geneticamente. Com o intuito de agrupar os dados já descritos na bibliografia, para facilitar futuras análises comparativas e consultivas, um banco de dados da constituição genética dessas comunidades na América Latina foi iniciado.

Basicamente, as freqüências alélicas dos marcadores genéticos já avaliados para qualquer remanescente de quilombo situado na América Latina foram coletadas de artigos publicados em revistas científicas e dissertações ou teses defendidas. Complementarmente, as freqüências alélicas destes mesmos marcadores foram obtidas para as populações parentais – ameríndia, européia e africana, com o objetivo de realizar comparações de mistura genéticas entre as populações quilombolas.

Os dados produzidos a partir deste banco de dados genético de remanescentes de quilombos da América Latina são parte integrante de um capítulo a parte do produzido para dados obtidos a partir de análises laboratoriais, intitulado “Genética e Quilombos”. O anexo C apresenta uma tabela informando as populações remanescentes de quilombos caracterizadas geneticamente, as entidades genéticas analisadas e as respectivas referências bibliográficas.

Destaca-se que algumas das populações analisadas pelos diversos grupos de pesquisa ainda não possuem a certidão de reconhecimento oficial, ou ao menos são certificadas pela Fundação Cultural Palmares. Isto ocorre, muito provavelmente, pela falta de políticas afirmativas com foco nestas comunidades afro derivadas.

Indels do Cromossomo X

4 RESULTADOS

4.1 Variabilidade Genética

As freqüências dos alelos das Indels analisadas nas populações afro derivadas estão apresentadas na tabela 9. Estes dados, além de serem calculados para as comunidades amostradas por inteiro, foram divididos entre as amostras masculinas e femininas por necessidades estatísticas. Como esperado, todos os alelos dos seis marcadores foram observados em cada uma das comunidades. A heterozigose observada e a esperada, para cada uma das amostras femininas, também estão disponíveis na tabela 9, assim como a medida da discrepância entre as proporções genotípicas observadas e esperadas segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

De maneira geral houve compartilhamento quanto aos alelos mais freqüentes entre as populações. No caso do *locus* RS16460 todas as populações apresentaram o mesmo alelo, RS16460*ins, como mais freqüente. Para os demais *loci*, a distribuição das freqüências alélicas foi um pouco diferente, tendo em vista que em todos os casos alguma população apresentava o alelo modal diferente das demais. Kalunga, por exemplo, apresentou o alelo RS17394*del como modal para este sistema, contrariando o observado para as outras três populações. Mocambo, por sua vez diferiu-se para o sistema RS2307741, em que o alelo correspondente à ausência da Indel foi o mais freqüente. Por fim, Riacho de Sacutiaba foi a que apresentou mais divergências quanto à distribuição dos alelos na população, uma vez que foi observado um equilíbrio na distribuição alélica do marcador RS5743760 e, para os sistemas RS2307707 e RS621, os alelos modais foram o RS2307707*del e RS621*ins, diferentemente do padrão observado nas demais comunidades. O alelo RS621*del apresentou as maiores freqüências alélicas dentre as Indels, com uma média de 71,7% de ocorrência entre as amostras. Os gráficos exibidos na figura 7 apresentam a distribuição das freqüências alélicas nos quatro remanescentes de quilombos e nas populações brasileira e parentais, é possível visualizar as divergências nas distribuições destas proporções e ausência de dados para os marcadores RS17394 e RS621 nas populações parentais africanas e ameríndia.

Tabela 9: Distribuição das frequências alélicas de cada uma das Indels analisadas para as comunidades remanescentes de quilombos; heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e); e dados estatísticos referentes as proporções genotípicas.

Kalunga	RS16460		RS17394		RS2307707		RS5743760		RS2307741		RS621	
	del	in	del	in	del	in	del	in	del	in	del	in
f(xx)	0,3966	0,6034	0,5517	0,4483	0,3448	0,6552	0,5000	0,5000	0,2414	0,7586	0,8276	0,1724
f(xy)	0,2308	0,7692	0,5897	0,4103	0,5385	0,4615	0,3333	0,6667	0,2308	0,7692	0,7179	0,2821
f(tot)	0,3299	0,6701	0,5670	0,4330	0,4227	0,5773	0,4330	0,5670	0,2371	0,7629	0,7835	0,2165
H_o		0,3793		0,6207		0,4828		0,4483		0,2759		0,3448
H_e		0,4870		0,5033		0,4598		0,5088		0,3727		0,2904
χ^2		1,2481		1,8829		0,1358		0,3103		1,7657		1,2587
GL		1		1		1		1		1		1
p		0,2639		0,1700		0,7125		0,5775		0,1839		0,2619
Mocambo	RS16460		RS17394		RS2307707		RS5743760		RS2307741		RS621	
	del	in	del	in	del	in	del	in	del	in	del	in
f(xx)	0,4844	0,5156	0,3281	0,6719	0,5000	0,5000	0,4219	0,5781	0,5469	0,4531	0,5938	0,4063
f(xy)	0,1600	0,8400	0,3600	0,6400	0,4000	0,6000	0,4400	0,5600	0,5600	0,4400	0,6000	0,4000
f(tot)	0,3933	0,6067	0,3371	0,6629	0,4719	0,5281	0,4270	0,5730	0,5506	0,4494	0,5955	0,4045
H_o		0,4688		0,6563		0,3125		0,3438		0,4063		0,6875
H_e		0,5074		0,4479		0,5079		0,4955		0,5035		0,4901
χ^2		0,1214		7,6322		4,5000		2,7904		1,0402		5,7828
GL		1		1		1		1		1		1
p		0,7276		0,0057		0,0339		0,0948		0,3078		0,0162

Rio das Rãs	RS16460		RS17394		RS2307707		RS5743760		RS2307741		RS621	
	del	in	del	in	del	in	del	in	del	in	del	In
f(xx)	0,5000	0,5000	0,4595	0,5405	0,2838	0,7162	0,3514	0,6486	0,4459	0,5541	0,7973	0,2027
f(xy)	0,4286	0,5714	0,3714	0,6286	0,3429	0,6571	0,5429	0,4571	0,6000	0,4000	0,9143	0,0857
f(tot)	0,4771	0,5229	0,4312	0,5688	0,3028	0,6972	0,4128	0,5872	0,4954	0,5046	0,8349	0,1651
Ho		0,5676		0,6487		0,2973		0,5405		0,5676		0,4054
He		0,5069		0,5035		0,4121		0,4621		0,5009		0,3277
χ^2		0,6757		3,4619		2,6703		1,2786		0,8166		2,3916
GL		1		1		1		1		1		1
p		0,4111		0,0628		0,1022		0,2582		0,3662		0,1220
Sacutiaba	RS16460		RS17394		RS2307707		RS5743760		RS2307741		RS621	
	del	in	del	in	del	in	del	in	del	in	del	in
f(xx)	0,1111	0,8889	0,4444	0,5556	0,5556	0,4444	0,5556	0,4444	0,3333	0,6667	0,3889	0,6111
f(xy)	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,3750	0,6250	0,6250	0,3750	0,3750	0,6250
f(tot)	0,2308	0,7692	0,4615	0,5385	0,5385	0,4615	0,5000	0,5000	0,4231	0,5769	0,3846	0,6154
Ho		0,2222		0,6667		0,4444		0,2222		0,4444		0,5556
He		0,2092		0,5229		0,5229		0,5229		0,4706		0,5033
χ^2		0,1406		1,1025		0,0900		2,7225		0,0000		0,2565
GL		1		1		1		1		1		1
p		0,7077		0,2937		0,7642		0,0989		1,0000		0,6125

* f(xx) = frequência alélica na amostra feminina; f(xy) = na amostra masculina; f(tot) = na amostra total; χ^2 =qui-quadrado; e GL = grau de liberdade

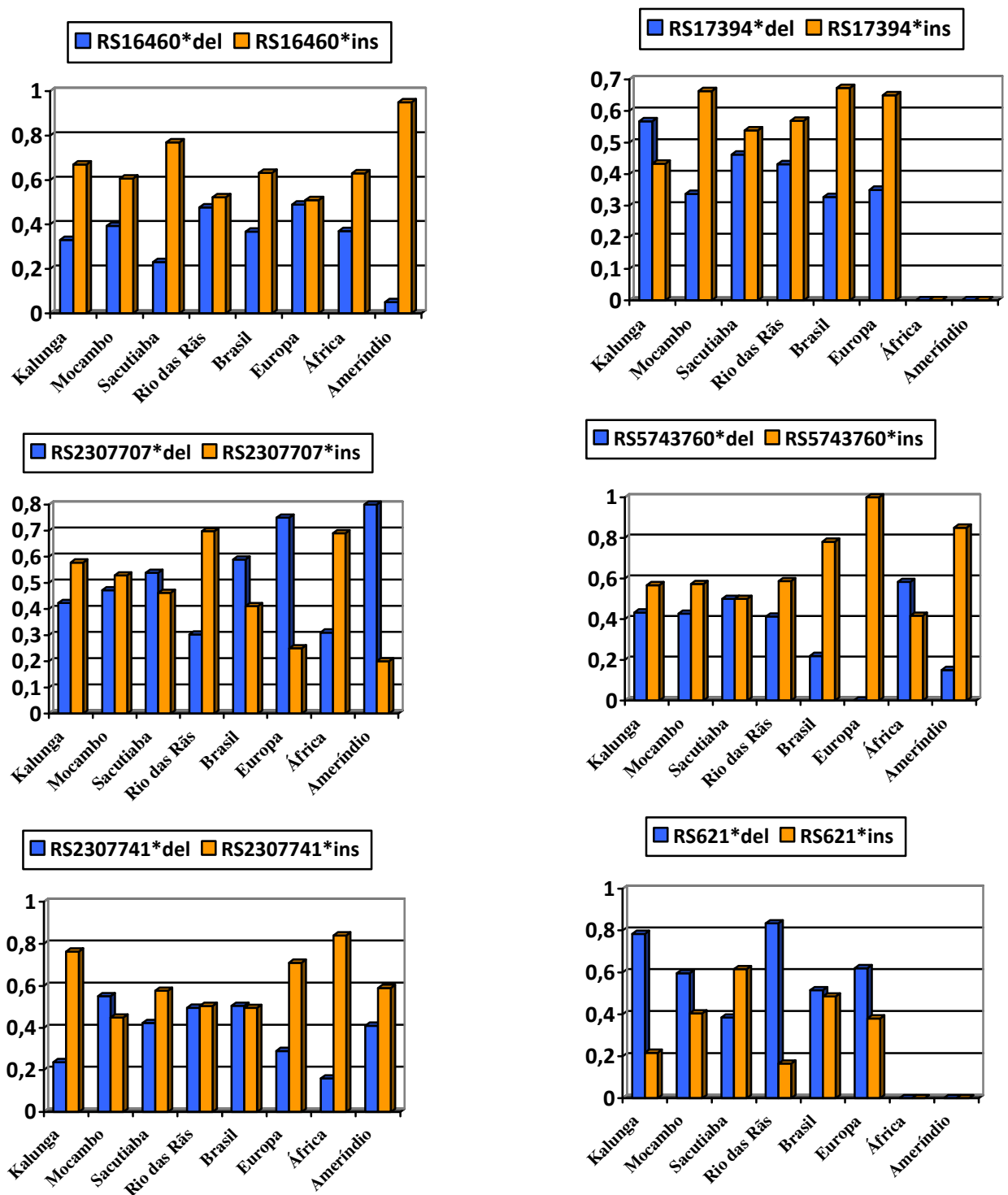


Figura 7: Distribuição das freqüências alélicas dos *loci* Indel nas quatro comunidades remanescentes de quilombos, na população urbana brasileira (Monteiro, 2007) e nos três grupos parentais (Human Genome Database of SNPs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/> acessado em abril de 2009).

As amostras femininas de Kalunga, Rio das Rãs e Riacho de Sacutiaba encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os *loci* Indels estudados, visto que o nível de significância 5% para o grau de liberdade definido é de 3,84, e como os valores de qui-quadrado obtidos na distribuição das proporções alélicas são menores que isso, a hipótese nula de que a população está em equilíbrio Hardy-Weinberg não deve ser rejeitada. Mocambo, ao contrário, apresentou valores significativos de p ($p < 0,05$) para os *loci* RS17394 (qui-quadrado = 7,6322; $p = 0,0057$), RS2307707 (qui-quadrado = 4,5000; $p = 0,0339$), e RS621 (qui-quadrado = 5,7828; $p = 0,0162$). Entretanto, utilizando a correção de Bonferroni, o valor de alfa, para o total de 24 testes, passa a ser de 0,0021 e, portanto, nenhum dos desvios observados fica mantido.

Com relação às amostras populacionais masculinas, a biologia do cromossomo X, como exposto na introdução, permite nestes casos o agrupamento automático de alelos de diversos marcadores presentes em seu genoma e a conseqüente formação de haplótipos. No caso das amostras femininas, como não é conhecido a fase gamética dos *loci*, foi necessário inferir os haplótipos por meio do algoritmo *EM zipper* (Slatkin e Excoffier, 1996). Os haplótipos observados e a ocorrência destes em cada uma das quatro comunidades afro descendentes estão apresentados na tabela 10.

Foram identificados 42 haplótipos - Indel X - diferentes para os 107 cromossomos X de amostras masculinas analisados e 36 para os 214 femininos das populações de Kalunga, Rio das Rãs, Mocambo e Riacho de Sacutiaba. No total, foram encontrados 53 haplótipos, sendo que destes, 17 foram encontrados apenas em amostras masculinas e outros 11 só em amostras femininas. A figura 8 apresenta uma rede da relação evolutiva entre os haplótipos observados nas comunidades remanescentes de quilombos.

Os valores de diversidade haplotípica calculados por meio do programa *Arlequin 3.01* foram altos em todas as populações: Rio das Rãs $h = 0,9626 \pm 0,0055$ (34 haplótipos); Kalunga $h = 0,9618 \pm 0,0074$ (36 haplótipos); Riacho de Sacutiaba $h = 0,9599 \pm 0,0226$ (17 haplótipos); e Mocambo $h = 0,9691 \pm 0,0071$ (37 haplótipos).

Tabela 10: Distribuição dos haplótipos do cromossomo X nos remanescentes de quilombos analisados.

Haplótipo	RS16460	RS17384	RS2030770	RS574376	RS230774	RS621	Kal Fem	Moc Fem	RR Fem	Sac Fem	Tot Fem	Kal Masc	Moc Masc	RR Masc	Sac Masc	Tot Masc	Kal	Moc	RR	Sac	Tot
h01	del	del	del	del	del	del	1	--	1	--	2	--	--	2	--	2	1	--	3	--	4
h02	del	del	del	del	ins	del	--	--	--	--	--	1	--	--	--	1	1	--	--	--	1
h03	del	del	del	ins	del	del	--	--	--	--	--	--	--	1	--	1	--	--	1	--	1
h04	del	del	del	ins	del	ins	--	--	--	--	--	--	--	--	2	2	--	--	--	2	2
h05	del	del	del	ins	ins	del	3	2	6	--	11	2	1	--	--	3	5	3	6	--	14
h06	del	del	ins	del	del	del	2	1	2	--	5	--	--	1	--	1	2	1	3	--	6
h07	del	del	ins	del	ins	del	9	2	7	--	18	1	--	--	--	1	10	2	7	--	19
h08	del	del	ins	ins	del	del	--	--	--	--	--	--	--	1	--	1	--	--	1	--	1
h09	del	del	ins	ins	del	ins	--	2	2	--	4	--	--	--	1	1	--	2	2	1	5
h10	del	del	ins	ins	ins	del	3	--	3	--	6	2	--	--	--	2	5	--	3	--	8
h11	del	ins	del	del	del	del	--	--	--	--	--	--	1	1	--	2	--	1	1	--	2
h12	del	ins	del	ins	del	del	1	9	9	--	19	--	1	1	1	3	1	10	10	1	22
h13	del	ins	del	ins	ins	del	--	1	--	--	1	3	--	--	--	3	3	1	--	--	4
h14	del	ins	ins	del	del	del	1	3	2	--	6	--	--	3	--	3	1	3	5	--	9
h15	del	ins	ins	del	ins	del	--	--	--	--	--	--	--	1	--	1	--	--	1	--	1
h16	del	ins	ins	ins	del	del	--	--	--	--	--	--	--	2	--	2	--	--	2	--	2
h17	del	ins	ins	ins	ins	del	1	1	3	--	5	--	1	1	--	2	1	2	4	--	7
h18	del	ins	ins	ins	ins	ins	--	--	1	--	1	--	--	1	--	1	--	--	2	--	2
h19	ins	del	del	del	del	del	--	--	--	--	--	2	--	1	--	3	2	--	1	--	3
h20	ins	del	del	del	ins	del	--	--	--	--	--	2	1	--	--	3	2	1	--	--	3
h21	ins	del	del	ins	del	del	--	1	--	--	1	--	--	1	--	1	--	1	1	--	2
h22	ins	del	del	ins	ins	del	--	--	--	--	--	4	--	1	--	5	4	--	1	--	5

Haplótipo	RS16460	RS17384	RS2030770	RS574376	RS230774	RS621	Kal Fem	Moc Fem	RR Fem	Sac Fem	Tot Fem	Kal Masc	Moc Masc	RR Masc	Sac Masc	Tot Masc	Kal	Moc	RR	Sac	Tot
h23	ins	del	del	ins	ins	ins	--	1	--	--	1	2	--	--	--	2	2	1	--	--	3
h24	ins	del	ins	del	del	del	2	--	--	--	2	--	--	1	--	1	2	--	1	--	3
h25	ins	del	ins	del	del	ins	--	--	--	--	--	2	3	--	--	5	2	3	--	--	5
h26	ins	del	ins	del	ins	ins	--	1	3	--	4	1	--	1	--	2	1	1	4	--	6
h27	ins	del	ins	ins	del	del	1	1	5	1	8	--	1	3	--	4	1	2	8	1	12
h28	ins	del	ins	ins	del	ins	--	--	--	--	--	--	1	--	--	1	--	1	--	--	1
h29	ins	del	ins	ins	ins	del	4	2	4	--	10	2	--	--	--	2	6	2	4	--	12
h30	ins	del	ins	ins	ins	ins	--	--	--	1	1	2	2	--	1	5	2	2	--	2	6
h31	ins	ins	del	del	del	del	--	--	--	--	--	--	1	1	--	2	--	1	1	--	2
h32	ins	ins	del	del	ins	del	1	3	--	3	7	1	1	2	--	4	2	4	2	3	11
h33	ins	ins	del	del	ins	ins	--	--	--	--	--	--	--	--	1	1	--	--	--	1	1
h34	ins	ins	del	ins	del	del	--	--	--	--	--	1	--	1	--	2	1	--	1	--	2
h35	ins	ins	del	ins	del	ins	--	--	--	--	--	1	3	--	--	4	1	3	--	--	4
h36	ins	ins	del	ins	ins	del	5	1	3	--	9	2	1	--	--	3	7	2	3	--	12
h37	ins	ins	ins	del	del	del	2	2	5	2	11	--	--	1	1	2	2	2	6	3	13
h38	ins	ins	ins	del	ins	del	--	--	--	--	--	3	3	3	1	10	3	3	3	1	10
h39	ins	ins	ins	del	ins	ins	3	5	5	1	14	--	1	1	--	2	3	6	6	1	16
h40	ins	ins	ins	ins	del	del	1	3	3	--	7	--	3	--	--	3	1	6	3	--	10
h41	ins	ins	ins	ins	del	ins	--	3	3	1	7	3	--	--	--	3	3	3	3	1	10
h42	ins	ins	ins	ins	ins	del	8	3	5	1	17	2	--	3	--	5	10	3	8	1	22
h43	del	del	ins	ins	ins	ins	--	1	--	1	2	--	--	--	--	--	--	1	--	1	2
h44	del	ins	del	del	del	ins	--	2	--	--	2	--	--	--	--	--	--	2	--	--	2
h45	del	ins	del	del	ins	del	2	3	1	--	6	--	--	--	--	--	2	3	1	--	6
h46	del	ins	del	ins	del	ins	--	1	--	1	2	--	--	--	--	--	--	1	--	1	2

Haplótipo	RS16460	RS17384	RS2030770	RS574376	RS230774	RS621	Kal Fem	Moc Fem	RR Fem	Sac Fem	Tot Fem	Kal Masc	Moc Masc	RR Masc	Sac Masc	Tot Masc	Kal	Moc	RR	Sac	Tot
h47	del	ins	del	ins	ins	ins	1	1	--	--	2	--	--	--	--	--	1	1	--	--	2
h48	del	ins	ins	del	del	ins	--	2	--	--	2	--	--	--	--	--	--	2	--	--	2
h49	ins	del	del	del	del	ins	1	1	--	--	2	--	--	--	--	--	1	1	--	--	2
h50	ins	del	del	del	ins	ins	3	3	--	4	10	--	--	--	--	--	3	3	--	4	10
h51	ins	del	del	ins	del	ins	1	3	1	1	6	--	--	--	--	--	1	3	1	1	6
h52	ins	del	ins	del	ins	del	2	--	--	--	2	--	--	--	--	--	2	--	--	--	2
h53	ins	ins	del	ins	ins	ins	--	--	--	1	1	--	--	--	--	--	--	--	--	1	1
Total							82	58	64	74	214	39	25	35	8	107	97	89	109	26	321

* Kalunga (Kal); Mocambo (Moc); Rio das Rãs (RR), Riacho de Sacutiaba (Sac); Total (Tot); Amostra feminina (Fem) e amostra masculina (Masc).

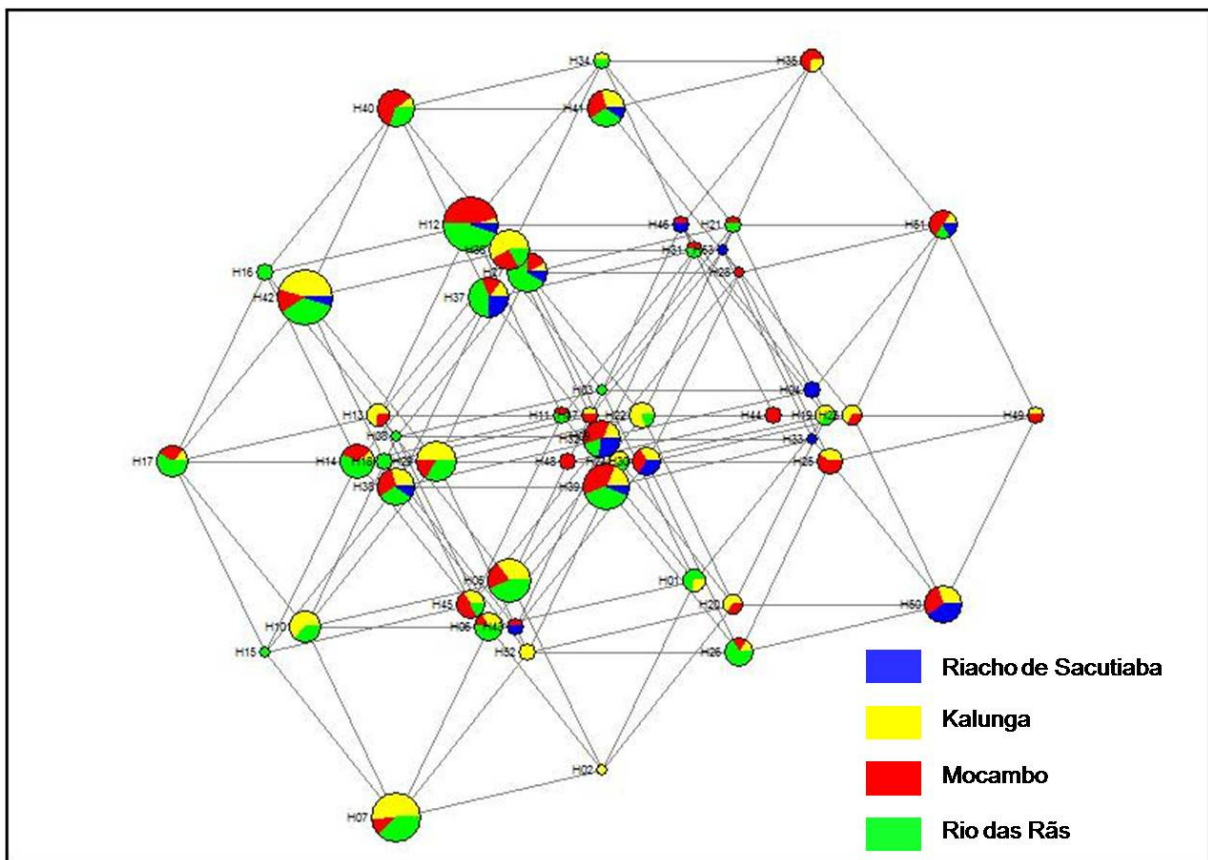


Figura 8: Rede da relação evolutiva entre os haplótipos observados nas comunidades remanescentes de quilombos formada para os marcadores Indels do cromossomo X

Com relação aos haplótipos população-exclusivos observados, a população que obteve o maior número de conjuntos exclusivos foi a de Rio das Rãs, 5 - 14,7%. Entretanto, em valores percentuais, Riacho de Sacutiaba apresentou 17,6% dos haplótipos do cromossomo X como únicos no conjunto amostral. Kalunga e Mocambo apresentaram os índices mais baixos para haplótipos exclusivos – 5,6% e 8,1%, respectivamente.

Kalunga e Riacho de Sacutiaba apresentaram uma distribuição haplotípica modal para o conjunto amostral masculino, sendo que os haplótipos h22 e h04 foram os mais frequentes, respectivamente. Enquanto que Mocambo e Rio das Rãs apresentaram uma distribuição com quatro modas cada, sendo os haplótipos h14,

h27, h38 e h42 e os h25, h35, h38 e h40 os mais encontrados nestas comunidades para as amostras masculinas, respectivamente. Para o conjunto feminino de haplótipos, o haplótipo h07 foi o mais encontrado em Kalunga; o h12, em Mocambo e Rio das Rãs; e o h50 em Riacho de Sacutiaba. A distribuição haplotípica no conjunto amostral completo apresenta muitas semelhanças à distribuição feminina, visto o tamanho efetivo amostral maior deste conjunto. Os haplótipos mais freqüentes em cada população mantêm-se os mesmos, exceto em Kalunga que passa a apresentar uma distribuição bimodal entre o h07 e o h42.

Esse último haplótipo aliado ao h12 além de terem sido os que registraram o maior número de ocorrências, foram um dos poucos a serem observados em todas as comunidades. Outros sete haplótipos - h27; h32; h37; h38; h39; h41; e h51, também foram compartilhados entre as quatro populações, porém com um número de ocorrências menor.

Os dados demográficos coletados juntamente com os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que: em Kalunga não houve nenhuma migração recente que contribuísse com novos haplótipos ao conjunto genético populacional; em Mocambo e Riacho de Sacutiaba seis novos haplótipos foram inseridos por meio de imigrantes, são eles, respectivamente: h13, h21, h43, h44, h47 e h49; e h09, h41, h42, h43, h46 e h51. Por fim, em Rio das Rãs, apenas dois – h06 e h51 – foram recentemente introduzidos.

4.2 Análise de Diferenciação Genética Molecular

A tabela 11 apresenta os valores de F_{st} relativos à análise de variância molecular (AMOVA) obtidos para o conjunto das amostras femininas e masculinas, separadamente, o conjunto total e a comparação deste último com os resultados obtidos para a população urbana brasileira (Monteiro, 2007). Tal separação amostral por gênero tem o seu embasamento na biologia do cromossomo X que se comporta como autossômico em células femininas e apresenta-se de forma hemizigota em células masculinas. Isso permite comparações quanto à evolução diferencial do cromossomo X em células masculinas e femininas. Os resultados destas análises mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as populações estudadas.

Tabela 11: Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) obtidos para os conjuntos amostrais das populações remanescentes de quilombos (RQ) e também para a comparação dessas com dados da população urbana brasileira.

Amostra	Fonte de Variação	Taxa de Variação (%)
RQ Feminina	F_{st}	4,65
	Variação Intrapopulacional (V_{intra})	95,35
	p	0,0000+-0,0000
RQ Masculina	F_{st}	1,17
	Variação Intrapopulacional (V_{intra})	98,83
	p	0,0215+-0,0043
RQ	F_{st}	0,14
	Variação Intrapopulacional (V_{intra})	99,86
	p	0,0479+-0,0080
RQ x Br	F_{st}	0,33
	Variação Intrapopulacional (V_{intra})	99,67
	p	0,0000+-0,0000

A análise de variância molecular (AMOVA) *locus a locus* está disponível na tabela 12. Comparações das proporções de cada marcador foram realizadas entre os dados das populações remanescentes de quilombos e entre estas e os resultados obtidos com estes marcadores genéticos para a população brasileira (Monteiro, 2007). Por meio destas análises, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas para dois dos marcadores no caso da comparação entre os remanescentes de quilombos, os *loci* RS2307741 e RS621. Já na comparação entre as comunidades afro derivadas e a população urbana brasileira, o quadro foi oposto, sendo que apenas os *loci* RS16460 e RS2307741 apresentaram uma distribuição acima do valor de α (0,05).

Tabela 12: Análise de variância molecular (AMOVA) para cada Indel do cromossomo X obtida na comparação entre os dados das populações remanescentes de quilombos (RQ) e entre estas e dados da população brasileira (Br - Monteiro, 2007). V_{intra} significa variação intrapopulacional.

	RS16460	RS17394	RS2307707	RS5743760	RS2307741	RS621
RQ						
F_{st}	0,0133	0,0293	0,0150	0,0000	0,0780	0,0975
V_{intra}	0,9867	0,9707	0,9850	1,0000	0,9220	0,9025
p	0,165+-0,011	0,070+-0,006	0,150+-0,013	0,928+-0,008	0,001+-0,001	0,000+-0,000
RQ x Br						
F_{st}	0,0000	0,0269	0,0606	0,0907	0,0079	0,0807
V_{intra}	1,0000	0,9731	0,9394	0,9093	0,9921	0,9193
p	0,625+-0,013	0,015+-0,004	0,000+-0,000	0,000+-0,000	0,123+-0,010	0,000+-0,000

A análise de diferenciação populacional par a par indicou que apenas três pares (Kalunga e Mocambo; Kalunga e Brasil, e Rio das Rãs e Brasil) apresentam diferenças estatisticamente significativas, os dados desta análise estão disponíveis na tabela 13.

Tabela 13: Estimativas de F_{st} para os pares de populações de remanescentes de quilombos e brasileira. A diagonal inferior apresenta as estimativas de F_{st} e a diagonal superior os valores de p correspondentes.

	Kalunga	Mocambo	Rio das Rãs	Sacutiaba	Brasil
Kalunga	*	0,0270	0,0541	0,3513	0,0000
Mocambo	0,0032	*	0,3153	0,8739	0,4144
Rio das Rãs	0,0016	0,0005	*	0,1261	0,0000
Sacutiaba	0,0001	-0,0032	0,0031	*	0,5769
Brasil	0,0067	0,0001	0,0058	-0,0010	*

4.3 Mistura Genética

A análise de mistura genética foi realizada para cada comunidade utilizando as freqüências alélicas dos marcadores Indels obtidas neste estudo e os dados referentes às populações parentais dos remanescentes de quilombos – européia, africana e ameríndia, no banco de dados de SNPs do genoma humano. As freqüências alélicas dos *loci* nas populações parentais encontram-se na tabela 14, assim como os dados referentes à população brasileira, disponibilizados por Monteiro (2007).

Tabela 14: Distribuição das freqüências dos alelos de inserção de cada uma das Indels analisadas para a população brasileira e para as representantes parentais dos remanescentes de quilombos (NCBI SNP *database*, 2009; Monteiro, 2007).

	RS16460	RS17394	RS2307707	RS5743760	RS2307741	RS621
Européia	0,5100	0,6500	0,2500	1,0000	0,7100	0,3800
Ameríndia	0,9500	--	0,2000	0,8500	0,5900	--
Africana	0,6300	--	0,6900	0,4170	0,8400	--
Brasil	0,6330	0,6730	0,4110	0,7810	0,4950	0,4850

Os resultados relativos à mistura genética encontram-se na tabela 15. Estes resultados chamaram a atenção porque, de todas as estimativas, apenas a comunidade de Kalunga e os dados da população brasileira apresentaram contribuição dos três grupos parentais analisados, nas demais comunidades, o componente europeu não foi observado.

As estimativas obtidas com os dados dos marcadores Indels indicaram que a contribuição africana, foi em todos os remanescentes, a maior. Além disso, a participação ameríndia também foi destacada. A população brasileira, ao contrário

dos remanescentes de quilombos, apresentou o componente europeu como o mais importante na análise destes marcadores Indels X específicos.

Tabela 15: Estimativas de mistura genética geradas pelo programa *ADMIX* (Chakraborty, 1985), utilizando dados dos marcadores Indels para os quatro remanescentes de quilombos e para a amostra da população urbana brasileira (Monteiro, 2007).

Comunidade	Populações Parentais			R ²
	África	Europa	Ameríndios	
Kalunga	0,7247 ± 0,0079	0,1180 ± 0,0248	0,1573 ± 0,0230	0,9998
Sacutiaba	0,6200 ± 0,0945	--	0,3800 ± 0,0945	0,9556
Rio das Rãs	0,9250 ± 0,2151	--	0,0750 ± 0,2151	0,9024
Mocambo	0,7326 ± 0,2246	--	0,2674 ± 0,2246	0,8417
Brasil	0,3840 ± 0,1325	0,4532 ± 0,4138	0,1628 ± 0,3834	0,8755

A distribuição das contribuições genético parentais nas populações de Rio das Rãs, Mocambo e Brasil apresentaram elevados coeficientes de desvios. Entretanto, o coeficiente de determinação - R², que representa a proporção da variabilidade observada definida por modelos estatísticos, é relativamente alto em todas as análises de mistura. Nagelkerke (1991) afirma que o coeficiente de determinação é a proporção da variação definida pelo modelo estatístico e que este deve variar entre 0 e 1, sendo 0 a rejeição total do modelo e 1 a perfeita compatibilidade entre o modelo estatístico e o observado.

As estimativas de mistura genética destes remanescentes de quilombos também foram calculadas para as amostras separadas por gênero. Na distribuição masculina (tabela 16) observou-se, novamente, um forte componente africano, com destaque às comunidades de Mocambo e Rio das Rãs. Esta última, juntamente com Kalunga, apresentou um percentual, apesar de pequeno, de contribuição europeia, e

a participação ameríndia foi observada em Kalunga e Riacho de Sacutiaba, principalmente, apesar do grande desvio observado neste último caso.

Tabela 16: Estimativas de mistura genética geradas pelo programa *ADMIX* (Chakraborty, 1985), utilizando dados dos marcadores Indels para as amostras masculinas dos quatro remanescentes de quilombos.

Masculina	Populações Parentais			R ²
	África	Europa	Ameríndios	
Kalunga	0,5103 ± 0,0345	0,0932 ± 0,0828	0,3966 ± 0,0568	0,9977
Sacutiaba	0,7490 ± 0,3116	--	0,2510 ± 0,3116	0,7429
Rio das Rãs	0,9554 ± 0,3000	0,0446 ± 0,3000	--	0,8353
Mocambo	0,9269 ± 0,0710	--	0,0731 ± 0,0710	0,9884

A tabela 17 apresenta as estimativas de mistura genética obtidas para a distribuição das proporções alélicas nas amostras femininas dos quatro remanescentes de quilombos estudados. As estimativas apresentaram valores próximos aos encontrados para cada uma das amostras populacionais inteiras. O destaque ficou, novamente, pela ausência de contribuição europeia, exceto em Kalunga, e o forte componente africano.

A figura 9, para uma melhor visualização das estimativas de mistura genética, apresenta um gráfico comparativo das estimativas de contribuições africana, europeia e ameríndia obtidas com os marcadores Indels específicos do cromossomo X nas quatro comunidades remanescentes de quilombos e no Brasil sem distinção de gênero entre as amostras.

Tabela 17: Estimativas de mistura genética geradas pelo programa *ADMIX* (Chakraborty, 1985), utilizando dados dos marcadores Indels para as amostras femininas dos quatro remanescentes de quilombos.

Feminina	Populações Parentais			R ²
	África	Europa	Ameríndios	
Kalunga	0,8515 ± 0,0551	0,1055 ± 0,1294	0,0430 ± 0,0908	0,9973
Sacutiaba	0,5665 ± 0,0046	--	0,4335 ± 0,0046	0,9999
Rio das Rãs	0,9151 ± 0,1914	--	0,0849 ± 0,1914	0,9195
Mocambo	0,7810 ± 0,2662	--	0,2190 ± 0,2662	0,8115

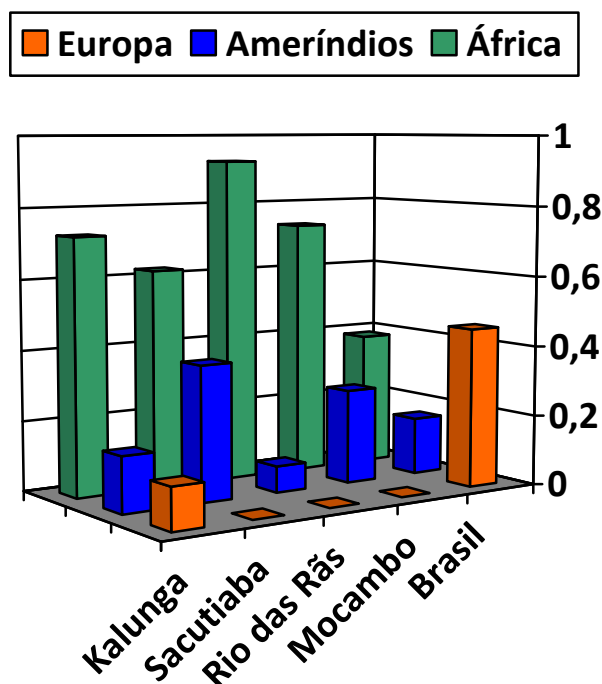


Figura 9: Gráfico de mistura genética nos remanescentes de quilombos e no Brasil a partir de estimativas obtidas para dados de Indels do cromossomo X.

A figura 10, finalmente, apresenta uma árvore filogenética em UPGMA, montada a partir da matriz de F_{st} produzida na análise de variância molecular, que evidencia a relação evolutiva entre as comunidades remanescentes de quilombos e as devidas populações parentais a partir de dados genéticos destes marcadores específicos do cromossomo X.

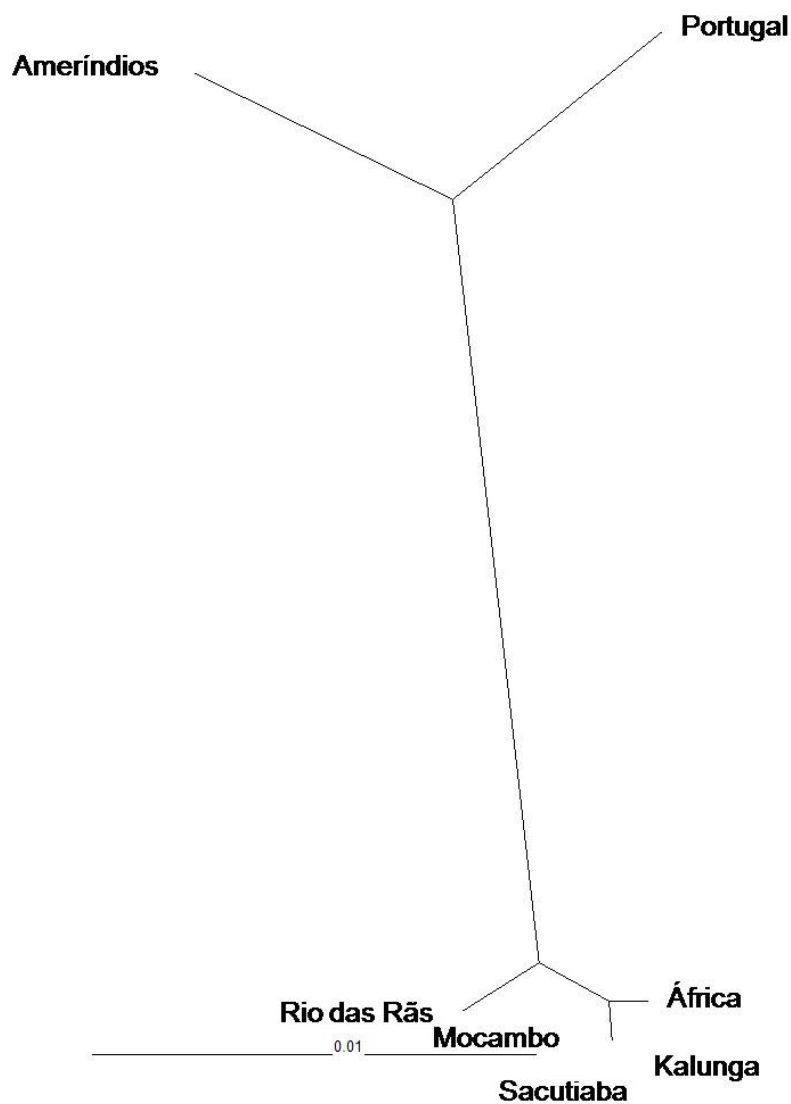


Figura 10: Árvore filogenética em UPGMA representando a relação evolutiva entre as comunidades remanescentes de quilombos e as devidas populações parentais obtida a partir de dados de Indels do cromossomo X.

4.4 Índice de Ancestralidade Africana

As figuras 11 e 12 representam as distribuições dos índices de ancestralidade africana individuais nas populações masculinas e femininas dos quatro remanescentes de quilombos, respectivamente. De acordo com a fórmula utilizada, quanto maior o índice, maior a contribuição africana na constituição genética individual (Parra *et al.*, 2003).

As populações apresentaram menores medianas para o IAA quando calculado para as amostras masculinas. Para a estimativa masculina, o índice variou de -0,9296 a 3,3714 (mediana = -0,2263) em Kalunga, de -1,1434 a 3,3714 (mediana = -0,2263) em Mocambo, de -1,1434 a 3,3714 (mediana = 2,0017) em Rio das Rãs, e de -1,1434 a 3,3714 (mediana = -0,0463) em Riacho de Sacutiaba. Na estimativa feminina, o índice variou de -1,6242 a 6,5290 (mediana = 2,7730) em Kalunga, de -2,0730 a 6,5290 (mediana = 1,7898) em Mocambo, de -2,0730 a 6,1977 (mediana = 2,2280) em Rio das Rãs, e de -1,0347 a 5,5868 (mediana = 3,2663) em Riacho de Sacutiaba. A mediana geral foi obtida por meio de uma média aritmética entre as duas distribuições por gênero. Rio das Rãs apresentou a maior mediana (2,1149), seguida de Riacho de Sacutiaba (1,6100) e Kalunga (1,2734), e, por fim, Mocambo (0,7818).

Rio das Rãs foi a única população que apresentou medianas com tendências africanas para os dois conjuntos amostrais. Enquanto que as demais apresentaram como padrão as medianas negativas para as amostras masculinas e positivas para as femininas. Rio das Rãs, Riacho de Sacutiaba e Kalunga apresentaram as maiores medianas de africanicidade, a primeira para as amostras masculinas e as demais para as femininas.

Devido às diferenças metodológicas para o cálculo do índice de ancestralidade africana, não foi possível realizar este teste para o conjunto global das amostras populacionais.

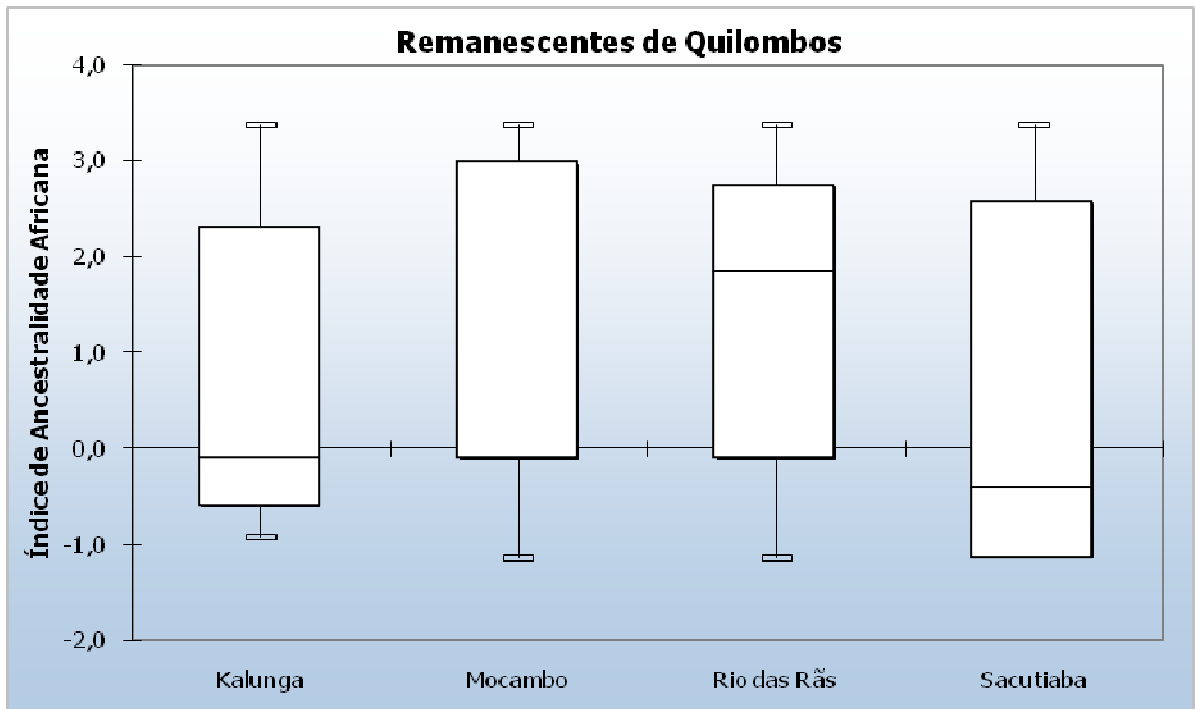


Figura 11: Gráfico mostrando a distribuição dos índices de ancestralidade africana (IAA) obtidos para as amostras masculinas pertencentes às quatro comunidades remanescentes de quilombos. Cada caixa representa os valores mais centrais da distribuição, sendo que o traço interno se refere à mediana e os limites inferior e superior representam o primeiro e o terceiro quartis, respectivamente. Em Mocambo a mediana coincidiu com o limite inferior da caixa de distribuição. Os riscos fora dos quartis referem-se aos valores extremos encontrados na observação.

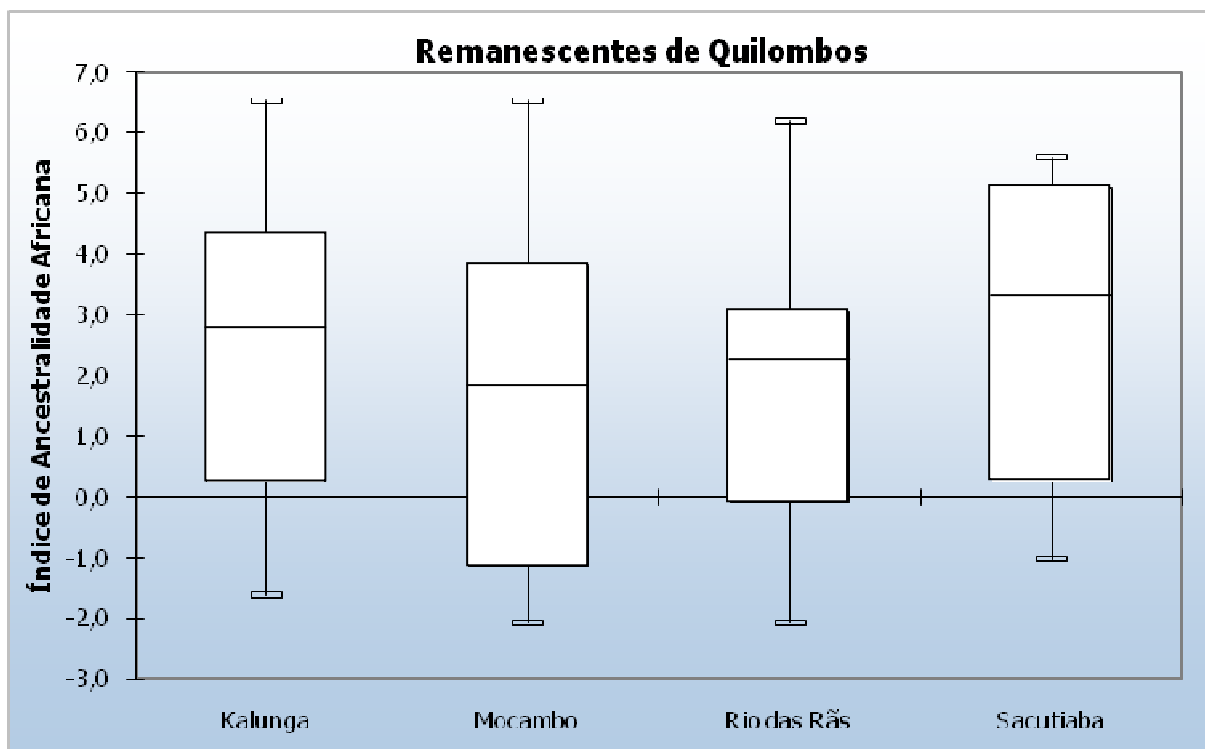


Figura 12: Gráfico mostrando a distribuição dos índices de ancestralidade africana (IAA) obtidos para as amostras femininas pertencentes às quatro comunidades remanescentes de quilombos.

5 DISCUSSÃO

O sistema produtivo escravo fez parte da história brasileira no período colonial. A formação dos quilombos se deu como consequência da exploração e do trabalho forçado, ou até mesmo após o abandono da mão-de-obra em regiões cuja exploração econômica se esgotara. A partir da quantidade de remanescentes de quilombos existente atualmente e a distribuição destes no território brasileiro pode-se inferir que a formação destas comunidades foi sistemática e obedeceu aos padrões de exploração econômica regionais, como verifica-se na figura 2, extraída do Segundo Cadastro Municipal de Territórios Quilombolas do Brasil (Anjos, 2009).

A maioria das comunidades quilombolas está localizada nos estados da região Nordeste, concentrada, principalmente, na faixa litorânea. Algumas localizadas no interior do país estão mais próximas de áreas urbanas ou à margem delas. Outras estão em regiões predominantemente rurais. Esta diferença na proximidade de centros urbanos aumenta ou diminui o nível de influência a que estão submetidas e, portanto, à susceptibilidade destas aos riscos que a industrialização e a urbanização trazem.

Conhecer a história dessas populações é conhecer uma parte importante da história do Brasil. Isto porque o isolamento não só geográfico, mas também cultural dos afro descendentes no Brasil, provavelmente, possibilitou a preservação de tradições e traços genéticos específicos, os quais podem auxiliar no entendimento ou aprimorar o conhecimento da história desta população no desenvolvimento da população brasileira. Entretanto, este isolamento também trouxe como consequência a marginalização social e o negligenciamento de sua história.

A genética de populações tem ajudado nessa tarefa de buscar o entender melhor o a história africana no Brasil . Apesar de representarem uma pequena fração dos trabalhos dessa área, os remanescentes de quilombos têm sido estudados por alguns pesquisadores no Brasil interessados em conhecer um pouco mais sobre a história de formação destas comunidades. Os trabalhos envolvendo genética de quilombos, em geral, buscam verificar o grau de miscigenação, subestruturação e variabilidade genética encontrado nestas populações. Em outros

casos, estimam o grau de contribuição genética de possíveis populações parentais na sua constituição.

5.1 Variabilidade Genética

A análise de dados de freqüências alélicas é a base da genética de populações. Esse tipo de estudo auxilia no conhecimento da história evolutiva de uma dada comunidade, pois pode indicar a ação de certos mecanismos evolutivos sobre essa população. Além disso, a comparação de freqüências alélicas pode mostrar se determinados grupos populacionais apresentam histórias similares ou não (Hartl e Clark, 1997).

Populações isoladas e semi-isoladas tendem a apresentar uma menor variabilidade genética do que populações não isoladas, devido ao fluxo gênico reduzido ou, até mesmo, a ausência de fluxo gênico por completo. Além disso, geralmente tais comunidades remanescentes de quilombos apresentam tamanho populacional reduzido e, conseqüentemente, as freqüências alélicas estão mais sujeitas à ação da deriva genética do que em populações maiores, podendo levar ao aumento ou a diminuição aleatória da freqüência de determinados alelos ao longo das gerações (Futuyma, 1998).

Com relação aos dados do cromossomo X para os seis marcadores Indels, observou-se que todas as comunidades remanescentes de quilombos apresentaram-se polimórficas para todos os *loci*, tanto para as amostras masculinas quanto para as femininas. De maneira geral houve compartilhamento quanto aos alelos mais freqüentes entre as populações afro derivadas. A distribuição das proporções alélicas demonstrou que o alelo RS16460*I foi o mais freqüente nas quatro comunidades, enquanto que os alelos RS621*D, RS5743760*I e RS2307707*I foram os mais comuns em Kalunga, Mocambo e Rio das Rãs, e os alelos RS17394*I e RS2307741*I só não foram encontrados em altas freqüências em Kalunga e Mocambo, respectivamente.

Quando comparado os resultados obtidos para as populações afro derivadas aqui estudadas com os dados da população urbana brasileira (Monteiro, 2007) e os obtidos para as populações parentais (Banco de Dados de SNPs – NCBI, 2009),

pode-se também observar uma distribuição padronizada para a Indel RS16460, com predominância do alelo referente à inserção, e diferenças populacionais para os demais marcadores.

A distribuição das proporções alélicas nas amostras masculinas e femininas evidenciou diferenças que podem ser explicadas pela associação entre a história de formação de cada comunidade e a hemizigose, à qual este cromossomo está submetido durante 1/3 do tempo evolutivo em que permanece nas células masculinas e não sofre ação dos efeitos da recombinação.

O poder de discriminação destes marcadores varia de 0,509 a 0,625 para mulheres e de 0,342 a 0,500 para homens, corroborando o esperado para marcadores bialélicos (Monteiro, 2007). Portanto, a diferença observada nesta taxa indica que é esperado que as frequências alélicas obtidas para as amostras de cada gênero destas comunidades afro descendentes apresentem desvios, os quais certamente podem levar a estruturação nos níveis intra e entre populações.

Como a biologia do cromossomo X impede a correta formação de haplótipos para as amostras do sexo feminino e o cálculo das proporções de Hardy-Weinberg para as do masculino, tais resultados foram analisados apenas quando aplicáveis ou por meio de aproximações matemáticas, como a inferência de haplótipos a partir de dados genotípicos com fase gamética desconhecida (Slatkin e Excoffier, 1996 e Excoffier e Slatkin, 1995).

A observação inicial de que Mocambo foi a única das quatro populações a apresentar desvios ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg é, de certa forma, surpreendente devido ao seu maior tamanho populacional e amostral quando comparada à Riacho de Sacutiaba. A ação da deriva genética poderia ter contribuído para que a distribuição das frequências alélicas nessa comunidade não seguisse o esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg levando a desvios estatísticos nas proporções alélicas, tendo em vista que seus efeitos são mais sensíveis em populações menores. Entretanto, outro fator evolutivo aparenta ter influenciado a população de Sacutiaba, como por exemplo o fluxo gênico que acentua a variabilidade genética da comunidade receptora do movimento migratório.

Em Mocambo foi observada uma deficiência de heterozigotos para o *locus* RS2307707 e um desbalanço entre os homozigotos para o *loci* RS621 e RS17394 em relação ao que seria esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, com a aplicação da correção de Bonferroni, nenhum desvio observado fora mantido. É importante ressaltar que durante a realização de muitos testes estatísticos existe a probabilidade de se observar testes que apresentem desvios significativos devido a flutuações casuais durante a própria realização destes. No caso das Indels, como foram realizados 24 testes, a probabilidade de se encontrar valores significativos é alta – 70,80%, de acordo com o teste realizado pelo site SISA (*Simple Interactive Statistical Analysis* - home.clara.net/sisa/bonhlp.htm). Afirma-se, portanto, que esses valores não possuem significado evolutivo, uma vez que os desvios não foram observados para o mesmo *locus* e todos eles foram descartados após a correção de Bonferroni.

Com relação à distribuição haplotípica, foram observados 53 haplótipos diferentes para os 321 cromossomos X analisados. Destes, 42 foram observados entre as amostras masculinas e 36 entre as femininas, o que de fato vai de encontro ao esperado devido ao menor tamanho efetivo populacional das amostras do gênero masculino. Tal situação pode ser explicada pelos métodos de inferência haplotípica a partir de dados genotípicos adotados pelo algoritmo *EM zipper*, que de certa forma pode produzir desvios que refletem na combinação dos *loci*.

A diversidade haplotípica obedeceu ao esperado, sendo alta para todas as comunidades e o menor índice foi observado em Riacho de Sacutiaba. A distribuição haplotípica mostrou-se surpreendente, visto que a população que apresentou o maior número de alternativas haplotípicas foi Mocambo – 37, apesar de seu menor número amostral, seguida por Kalunga - 36, Rio das Rãs – 34, e, por fim, Riacho de Sacutiaba - 17. Estes números representam valores muito mais altos do que o observado para marcadores bialélicos do cromossomo Y - 8, para estas mesmas populações (Ribeiro, 2005). Tal diferença pode ser explicada pelo baixo poder de discriminação dos marcadores Y-específicos, uma vez que estes apresentam baixas taxas de evolução e permanecem sempre em hemizigose, ao contrário dos marcadores presentes no cromossomo X que estacionam neste estado durante apenas 1/3 de sua vida evolutiva (Tishkoff *et al.*, 2000).

A quantidade de haplótipos compartilhados representou 75% do total de alternativas observadas. Apenas 13 (treze) foram encontrados em apenas uma das quatro populações. Isso evidencia uma convergência genética na distribuição dos haplótipos que poderia representar uma certa semelhança entre estas comunidades.

A variabilidade haplotípica encontrada nas populações é decorrente de eventos evolutivos ocorridos durante a história da população, como a pequena taxa de recombinação e o fluxo gênico. Esse é considerado um evento evolutivo que aumenta a variabilidade genética com a introdução de novos alelos nas populações, a depender da população-fonte dos migrantes. Trabalhos anteriores com estas mesmas comunidades revelam que este mecanismo evolutivo não contribuiu substancialmente com novos haplótipos ou alelos nestas comunidades afro descendentes, exceto para Riacho de Sacutiaba (Pedrosa, 2006; Ribeiro, 2005; Novion *et al.* 2005).

Entretanto, para o conjunto de marcadores do cromossomo X, a migração identificada na coleta de dados demográficos evidenciou que estes indivíduos introduziram, exceto em Kalunga, novos haplótipos X-Indel no conjunto genético destas comunidades remanescentes de quilombos. Na população de Mocambo, 6,74% dos cromossomos X analisados foram introduzidos via migração e em Rio das Rãs, apenas 1,83%. Em Riacho de Sacutiaba, o número de novos haplótipos equivale a 23,08%, porém este número é alto devido ao tamanho populacional, o que poderia facilitar a fixação de seus alelos durante as flutuações nas proporções alélicas provocadas pela deriva genética.

As migrações do tipo mantenedoras não modificam a estrutura populacional. Entretanto, os dados obtidos para as Indels do cromossomo X indicam que estes movimentos migratórios recentes modificaram a composição genética de três das quatro populações analisadas. Os dados apresentados indicam, portanto, que no decorrer de suas histórias cada população teria sofrido eventos de fluxo gênicos importantes que contribuiriam substancialmente com a incorporação de novas alternativas haplotípicas. Desta forma, geraram um aumento significativo da diversidade haplotípica e a presença de haplótipos população exclusivos, os quais foram observados em frequências relativamente altas para o tipo de marcador nas quatro comunidades analisadas.

Apesar dos altos valores encontrados para a diversidade haplotípica, foi possível selecionar os haplótipos mais freqüentes em cada comunidade. Na população de Riacho de Sacutiaba, o haplótipo mais comum foi o h50, em Mocambo e Rio das Rãs – o h12 foi o mais freqüente, enquanto que Kalunga apresentou uma distribuição bimodal – h07 e h42.

Considerando que os indivíduos analisados são não aparentados, a freqüência dos haplótipos de Indels pode indicar os haplótipos fundadores das comunidades, isto é, auxiliar na reconstrução do povoamento das mesmas. Os haplótipos encontrados em maior freqüência nas comunidades podem refletir a composição genética dos primeiros habitantes das mesmas, tendo em vista a taxa de mutação deste tipo de marcador genético ser baixa e a ocorrência de mutações recorrentes desprezível. Um fator limitante para todo o tipo de análise haplotípica a partir de dados genotípicos é a probabilidade de ocorrência de recombinação, no caso do cromossomo X quando em células femininas. Entretanto, este tipo de fenômeno evolutivo ocorre em uma menor taxa, quando comparado aos cromossomos autossômicos.

Assumindo então a hipótese de que os haplótipos mais freqüentes são aqueles presentes na população no momento de sua fundação, pode-se observar que Mocambo e Rio das Rãs apresentaram o mesmo haplótipo como o mais comum. Além disso, observa-se a diferença original entre as outras comunidades e essas duas, provavelmente causada por migrações africanas distintas, assim como por fundações em períodos diferentes. A partir dos dados de freqüência e diversidade haplotípica pode-se assumir que tais comunidades foram fundadas por um número relativamente pequeno de pessoas, gerando efeitos do fundador e, além disso, possibilitando a ocorrência da deriva genética por apresentarem um pequeno tamanho efetivo populacional.

Por fim, a figura 8 apresentou uma relação evolutiva mutacional entre os haplótipos de Indel do cromossomo X. Tal rede mostrou-se bastante reticulada, o que demonstra uma relação pouco esclarecedora entre os haplótipos observados, visto que o caminho evolutivo entre dois ou mais haplótipos pode ter sido percorrido por diversas rotas mutacionais.

Tal situação é esperada para um conjunto haplotípico formado por poucos marcadores bialélicos. Isso porque o número de alternativas alélicas é reduzido e o tempo de evolução destes marcadores lento, o que dificulta o estabelecimento da correta ordem mutacional entre os haplótipos, visto que as mutações formadoras deste conjunto genético são, em muitos casos, anteriores à constituição de cada uma das comunidades analisadas. Portanto, a rede haplotípica para marcadores bialélicos, quando reticulada, pode ser entendida como um indicativo da similaridade entre as populações parentais do grupo amostral, uma vez que os eventos evolutivos que estes marcadores sugerem são mais remotos que o momento da fundação dos quilombos.

5.2 Análise de Diferenciação Genética Molecular

Foram realizadas quatro análises de variância molecular - AMOVA: uma utilizando os dados das Indels para a amostra masculina dos remanescentes de quilombos; outra os dados destes mesmos marcadores para a amostra feminina dos quilombolas; a terceira foi realizada com o conjunto total das amostras; e a última foi feita comparando as proporções alélicas observadas nas comunidades afro derivadas com as da população brasileira.

Assim como esperado para populações humanas (Rosemberg *et al.*, 2002), em todos os casos a diferença genética observada foi devido principalmente à variações intrapopulacionais. Portanto, divergências genéticas individuais em cada comunidade mostrou-se mais evidente, e apenas um pequeno percentual (F_{st}) pôde ser atribuído às diferenças entre as populações.

A variação interpopulacional obtida com a amostra masculina foi menor do que o observado para a amostra feminina, visto que o tamanho amostral do cromossomo X na população masculina é a metade do encontrado na feminina, a taxa de evolução do cromossomo X nas células masculinas é menor, e a diversidade genética de cada gênero está vinculada ao outro por este cromossomo, quando no sexo masculino, ser obrigatoriamente herdado da mãe e transmitido para as filhas (Schaffner, 2004).

Um fato interessante foi observado quando os quatro remanescentes foram analisados para o conjunto total de suas amostras: o resultado (F_{st}) foi menor do que

o obtido para as amostras quando separadas por gênero. Isto pode ser explicado pela compensação das diferenças observadas nas proporções alélicas de um gênero, quando introduzido o segundo com o fim de compor o grupo populacional.

A análise comparativa *locus a locus* mostrou que apenas dois dos marcadores genéticos (RS2307741 e RS621) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os remanescentes de quilombos. Apesar disso, tanto para a distribuição haplotípica quanto para a alélica, foram observadas estruturações populacionais pelo método de AMOVA, o que indica que estes dois marcadores são os principais causadores das diferenças populacionais observadas.

A observação de que os quatro remanescentes de quilombos são geneticamente pouco diferenciados entre si foi de encontro ao esperado para populações conhecidas pelo semi-isolamento, tendo em vista que estas tendem a apresentar uma menor variabilidade genética do que populações não isoladas devido ao fluxo gênico reduzido e uma maior sujeição aos efeitos aleatórios da deriva genética devido ao pequeno tamanho populacional (Futuyma, 1998). Tal resultado pode ser tanto consequência das histórias de formação semelhantes que eles apresentam, apesar de uma das comunidades – Kalunga, localizar-se geograficamente distante das outras três e ter sido fundada em um período histórico posterior em relação às demais, como do poder de discriminação individual destes *loci* que foram selecionados originalmente para fins forenses (Monteiro, 2007).

A biologia dos marcadores autossômicos é similar àqueles presentes no cromossomo X de células femininas, assim como a dos presentes no cromossomo Y, aos marcadores X específicos de células masculinas. Pedrosa (2006) analisou oito marcadores autossômicos bialélicos do tipo informativos de ancestralidade (AIM) para estas mesmas populações afro derivadas e o teste de AMOVA também determinou diferenças na estrutura genética destas comunidades, porém com taxas maiores ($F_{st} = 0,055$; $p < 0,05$) do que as observadas nas análises desenvolvidas neste trabalho com cromossomo X. Uma das razões para explicar estes resultados divergentes é a deriva genética que ocorre com maior intensidade nos marcadores presentes no cromossomo X do que nos autossômicos, devido ao menor número amostral (Schaffner, 2004), assim como o fato de que em 1/3 do tempo o

cromossomo X passa sem sofrer recombinações nas células masculinas, diminuindo assim o período de evolução.

Marcadores UEPs Y-específicos foram analisados para estas mesmas comunidades (Ribeiro, 2005) e também foi observado valores maiores de F_{st} ($F_{st} = 0,067$; $p < 0,05$) do que para as Indels do cromossomo X de células masculinas. Esta divergência pode ter sido causada pela seleção dos marcadores no trabalho com o cromossomo Y, uma vez que nesse buscou-se polimorfismos com grandes diferenças nas proporções alélicas das populações parentais, enquanto que no trabalho aqui desenvolvido os marcadores foram originalmente selecionados com fins forense de identificação individual (Monteiro, 2007).

A comparação entre as proporções genéticas das amostras de remanescentes de quilombos com as da população urbana brasileira fornecem evidências contrárias à teoria de isolamento destas comunidades, que permeia o conhecimento popular acerca da história dos quilombos no Brasil, sugerindo que estas comunidades receberam fluxo gênico durante as suas histórias. Tal evento evolutivo acabou por equiparar as distribuições das proporções alélicas entre estas comunidades e as urbanas, ocasionando uma aproximação genética inesperada entre tais comunidades.

A análise comparativa *locus a locus* realizada para essa última comparação populacional mostrou que quatro dos seis marcadores genéticos (RS17394, RS2307707, RS5743760 e RS621) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os remanescentes de quilombos e as populações urbanas brasileiras, portanto, são os prováveis responsáveis pela variação observada entre os conjuntos amostrais.

A análise de diferenciação populacional par a par indicou que apenas três pares (Kalunga e Mocambo; Kalunga e Brasil, e Rio das Rãs e Brasil) são estruturalmente diferentes entre si. A diferenciação observada entre as populações quilombolas e as urbanas brasileiras, no entanto, foi menor do que seria esperado, visto que os remanescentes se tratam de populações rurais e semi-isoladas e as populações urbanas em princípio estão sujeitas a um processo mais intenso e contínuo de fluxo gênico, o que poderia levar a uma diferenciação maior entre estas

populações. Como possível explicação para esta observação, novamente tem-se a suposição de que os remanescentes de quilombos estudados apresentaram ao longo de suas histórias taxas de miscigenação altas com suas populações circunvizinhas, o que levaria a um equilíbrio entre as suas proporções alélicas com a de qualquer outra população miscigenada do Brasil, colaborando assim para a contestação da hipótese de isolamento. Além disso, destaca-se ser possível que os marcadores utilizados não sejam adequados para análises de diferenciação populacional, por terem sido selecionados, em um primeiro momento (Monteiro, 2007), para fins de genética forense, que visa sempre marcadores com grande variação individual.

5.3 Mistura Genética

As comunidades afro derivadas de Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Riacho de Sacutiaba já foram alvos de trabalhos utilizando outros tipos de marcadores moleculares com o objetivo de estimar as contribuições das populações parentais na constituição genética atual destas. As contribuições estimadas utilizando marcadores clássicos (Pedrosa e Oliveira, 2004) mostraram que Kalunga e Rio das Rãs apresentam uma contribuição africana maior que a européia e a primeira foi a que mostrou a maior representatividade ameríndia, enquanto que Mocambo foi a única que apresentou um quadro de estimativas invertido, com a contribuição européia maior que a africana.

O percentual de contribuição genética ancestral para a formação dessas populações de remanescentes de quilombos tanto por meio de marcadores STRs autossômicos, quanto por bialélicos informativos de ancestralidade (AIM) também autossômicos foi estimado por Pedrosa (2006). No primeiro caso, a distribuição das proporções genético parentais foi similar ao obtido pelos marcadores clássicos, sendo que Riacho de Sacutiaba apresentou uma composição parecida com a de Mocambo e nessa foi evidenciada a melhor representação da contribuição ameríndia. Com relação aos AIMs, a distribuição divergiu do apresentado com o outro grupo de marcadores, desta vez todas as quatro comunidades apresentaram o componente africano em maiores proporções que os demais.

Os marcadores uniparentais, cromossomo Y e DNAMt, foram analisados por Ribeiro (2005) e Ferreira (2006), respectivamente. Neste último trabalho não foi observado qualquer traço europeu nas linhagens maternas, e as comunidades afro derivadas apresentaram o componente africano com percentuais maiores que o ameríndio. Ribeiro (2005), por sua vez, trabalhou com dois conjuntos de marcadores Y-específicos, os UEPs e os STRs. As proporções observadas em ambos os trabalhos são similares, o componente europeu é o mais intenso em todas elas, exceto no caso dos marcadores bialélicos para Rio das Rãs, além disso, a participação ameríndia nas linhagens paternas é pouco evidente.

O presente trabalho, entretanto, mostrou resultados ainda diferentes. A análise de mistura genética utilizando o conjunto de marcadores Indels do cromossomo X indicou que todas as comunidades apresentaram como principal contribuinte a parental africana. Além disso, a comunidade de Kalunga foi a única que apresentou evidências de contribuição européia em sua formação para este conjunto de dados. Outro destaque é que em Mocambo e Riacho de Sacutiaba a contribuição ameríndia foi bastante alta, apesar do alto desvio observado no primeiro caso o que pode não estar representando a realidade. As divergências observadas entre os resultados dessas populações remanescentes de quilombos são, provavelmente, uma consequência direta dos diferentes processos históricos de miscigenação, como descrito para outras populações afro derivadas (Silva Jr *et al.*, 1999).

Algumas diferenças podem ser observadas na comparação entre os dados de mistura genética para os marcadores do cromossomo X e os obtidos em estudos prévios para marcadores Y-específicos (Ribeiro, 2005) e do DNAMt (Ferreira, 2006). As distribuições das proporções genético parentais a partir de dados do cromossomo X nesses remanescentes de quilombos mostraram-se intermediárias aos valores observados para as linhagens uniparentais, exceto para Rio das Rãs. Nessa comunidade, o quadro de mistura genética a partir de dados do cromossomo X apresentou uma distribuição com pouca participação não africana, sendo que as estimativas de participação afro derivada foi superior ao obtido para os marcadores do DNAMt.

O erro padrão alto foi encontrado nas distribuições das proporções de mistura de Rio das Rãs e Mocambo, muito provavelmente devido à distribuição alélica dos marcadores nas populações parentais, onde em alguns casos não são tão diferentes a ponto de permitirem a observação, de forma adequada, da segregação da contribuição parental em populações miscigenadas. Tal fato foi corroborado pela distribuição das estimativas para a população urbana brasileira, a qual é sabidamente miscigenada e também apresentou altos desvios. Entretanto, o coeficiente de determinação - R^2 , que representa a proporção da variabilidade observada definida por modelos estatísticos, é relativamente alto em todas as estimativas de mistura genética geradas. Como é pouco comum uma correlação perfeita, uma vez que existem muitos fatores que determinam as relações entre variáveis na vida real (Everitt, 2002), estas distribuições podem ser consideradas válidas.

Na comparação dos dados produzidos por este estudo com o da população urbana brasileira pode-se observar uma diferença sensível entre estes grupos populacionais. A participação européia na formação da população urbana brasileira é mais acentuada do que nas comunidades afro derivadas. Os dados corroboram a história e sugerem que, além de africanos, europeus e ameríndios também contribuíram para história de formação tanto da população urbana brasileira, como destas quatro comunidades remanescentes de quilombos.

A distribuição das estimativas de mistura genética para as amostras masculinas e femininas são pouco diferentes entre elas. Destaca-se a presença de uma pequena participação européia na população masculina de Rio das Rãs, não observada na distribuição da amostra populacional inteira, isto, provavelmente, porque a introdução dos dados femininos dilui esta contribuição, visto que em termos amostrais o tamanho efetivo populacional feminino é o dobro do masculino (Schaffner, 2004).

A figura 10 apresentou uma árvore em UPGMA baseada na distribuição de F_{st} das Indels do cromossomo X, representando a relação evolutiva entre as comunidades remanescentes de quilombos e as devidas populações parentais. Pôde-se notar que a árvore corroborou o observado na análise de mistura genética,

onde todas as comunidades, especialmente Kalunga e Riacho de Sacutiaba, aproximaram-se da população parental africana.

Os resultados encontrados para as comunidades afro derivadas estão de acordo com a sua história. Os quilombos habitualmente mantinham laços econômicos e sociais intensos com tribos indígenas (Arruti, 1997; Palacín e Moraes, 1994; Queirós Mattoso, 1982), ao exemplo de Mocambo e a tribo Xocó (Arruti, 2001). Dessa forma, a contribuição ameríndia significativa na formação dos remanescentes de quilombos, como evidenciado pelos dados produzidos por meio de marcadores do cromossomo X, não é inesperada e corrobora a idéia de intenso fluxo gênico entre estas comunidades ao longo de suas histórias. A contribuição ameríndia em todos os remanescentes analisados, entretanto, deve ser ligada principalmente às linhagens femininas, visto que os haplogrupos Y-específicos destas comunidades, estudados por Ribeiro (2005), informam uma baixa contribuição ameríndia por meio da linhagem paterna, enquanto que dados relativos à formação desses mesmos remanescentes por meio de haplogrupos do DNAm mostram um importante componente ameríndio na constituição dessas populações (Ferreira, 2006).

A participação europeia na formação dos quilombos também é relatada na literatura, visto que indivíduos de qualquer grupo populacional que por alguma razão, seja ela econômica ou pessoal, preferiam os quilombos à cidade, também habitavam estas comunidades isoladas (Queirós Mattoso, 1982). A contribuição europeia na formação destes remanescentes, entretanto, não foi observada, exceto em Kalunga e Rio das Rãs, essa na estimativa obtida para a população masculina. Este dado assemelha-se ao observado para o DNAm, porém, vai de encontro ao esperado, visto que como o componente europeu foi intenso na linhagem paterna, imaginava-se estimativas mais equilibradas entre os três componentes parentais. A seleção dos marcadores pode, novamente, explicar os resultados não esperados, visto que são ferramentas um tanto que inéditas neste tipo de estudo e, portanto, possuem poucos dados comparativos, o que pode estar, de certa forma, distorcendo o quadro de mistura genética real.

A seleção das populações parentais para a análise de composição genética é uma etapa crucial nesse tipo de análise. Poucos trabalhos que analisaram os

marcadores aqui utilizados já foram publicados, especialmente enfocando populações africanas e ameríndias. Essa escassez de dados na literatura restringiu as possibilidades de seleção de populações parentais adequadas para a análise de composição genética utilizando as Indels. Portanto, variações nos resultados, provavelmente, seriam observadas caso essas parentais fossem diferentes.

Outro fator que pode justificar estas estimativas observadas é a associação entre os parâmetros genéticos que influenciam a evolução deste cromossomo e a história de formação destas populações. O conjunto de informações já produzido para estes quatro remanescentes indica que esses quilombos foram formados por indivíduos afro descendentes e também miscigenados, frutos dos cruzamentos entre homens europeus e mulheres africanas ainda nas senzalas. Portanto, a participação européia poderia ser resumida ao cromossomo Y presente nos seus descendentes escravos homens e a uma parcela do cromossomo X nas mulheres.

Este último cromossomo estaria em desvantagem numérica aos seus semelhantes africanos, uma vez que a mulher africana, do cruzamento direcional citado acima, contribuiu com o seu cromossomo X para os seus filhos sem distinção de gênero. Portanto, a associação dessa hipótese com as propriedades da deriva genética (Tenesa *et al.*, 2007; Schaffner, 2004) poderia levar em algumas gerações à extinção da linhagem européia do cromossomo X nestas populações, que provavelmente foram fundadas por poucos indivíduos facilitando este processo evolutivo. Isto porque, em se tratando de estudos com marcadores de herança uniparental, deve-se sempre considerar a possível perda de informação quando populações vivas são estudadas, ou seja, as linhagens do cromossomo Y, do DNAm e de 1/3 do cromossomo X podem ser extintas mais facilmente do que seqüências presentes nos cromossomos autossômicos (Jobling e Tyler-Smith, 1995). A extinção de linhagens do cromossomo X auxilia a explicação da obtenção de estimativas de mistura genética semelhantes à distribuição das linhagens maternas obtidas por meio de marcadores do DNAm (Ferreira, 2006).

Esta hipótese, no primeiro momento, vai de encontro aos relatos históricos de ocorrência de fluxo gênico, os quais introduziam novas alternativas alélicas às comunidades. Os efeitos da deriva genética, entretanto, poderiam ser extrapolados, sendo novamente possível a extinção dos alelos de X inseridos nas populações

pelas migrações, visto que estas tendem a ocorrer em pequenos fluxos, o que acarretaria na proporção diminuta dos novos alelos e, conseqüentemente, a maior facilidade na sua eliminação.

5.4 Índice de Ancestralidade Africana

O IAA foi utilizado por Parra *et al.* (2003) e Pedrosa (2006) como um parâmetro para se comparar a ancestralidade genética com a cor da pele dos indivíduos amostrados da população brasileira e como uma estimativa da ancestralidade africana para os indivíduos e populações remanescentes de quilombos, respectivamente. Não foi observado correlação entre os parâmetros de ancestralidade genética e cor da pele na população urbana brasileira, visto que houve uma clara separação entre africanos e europeus, enquanto os ameríndios apresentaram índices próximos aos obtidos para os europeus (Parra *et al.*, 2003). Apesar da conclusão geral obtida nesse estudo, esta análise aparenta ser válida no que tange a comparação entre a probabilidade de uma dada população brasileira, seja ela qual for, apresentar índices maiores ou menores de ancestralidade africana/européia.

Os resultados obtidos por Pedrosa (2006), para marcadores bialélicos autossômicos, mostram que as comunidades afro derivadas, também alvo do trabalho aqui desenvolvido, possuem índices relativamente altos de africanidade, com exceção de Mocambo que apresentou valores com tendência européia. Comparando esses valores com os encontrados na análise de Indels do cromossomo X, observam-se algumas divergências que podem ser parcialmente explicadas pela separação das amostras por gênero. As diferenças observadas entre as distribuições destes índices nestes dois estudos concentram-se, principalmente, no que diz respeito aos resultados para as amostras masculinas de cada uma destas comunidades, visto que apenas Rio das Rãs apresentou índices com tendência africana e as demais, européia. De fato, estes dados corroboram o observado para o cromossomo Y (Ribeiro, 2005), onde apenas Rio das Rãs apresentou um percentual maior de haplogrupos específicos africanos.

Os índices obtidos para as amostras femininas mostram medianas com valores positivos elevados, observação que indica uma maior africanidade para

estas comunidades. Como a distribuição neste caso é dizigótica, a comparação com os dados autossômicos dos AIMS é mais sólida e verifica-se que a única divergência está no índice da população de Mocambo para os AIMS, que apresentou valor negativo para a mediana.

De acordo com os cálculos de índice de ancestralidade africana, o haplótipo mais freqüente nas populações de Mocambo e Rio das Rãs apresenta uma proporção relativamente alta de ser europeu, ao contrário dos haplótipos mais comuns de Kalunga e Riacho de Sacutiaba que apresentam uma probabilidade maior de ser africano. Dos demais haplótipos observados com maior freqüência nas comunidade quilombolas, a grande maioria apresentou índices altos de ancestralidade africana e apenas alguns de ancestralidade européia. Portanto, tais resultados evidenciam a origem africana destas comunidades e a participação de outras culturas em sua formação.

De fato, as estimativas de mistura genética calculadas com o programa *ADMIX* mostraram que todas as comunidades apresentaram o componente africano como o mais importante. Para todos os casos em que o IAA apontou para uma tendência européia, cabe ressaltar a possibilidade destes índices obtidos serem uma influência direta da contribuição ameríndia observada para estes marcadores, uma vez que Parra *et al.* (2003) apresentam IAAs para os ameríndios próximos aos IAAs obtidos para os europeus, além de que algumas Indels, RS2307707, RS5743760 e RS2307741, apresentam diferenças pequenas entre as proporções alélicas de ameríndios e europeus.

Finalmente, pode-se afirmar que a estrutura de uma população é determinada pela ação conjunta de parâmetros demográficos e genéticos. Entre os fatores demográficos está a migração, hoje, especialmente pronunciada como conseqüência das transformações sociais e econômicas, a qual deve ter atuado, desde o início da evolução humana, como fator importante em alterar a constituição genética das populações.

Além disso, outros fatores evolutivos influenciam a composição genética populacional, como por exemplo o efeito do fundador, o qual eleva a proporção de determinadas alternativas de regiões genéticas em populações derivadas, visto que

estavam presentes nos indivíduos fundadores. Portanto, apesar de conceituadas como geograficamente isoladas, estas populações remanescentes de quilombos foram formadas, provavelmente, por indivíduos já miscigenados, que possuíam parte de seu genoma específico originária de outras culturas não-africanas, e estas populações apresentaram laços sociais e antropológicos com outras comunidades, que contribuíram com novas alternativas genéticas na formação de suas estruturas populacionais.

STRs do Cromossomo Y

6 RESULTADOS

6.1 Variabilidade Genética

A tabela 18 apresenta a distribuição das proporções alélicas de cada marcador de microsatélite do cromossomo Y em cada uma das populações analisadas. Além disso, os dados destas proporções referentes às populações parentais e à brasileira também estão disponíveis nesta tabulação para facilitar a consulta e comparação dos dados. Exceto para os marcadores DYS438 e DYS439 em Riacho de Sacutiaba, todos as demais distribuições apresentaram polimorfismo populacional, ou seja, ao menos dois alelos de cada marcador foram observados em cada amostra populacional.

Os alelos mais comuns para cada marcador foram compartilhados, de maneira geral, entre as comunidades remanescentes de quilombos. Os microsatélites DYS392, DYS390, DYS438 e DYS393 foram os únicos que apresentaram o mesmo alelo, respectivamente *13, *24, *12 e *13, como os mais freqüentes para todas as quatro populações amostradas neste trabalho. Destaca-se que as distribuições alélicas do DYS392 e do DYS390 apresentaram um padrão bimodal para uma ou mais populações.

Com relação ao marcador DYS391, o alelo *10 foi o mais frequente, exceto em Sacutiaba onde o alelo mais observado foi o DYS391*11. Os STRs DYS389I, DYS437, DYS439, DYS19, DYS385a e DYS385b apresentaram um padrão de distribuição das proporções alélicas semelhante ao DYS391, onde uma das populações apresentou um alelo modal diferente das demais. No caso do DYS389II, o padrão diferiu-se porque Mocambo e Rio das Rãs apresentaram o alelo *29 como o mais freqüente e Riacho de Sacutiaba e Kalunga, o alelo *30. Já para o DYS439, o alelo mais comum entre os remanescentes de quilombos foi o *12, exceto para Mocambo que apresentou o alelo *11 como o mais freqüente, além disso, Rio das Rãs apresentou uma distribuição bimodal para os alelos *11 e *12.

Com relação aos alelos privados, foram observados doze alelos do cromossomo Y exclusivos de apenas uma destas comunidades afro derivadas. Não foi observado alelos privados para os microsátélites DYS392 e DYS393. Kalunga foi a que apresentou o maior número de alelos exclusivos, seis, são eles: DYS391*9, DYS389I*10, DYS439*14, DYS389II*26, DYS437*13 e DYS385a*9. Rio das Rãs apresentou quatro – DYS439*9, DYS19*12, DYS390*19 e DYS385b*11, e Mocambo, dois – DYS438*9 e DYS385a*10. Riacho de Sacutiaba, por sua vez, não apresentou ocorrência similar.

Devido à biologia hemizigótica do cromossomo Y, já exposta no trabalho, é possível a formação automática de haplótipos individuais a partir de dados de diversos marcadores presentes em seu genoma. Os haplótipos observados e a ocorrência destes em cada uma das quatro comunidades afro derivadas estão apresentados na tabela 19. Foram identificados 85 haplótipos de STRs diferentes para os 118 cromossomos Y analisados das populações de Kalunga, Rio das Rãs, Mocambo e Riacho de Sacutiaba. A grande maioria dos conjuntos haplotípicos observados são população exclusivos, ou seja, não se repetem em outra comunidade analisada. A única exceção ficou por conta do haplótipo H69 que foi encontrado em uma cópia nas populações de Kalunga, Rio das Rãs e Mocambo.

Com relação à diversidade haplotípica, os valores observados foram altos em todas as populações. A menor diversidade observada foi observada em Riacho de Sacutiaba ($h = 0,9167 \pm 0,0920$) onde foram encontrados sete haplótipos STR-Y diferentes. Destacou-se o haplótipo H85 que foi encontrado em maior frequência nesta população – 33,3%.

Em Rio das Rãs, o valor da diversidade haplotípica foi o maior ($h = 0,9841 \pm 0,0082$). Foram observados 32 haplótipos nessa população, sendo que os haplótipos H02, H45 e H58 foram os mais freqüentes – 6,8%. Em Mocambo ($h = 0,9815 \pm 0,0164$) foram encontrados 21 haplótipos, sendo que o H06 foi o mais comum (11,5%) e em Kalunga ($h = 0,9609 \pm 0,0202$) foram observados 27 haplótipos e o H34 repetiu-se em sete indivíduos – 17,9%.

Tabela 19: Distribuição dos haplótipos do cromossomo Y nos remanescentes de quilombos analisados.

Haplótipo	DYS391	DYS389I	DYS439	DYS389II	DYS438	DYS437	DYS19	DYS392	DYS393	DYS390	DYS385a	DYS385b	Kal	Moc	RR	Sac	Tot
H01	9	13	10	29	10	14	13	11	11	24	14	15	2	--	--	--	2
H02	10	12	9	29	10	15	15	12	14	23	14	15	--	--	3	--	3
H03	10	12	9	29	10	15	15	12	14	23	14	17	--	--	1	--	1
H04	10	12	10	29	9	14	13	11	13	24	17	17	--	2	--	--	2
H05	10	12	10	30	10	14	13	11	13	23	17	19	--	1	--	--	1
H06	10	12	10	30	10	14	13	11	13	24	17	19	--	3	--	--	3
H07	10	12	11	28	9	16	14	13	12	23	12	15	--	1	--	--	1
H08	10	12	11	28	10	16	14	10	13	22	13	14	--	--	1	--	1
H09	10	12	11	28	11	14	15	11	11	25	14	18	1	--	--	--	1
H10	10	12	11	28	11	14	15	11	13	25	14	18	1	--	--	--	1
H11	10	13	10	29	12	14	14	13	11	24	13	14	--	--	1	--	1
H12	10	13	11	28	9	14	14	13	13	23	14	17	--	1	--	--	1
H13	10	13	11	29	10	14	14	11	11	25	14	19	--	--	1	--	1
H14	10	13	11	29	10	15	14	13	14	25	12	14	--	1	--	--	1
H15	10	13	11	30	11	14	15	11	13	21	17	17	--	--	1	--	1
H16	10	13	11	30	11	14	15	11	13	21	17	18	--	--	1	--	1
H17	10	13	11	30	11	14	16	11	15	21	17	18	--	--	2	--	2
H18	10	13	11	30	12	14	12	11	11	21	17	17	--	--	1	--	1
H19	10	13	11	30	12	14	16	11	11	22	16	18	1	--	--	--	1
H20	10	13	11	31	11	14	15	11	13	21	16	17	--	--	1	--	1
H21	10	13	11	32	11	14	16	11	13	21	16	17	--	2	--	--	2
H22	10	13	12	29	10	14	13	11	13	24	17	18	--	1	--	--	1
H23	10	13	12	29	11	14	16	11	11	21	15	19	--	--	1	--	1
H24	10	13	12	29	12	14	14	11	13	22	13	18	--	--	--	1	1
H25	10	13	12	29	12	14	15	11	13	21	17	19	--	--	1	--	1
H26	10	13	12	29	12	15	14	13	11	24	14	15	--	--	1	--	1
H27	10	13	12	29	12	15	14	13	13	24	11	14	--	--	1	--	1
H28	10	13	12	29	12	15	14	13	13	24	12	14	1	--	--	--	1
H29	10	13	12	29	12	15	15	13	13	24	11	15	1	--	--	--	1
H30	10	13	12	30	10	15	15	13	13	24	11	16	1	--	--	--	1
H31	10	13	12	30	11	13	15	11	15	21	16	17	3	--	--	--	3
H32	10	13	12	30	12	13	17	11	11	21	18	18	1	--	--	--	1
H33	10	13	12	30	12	14	15	11	13	21	16	16	1	--	--	--	1
H34	10	13	12	30	12	15	15	13	13	24	11	16	7	--	--	--	7
H35	10	13	12	31	12	14	15	10	13	19	16	18	--	--	1	--	1
H36	10	13	12	31	12	14	15	11	13	21	16	17	1	--	--	--	1
H37	10	13	14	30	12	15	15	13	11	24	11	14	1	--	--	--	1
H38	10	14	10	30	10	14	13	11	12	24	14	14	--	--	2	--	2
H39	10	14	11	30	9	15	14	11	12	23	12	15	--	1	--	--	1

Haplótipo	DYS391	DYS389I	DYS439	DYS389II	DYS438	DYS437	DYS19	DYS392	DYS393	DYS390	DYS385a	DYS385b	Kal	Moc	RR	Sac	Tot
H40	10	14	12	30	10	14	13	14	13	24	15	16	1	--	--	--	1
H41	10	14	12	31	11	14	17	11	15	21	17	18	3	--	--	--	3
H42	10	14	12	31	11	14	17	11	15	21	18	18	1	--	--	--	1
H43	10	14	12	31	12	15	14	13	14	24	11	13	--	--	--	1	1
H44	10	14	12	32	11	14	17	11	11	21	18	19	--	--	1	--	1
H45	10	14	12	32	11	14	17	11	15	21	18	19	--	--	3	--	3
H46	10	14	12	33	11	14	15	12	13	21	16	16	1	--	--	--	1
H47	10	14	13	31	12	15	14	13	13	24	11	14	--	1	--	--	1
H48	10	15	11	32	11	14	16	11	13	21	16	17	--	1	--	--	1
H49	10	15	12	28	12	16	15	10	13	24	16	17	--	--	--	1	1
H50	10	15	12	33	11	14	17	11	15	21	18	19	--	--	1	--	1
H51	11	10	12	26	12	15	14	14	13	24	11	14	2	--	--	--	2
H52	11	12	10	29	10	14	13	11	13	24	17	18	1	--	--	--	1
H53	11	12	12	28	12	15	14	12	13	24	11	14	--	2	--	--	2
H54	11	13	10	31	11	14	16	11	14	24	11	14	--	--	1	--	1
H55	11	13	11	28	12	15	14	13	13	23	11	14	--	--	2	--	2
H56	11	13	11	29	10	15	16	12	14	23	15	15	--	1	--	--	1
H57	11	13	11	29	12	14	14	13	13	24	11	15	--	--	1	--	1
H58	11	13	11	29	12	14	15	13	13	24	11	15	--	--	3	--	3
H59	11	13	11	29	12	15	14	13	13	24	9	14	1	--	--	--	1
H60	11	13	11	29	12	15	14	13	13	24	11	11	--	--	1	--	1
H61	11	13	11	29	12	15	14	13	13	24	11	14	--	1	--	--	1
H62	11	13	11	29	12	15	14	13	13	24	12	14	--	1	--	--	1
H63	11	13	11	30	12	15	14	13	11	23	11	15	--	1	--	--	1
H64	11	13	11	31	11	14	14	11	13	21	16	16	--	--	2	--	2
H65	11	13	11	31	11	14	15	11	13	21	15	16	1	--	--	--	1
H66	11	13	12	28	12	15	15	14	13	24	11	14	--	--	1	--	1
H67	11	13	12	29	10	15	15	12	13	23	11	14	1	--	--	--	1
H68	11	13	12	29	12	15	14	13	13	23	14	14	--	--	--	1	1
H69	11	13	12	29	12	15	14	13	13	24	11	14	1	1	1	--	3
H70	11	13	12	29	12	15	14	13	13	24	12	13	--	--	2	--	2
H71	11	13	12	29	12	15	14	13	13	24	12	14	1	--	--	--	1
H72	11	13	12	29	12	15	14	13	14	24	11	14	--	--	1	--	1
H73	11	13	12	29	12	15	16	13	13	24	11	14	1	--	--	--	1
H74	11	13	12	29	12	16	14	10	11	24	12	13	--	1	--	--	1
H75	11	13	12	30	10	15	15	13	13	24	11	16	1	--	--	--	1
H76	11	13	12	30	12	14	14	13	13	25	12	15	--	--	1	--	1
H77	11	13	12	30	12	15	14	13	13	23	11	14	--	--	--	1	1
H78	11	13	12	31	11	15	13	14	13	25	14	14	--	--	2	--	2
H79	11	13	13	29	11	15	14	13	11	23	11	13	1	--	--	--	1
H80	11	13	13	29	12	15	14	13	13	23	14	15	--	1	--	--	1
H81	11	13	13	29	12	15	15	13	12	24	12	14	--	1	--	--	1

Haplótipo	DYS391	DYS389I	DYS439	DYS389II	DYS438	DYS437	DYS19	DYS392	DYS393	DYS390	DYS385a	DYS385b	Kal	Moc	RR	Sac	Tot
H82	11	13	13	30	12	15	14	13	13	24	10	14	--	1	--	--	1
H83	11	14	11	32	11	14	16	11	13	21	16	17	--	--	1	--	1
H84	11	14	12	30	12	15	14	13	13	23	11	14	--	--	--	1	1
H85	11	14	12	30	12	15	14	13	13	24	11	14	--	--	--	3	3
Total													39	26	44	9	118

* Kalunga (Kal); Mocambo (Moc); Rio das Rãs (RR), Riacho de Sacutiaba (Sac) e Total (Tot).

Os dados demográficos coletados permitiram concluir a partir dos resultados apresentados que as migrações recentes alteraram, em pequena escala, o quadro genotípico populacional de todas as quatro comunidades. Em Kalunga, onde apenas uma das amostras é de imigrante, um novo haplótipo de STR-Y - H52, foi adicionado ao genoma populacional. Esta mesma situação também foi observada em Mocambo e Riacho de Sacutiaba, onde todos os indivíduos imigrantes também contribuíram com novos haplótipos, entretanto em um número maior, seis (H14, H22, H47, H56, H61 e H62) e dois (H43 e H84), respectivamente. Em Rio das Rãs, esta proporção não foi observada, visto que apenas metade dos seis imigrantes forneceram novos haplótipos à população – H03, H20 e H27.

Assim como apresentado para o conjunto haplotípico dos marcadores Indels do cromossomo X, a figura 13 representa uma rede da relação evolutiva mutacional entre os haplótipos de STR Y-específicos observados nas comunidades remanescentes de quilombos. Esta rede estabeleceu uma representação do caminho mutacional mais curto entre os haplótipos observados nas quatro comunidades remanescentes de quilombos.

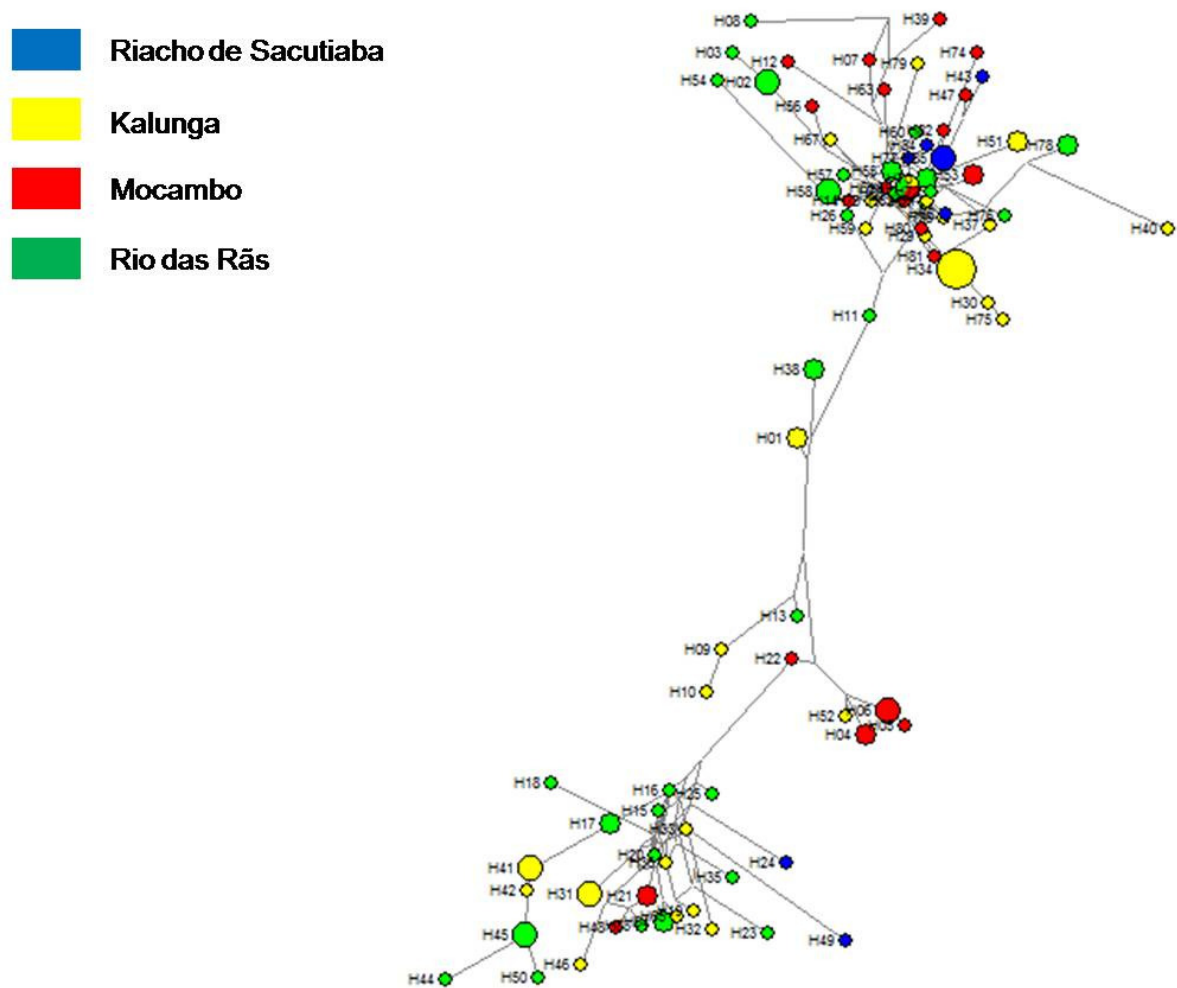


Figura 13: Rede representativa da relação evolutiva entre os haplótipos observados nas comunidades remanescentes de quilombos formada para os marcadores STRs Y-específicos.

6.2 Análise de Diferenciação Genética Molecular

A tabela 20 apresenta o valor de F_{st} relativo à análise de variância molecular (AMOVA) para os marcadores Y-STRs obtidos na comparação da estrutura genética das populações de Kalunga, Mocambo, Rio das Rãs e Riacho de Sacutiaba. De acordo com os resultados obtidos, a diferença observada entre estas comunidades pode ser dividida em duas fontes de variação: entre as populações (V_{intra}) e interpopulacional (F_{st}). Também foi realizado um teste comparativo entre as

distribuições haplotípicas observadas nas comunidades afro derivadas analisadas e na população brasileira (Grattapaglia *et al.*, 2004).

Tabela 20: Resultados das análises de variância molecular (AMOVA) relativas a distribuição haplotípica dos marcadores microsatélites do cromossomo Y obtidas para as populações remanescentes de quilombos (RQ) e também para a comparação entre essas e a população brasileira.

Amostra	Fonte de Variação	Taxa de Variação (%)
	F_{st}	2,96
RQ Masculina	Variação Intrapopulacional (V_{intra})	97,04
	p	0,0000+-0,0000
	F_{st}	0,00
RQ x Brasil	Variação Intrapopulacional (V_{intra})	100,00
	p	0,0000+-0,0000

A análise de variância molecular (AMOVA) *locus a locus* para os microsatélites do cromossomo Y está disponível na tabela 21. Foi possível observar diferenças estatisticamente significativas para alguns marcadores.

Finalmente, a análise de diferenciação populacional par a par está apresentada na tabela 22 e indica que todas as seis comparações são estatisticamente significativas.

Tabela 21: Análise de variância molecular (AMOVA) para cada STR do cromossomo Y obtida na comparação entre os dados das populações remanescentes de quilombos (RQ). V_{intra} significa variação intrapopulacional.

RQ	DYS391	DYS389I	DYS439	DYS389II	DYS438	DYS437
F_{st}	0,0160	0,0707	0,1758	0,0221	0,0728	0,0552
V_{intra}	0,9840	0,9293	0,8242	0,9779	0,9272	0,9448
P	0,2082	0,0020	0,0000	0,1007	0,0068	0,0323
RQ	DYS19	DYS392	DYS393	DYS390	DYS385a	DYS385b
F_{st}	0,1313	0,0151	0,0243	0,0389	0,0272	0,0589
V_{intra}	0,8687	0,9849	0,9757	0,9611	0,9728	0,9411
P	0,0000	0,2053	0,0821	0,0391	0,0323	0,0010

Tabela 22: Estimativas de F_{st} para os pares de populações de remanescentes de quilombos calculadas a partir de dados haplotípicos. A diagonal inferior apresenta as estimativas de F_{st} e a diagonal superior os valores de P correspondentes.

	Kalunga	Mocambo	Rio das Rãs	Sacutiaba
Kalunga	*	0,00000	0,00000	0,00000
Mocambo	0,02803	*	0,00000	0,00901
Rio das Rãs	0,02688	0,01627	*	0,00901
Sacutiaba	0,05857	0,04779	0,04564	*

6.3 Mistura Genética

A análise de mistura genética foi realizada para cada comunidade utilizando as frequências alélicas dos marcadores STR Y-específicos obtidas neste estudo e os dados referentes às populações parentais dos remanescentes de quilombos – europeia (Alves *et al.*, 2007), africana (Coelho *et al.*, 2009) e ameríndia (Leite *et al.*, 2008) – apresentados junto às frequências alélicas destes marcadores nas comunidades afro derivadas. Os resultados relativos à mistura genética encontram-se na tabela 23.

Tabela 23: Estimativas de mistura genética geradas pelo programa *ADMIX* (Chakraborty, 1985), utilizando dados dos marcadores STR Y-específicos para os remanescentes de quilombos e para a população brasileira (Grattapaglia *et al.*, 2004).

Comunidade	Populações Parentais			R ²
	África	Europa	Ameríndios	
Kalunga	0,3706 ± 0,0174	0,6004 ± 0,0239	0,0290 ± 0,0162	0,9983
Rio das Rãs	0,2983 ± 0,0568	0,6777 ± 0,0783	0,0241 ± 0,0530	0,9814
Mocambo	0,0938 ± 0,0389	0,8343 ± 0,0536	0,0718 ± 0,0363	0,9896
Sacutiaba	0,5277 ± 0,1905	--	0,4723 ± 0,1905	0,6573
Brasil	0,0522 ± 0,0190	0,9387 ± 0,0262	0,0091 ± 0,0178	0,9978

As estimativas obtidas com os dados dos marcadores STRs do cromossomo Y indicaram que a contribuição africana foi relativamente alta quando comparadas ao observado para a população urbana brasileira, exceto para Mocambo. A participação europeia foi a mais notável, exceto para Riacho de Sacutiaba que apresentou o componente africano como principal e foi a única a não apresentar os três componentes parentais na distribuição do seu quadro de mistura genética. Pode-se observar que a participação ameríndia na constituição das linhagens Y-

específicas esteve sempre em índices reduzidos, exceto para Riacho de Sacutiaba. Esta análise também foi conduzida para efeitos comparativos com a população urbana brasileira (Grattapaglia *et al.*, 2004) que apresentou estimativas similares aos quilombos de Kalunga, Mocambo e Rio das Rãs, onde o principal componente foi o europeu, seguido do africano e, por último, o ameríndio.

Novamente foram observados elevados coeficientes de desvios, agora porém na distribuição das contribuições parentais da população de Riacho de Sacutiaba, que também apresentou um valor questionável para o coeficiente de determinação - R^2 . Para as demais populações, inclusive a brasileira, os desvios não foram grandes, e o R^2 apresentou padrões elevados, o que sugere a adequação do modelo estatístico ao observado para as estimativas de mistura genética.

A figura 14 complementa a tabela anterior para uma melhor visualização da distribuição das contribuições de cada população parental, ao apresentar um gráfico comparativo das estimativas de mistura genética obtidas com os marcadores de microsatélites específicos do cromossomo Y nas quatro comunidades remanescentes de quilombos analisadas neste trabalho e na população urbana brasileira (Grattapaglia *et al.*, 2004).

Por fim, a figura 15 apresenta uma árvore filogenética em UPGMA, montada a partir da matriz de F_{st} produzida na análise de variância molecular, que evidencia a relação evolutiva entre as comunidades remanescentes de quilombos e as populações parentais – bantu africana (Coelho *et al.*, 2009), portuguesa (Alves *et al.*, 2007) e ameríndia (Leite *et al.*, 2008), a partir de dados genéticos destes marcadores específicos do cromossomo Y.

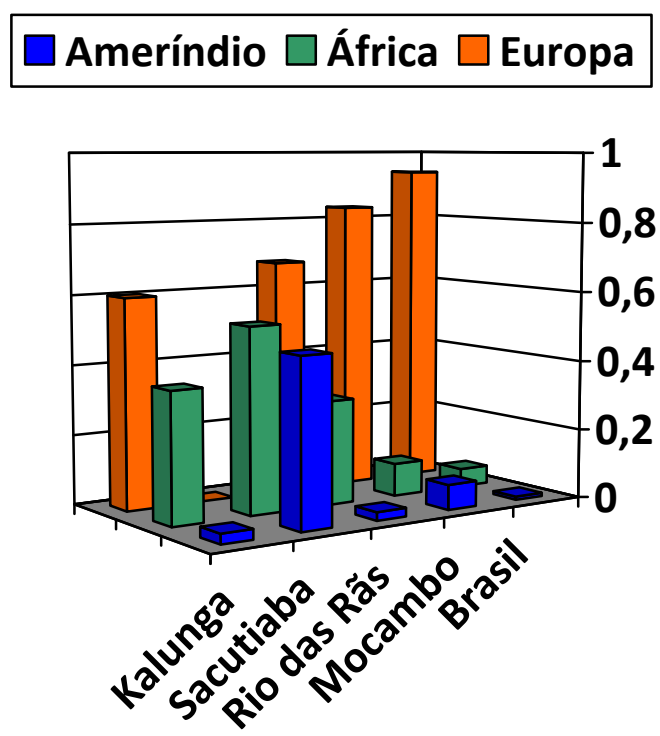


Figura 14: Gráfico de mistura genética nos remanescentes de quilombos e no Brasil a partir de estimativas obtidas para dados dos marcadores STR Y-específicos.

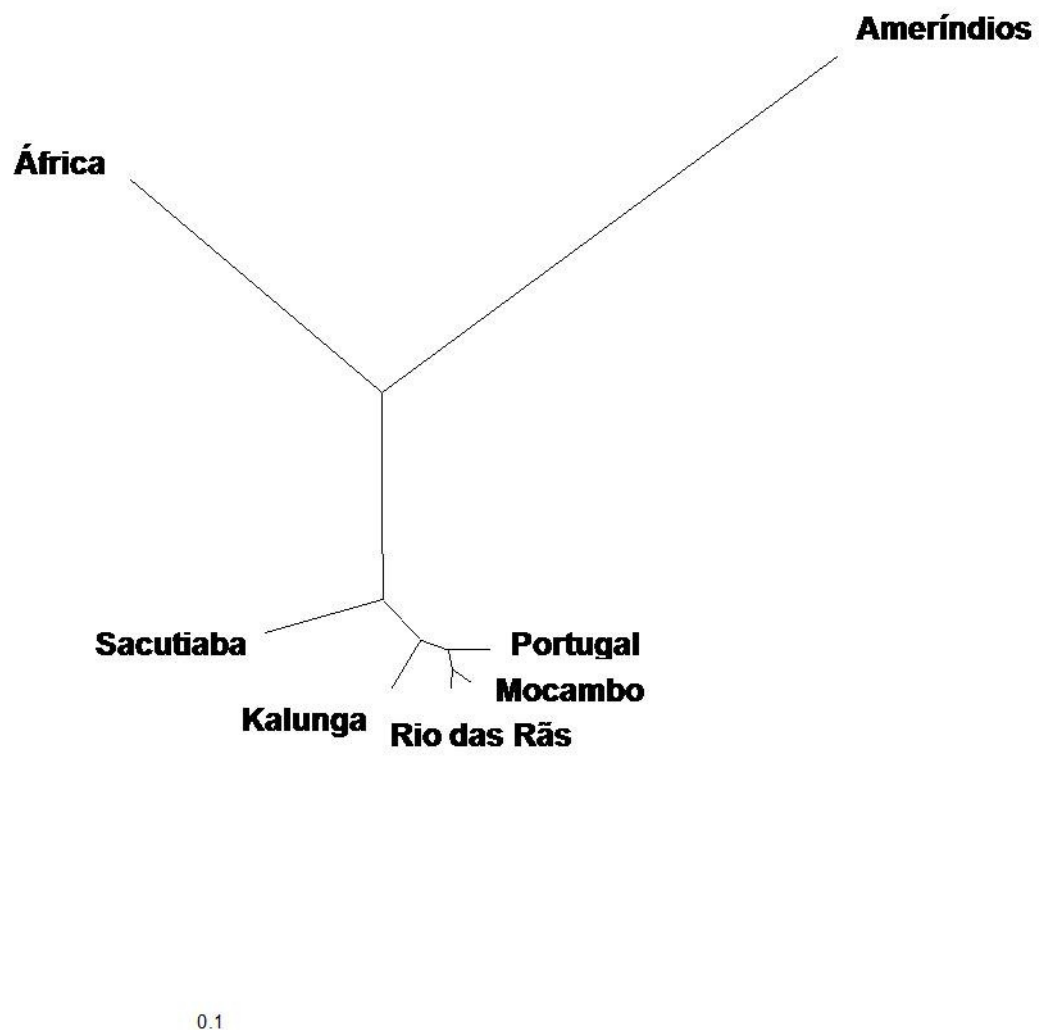


Figura 15: Árvore filogenética em UPGMA representando a relação evolutiva entre as comunidades remanescentes de quilombos e as devidas populações parentais obtida a partir de dados dos marcadores STR Y-específicos.

7 DISCUSSÃO

Como exposto anteriormente, a participação dos escravos no sistema produtivo brasileiro durante o período colonial, além de transformar a colônia portuguesa em uma das maiores fontes de matéria prima para a Europa, introduziu no continente Sul americano um novo grupo populacional com características fenotípicas distintas dos povos naturais e dos colonizadores. A distribuição dos povos africanos no território brasileiro obedeceu a padrões econômicos regionais e a formação dos quilombos foi intrínseco ao processo escravocrata.

A maioria das comunidades remanescentes de quilombos está localizada na porção litorânea de vários estados brasileiros. A região Nordeste é a que apresenta o maior número dessas comunidades, como por exemplo Mocambo, Rio das Rãs e Riacho de Sacutiaba. A região Centro-Oeste apresenta um número muito menor de comunidades afro derivadas, que estão localizadas, geralmente, em regiões predominantemente rurais, próximas de áreas urbanas ou à margem delas, como é o caso da população de Kalunga. Apesar do semi-isolamento geográfico, a influência de outras culturas na formação e desenvolvimento destas comunidades afro descendentes é historicamente conhecida, entretanto pouco relatada (Ribeiro *et al.*, 2009; Abe-Sandes *et al.*, 2004; Dória e Carvalho, 1995).

A participação africana foi importante no processo de desenvolvimento e formação da população brasileira. Portanto, a busca pelo entendimento das relações histórico biológicas destas populações remanescentes de quilombos é muito importante, pois pode permitir o melhor conhecimento da história colonial do Brasil, assim como a própria história africana neste país.

Há pouco mais de duas décadas os remanescentes de quilombos brasileiros têm sido estudados geneticamente. Diversas ferramentas já foram utilizadas, como marcadores clássicos protéicos, DNA nuclear e DNAm. Esses trabalhos buscam verificar o grau de miscigenação, subestruturação, mistura genética e variabilidade genética encontrado nestas populações. Poucos utilizaram ferramentas como o cromossomo Y e o DNAm que são úteis para o conhecimento do processo de herança uniparental (Ribeiro *et al.*, 2009; Ferreira, 2006; Abe-Sandes *et al.*, 2004).

7.1 Variabilidade Genética

Como já colocado na seção sobre o cromossomo X, a análise da variabilidade genética de uma população é a base de todas as outras análises. Eventos evolutivos e relações interpopulacionais são exemplos de conclusões que podem ser obtidas a partir de dados de frequência alélica (Hartl e Clark, 1997).

Populações afro derivadas, como as avaliadas neste trabalho, são conhecidas pelo isolamento sócio cultural que marcou a história de formação de cada uma delas e, também, pelo tamanho populacional, geralmente reduzido. Conseqüentemente, espera-se que a variabilidade genética apresente valores menores do que em populações não isoladas (Futuyma, 1998). Esta variabilidade tende a apresentar valores ainda menores quando o cromossomo Y é avaliado, visto suas peculiaridades biológicas que, virtualmente, transformam a mutação como única fonte de variação do seu conteúdo genômico.

Já os marcadores microsatélites, diferentemente dos eventos de polimorfismo único, tendem a apresentar taxas de evolução maiores que os marcadores bialélicos, o que pode tornar a análise deste tipo de marcador como a melhor ferramenta para verificação da diversidade genética da linhagem paterna (Schaffner, 2004). A distribuição alélica dos doze STRs do cromossomo Y nas quatro populações indica o poder de informação de cada um destes marcadores. Apenas os marcadores DYS438 e DYS439, na população de Riacho de Sacutiaba, apresentaram uma distribuição sem variabilidade, monomórfica, o que pode ser justificado pelo pequeno tamanho amostral desta população, que contribuiu para a fixação dos respectivos alelos destes marcadores durante a história desta comunidade.

Todos os demais marcadores apresentaram distribuição polimórfica nas populações avaliadas, sendo que os alelos mais comuns para cada STR foram compartilhados, de maneira geral, entre as comunidades quilombolas. Além de ser uma conseqüência do poder de discriminação deste tipo de marcador, estes dados brutos, ao mesmo tempo, evidenciam uma relativa congruência na relação evolutiva histórica destas comunidades analisadas. Relativa porque estas comunidades foram fundadas em locais e períodos diferentes e a própria distribuição alélica também

fornece dados suficientes para observarmos as divergências na história de formação de cada uma. A presença de alelos privados nestas comunidades de marcadores com alta taxa de mutação implica na interpretação de que em algum momento da história destas comunidades divergências ocorreram. Destaca-se que apenas os marcadores DYS392 e DYS393 não apresentaram alelos privados, provavelmente, porque possuem taxas de evolução menores do que os demais.

Foram observados doze alelos de STR-Y população exclusivos. Destes doze, metade foi observada na população de Kalunga, que está localizada na região geográfica mais afastada e foi fundada em um período colonial diferente das demais, características estas que podem estar relacionadas com a maior diferenciação desta população perante as demais. Rio das Rãs apresentou quatro alelos exclusivos, o que pode ser explicado pelo seu maior tamanho populacional, que aumenta a probabilidade de ocorrência de novas mutações. Justificativa esta que pode ser inversamente utilizada para Sacutiaba, que não possui nenhum alelo exclusivo, provavelmente, devido ao seu pequeno número de indivíduos.

Os dados das análises do cromossomo Y foram utilizados também para análise haplotípica. Devido ao seu estado hemizigótico, já exposto no trabalho, é possível a formação automática de haplótipos individuais a partir de dados de diversos marcadores presentes em seu genoma. Foram identificados 85 haplótipos de STRs diferentes, que representa 72% do total de cromossomos Y analisados. Como exposto nos resultados, a grande maioria dos conjuntos haplotípicos observados são população exclusivos, ou seja, não se repete em uma das outras comunidades analisadas. Portanto, os valores de diversidade haplotípica observados para as comunidades foram todos altos.

O haplótipo H69 foi o único compartilhado entre duas ou mais comunidades. Destaca-se que este haplótipo foi observado principalmente nas populações europeias com destaque às da península ibérica e algumas ocorrências nas populações sul-americanas (Willuweit e Roewer, 2007). Dados que corroboram a participação de outras comunidades na formação dos remanescentes de quilombos.

Trabalho similar, entretanto com menos marcadores e com diferenças metodológicas (Ribeiro *et al.*, 2009), encontrou um número similar de haplótipos.

Além disso, um número maior de haplótipos compartilhados e de repetições foi encontrado. Tal dado pode ser considerado uma evidência do poder de discriminação individual que o kit multiplex utilizado neste trabalho propicia às análises genéticas, corroborando assim o propósito de sua criação, as análises forenses.

Com relação a trabalhos apenas com marcadores bialélicos, a comparação torna ainda mais evidente esta propriedade deste conjunto de marcadores. A análise de 16 marcadores bialélicos situados no cromossomo Y nestas mesmas populações teve como resultado oito haplótipos (Ribeiro, 2005). Tal diferença se deve, portanto, à baixa taxa de evolução destes marcadores aliada às propriedades biológicas do cromossomo Y e ao poder de discriminação dos STRs (Tishkoff *et al.*, 2000).

Haplótipos de marcadores bialélicos do cromossomo X representaram um percentual da amostra bem abaixo do obtido para os STRs do cromossomo Y. Tal dado corrobora o esperado devido à biologia do tipo de marcador que limita a quantidade possível de combinações, apesar do cromossomo X estar submetido a outras forças evolutivas e o seu conjunto amostral ser maior. Além disso, a quantidade de haplótipos de X compartilhados foi maioria em comparação ao Y, em que grande parte dos haplótipos foi observado sem estar compartilhado. Essa evidência vai de encontro ao propósito original deste conjunto de marcadores do cromossomo X, o de vir a ser uma ferramenta forense (Monteiro, 2007).

Assim como observado para os haplótipos do cromossomo X, a frequência dos haplótipos de STRs pode indicar os haplótipos fundadores das comunidades, considerando a ausência de relação parentesco entre os indivíduos amostrados. O conhecimento da constituição genética da linhagem paterna fundadora destas comunidades pode, portanto, auxiliar na reconstrução do povoamento masculino das mesmas. Os haplótipos encontrados em maior frequência nas comunidades devem refletir a composição genética dos primeiros habitantes das mesmas, apesar da alta taxa de mutação que apresentam os STRs e da possibilidade de mutações recorrentes. Portanto, neste contexto destaca-se os haplótipos: H85 em Riacho de Sacutiaba; H02, H45 e H58 em Rio das Rãs; H06 em Mocambo; e o H34 em Kalunga.

Os haplótipos com freqüências mais altas nas população afro derivadas analisadas, com exceção do H85, não foram encontrados no banco de dados do Y *Chromosome Haplotype Reference Database* (YHRD - Willuweit e Roewer, 2007). O H85, haplótipo mais comum em Riacho de Sacutiaba, foi observado principalmente nas populações européias, com ocorrência inclusive na população portuguesa (Alves *et al.*, 2007). Os demais apresentaram haplótipos vizinhos, aqueles similares que possuem um ou no máximo dois *loci* diferentes do original, encontrados nas populações parentais destas comunidades afro descendentes. Tal aproximação pode ser considerada válida, visto que estes marcadores apresentam taxas de mutação altas e o tempo de evolução após a fundação destas comunidades pode ter sido suficiente para esta diferenciação. Haplótipos vizinhos ao H02, H06 e o H45 foram encontrados nas populações Bantu africanas (Coelho *et al.*, 2009). Já os haplótipos H34 e H58 tiveram seus similares encontrados na população portuguesa (Alves *et al.*, 2007).

Portanto, esses dados são um indicativo de que a população de Riacho de Sacutiaba foi fundada principalmente por descendentes de europeus com relação ao cromossomo Y, assim como a população de Kalunga. O haplotipo mais comum em Mocambo, por sua vez, é sugestivo de ser originário de populações africanas e, conseqüentemente, esses seriam os fundadores. Por fim, os dados de Rio das Rãs, que apresentou uma distribuição haplotípica com três modas, indicam que os haplótipos vizinhos de dois dos haplótipos mais freqüentes são encontrados em populações africanas e o outro em europeus.

O fluxo gênico é considerado como uma fonte de diversidade genética, ou seja, as migrações tendem a introduzir nas comunidades receptivas novas alternativas genéticas que irão ser incorporadas ao conjunto genômico populacional, contribuindo assim para o aumento da variabilidade genética. A correlação dos dados demográficos com os resultados obtidos para os marcadores STR do cromossomo Y permitiram a análise dos dados obtidos para os indivíduos que não são naturais destas comunidades e a verificação de que as migrações recentes alteraram, apesar de que em pequena escala, o quadro genotípico populacional de todas as quatro comunidades. Todos os migrantes introduziram novos haplótipos às populações remanescentes de quilombos, exceto em Rio das Rãs, onde a proporção foi de 50%.

Tais dados corroboram o observado para o cromossomo X e, portanto, o fluxo gênico, apesar de em pequena escala, vem contribuindo com o aumento da variabilidade genética destas populações. No decorrer de suas histórias, o fluxo gênico certamente desempenhou função ainda mais importante na introdução de novas alternativas genéticas nestas comunidades. Desta forma, tais eventos propiciaram um aumento significativo da diversidade haplotípica e a presença de haplótipos população exclusivos, os quais foram observados em frequências altas nas comunidades analisadas.

Outros trabalhos com estas mesmas populações revelam que este mecanismo evolutivo não contribuiu substancialmente com novos haplótipos ou alelos nestas comunidades afro descendentes (Ribeiro, 2005; Pedrosa, 2006; Novion *et al.* 2005). Entretanto, a utilização de marcadores com maior poder de discriminação individual certamente permitiu a separação de haplótipos antes unidos, diferenciando assim haplótipos nativos de introduzidos.

Assim como foi produzido para o conjunto haplotípico populacional do cromossomo X, uma rede representativa da relação evolutiva mutacional entre os haplótipos de STRs do cromossomo Y foi construída. Pôde-se observar uma divisão clara entre os haplótipos encontrados que denota a distribuição haplotípica entre as principais populações parentais. Haplótipos das quatro populações foram encontrados em ambas as divisões, o que indica um padrão semelhante do histórico de formação destas populações.

A ramificação desta rede é completamente diferente do padrão reticulado obtido para o cromossomo X. Essa aglomeração é uma conseqüência direta da quantidade de alternativas alélicas de cada microsátélite e do padrão mutacional dos STRs onde o processo simplificado baseia-se na adição ou subtração de unidades de repetição (Jobling, 2001). Portanto, as redes produzidas pelos conjuntos de marcadores do cromossomo Y e do X foram ao encontro do esperado para cada tipo de marcador dos conjuntos analisados. A rede produzida para o X foi composta por marcadores de pequena taxa de mutação, e apresentou uma disposição reticulada característica do pouco tempo de evolução, impedindo a observação dos haplótipos definidores dos passos mutacionais. Já a rede do cromossomo Y apresentou um padrão ramificado com passos mutacionais definidos, próprio de haplótipos

formados por marcadores com alta taxa de evolução, especialmente ao considerarmos o curto período de tempo para esta diferenciação. A ramificação poder ser considerada um indicativo da participação de diferentes populações na formação histórica destas comunidades.

7.2 Análise de Diferenciação Genética Molecular

A análise de variância molecular (AMOVA) foi conduzida por meio de dados relativos à distribuição haplotípica dos marcadores do tipo microsatélite do cromossomo Y nas comunidades afro derivadas. Como relatado na seção referente ao cromossomo X, a variabilidade genética entre os indivíduos é maior do que entre as populações humanas, em geral. Portanto, espera-se que o componente intrapopulacional seja mais importante nestas análises (Rosemberg *et al.*, 2002). Entretanto, como são comunidades isoladas é possível uma divergência maior entre elas do que entre comunidades urbanas alvos de migrações constantes.

Foram realizados dois testes de variância molecular, um relativo ao conjunto amostral dos remanescentes de quilombos e outro voltado à comparação entre a distribuição haplotípica observada nessas comunidades e em uma amostra da população brasileira (Grattapaglia *et al.*, 2004). Na análise entre os remanescentes, o componente intrapopulacional novamente foi o mais destacado, e o valor de F_{st} evidenciou uma pequena subestruturação populacional entre estas comunidades. Já a segunda análise não resultou estatisticamente em qualquer observação de estruturação entre a distribuição obtida para os remanescentes de quilombos como um todo e a população brasileira. Tais dados podem ser interpretados como um relato das diferenças na história de formação de cada uma das comunidades, que foram fundadas em momentos e locais distintos, refletindo assim na análise comparativa entre elas.

Da mesma forma, a observação de ausência de variação entre a população brasileira e as comunidades afro derivadas pode significar uma proximidade genética resultante das populações parentais em comum, assim como do efeito de similaridade genética trazido pelo fluxo gênico entre estas comunidades e as cidades vizinhas. Tal resultado vai de encontro ao esperado, visto que esperava-se uma divergência maior entre os dados destes remanescentes de quilombos e

populações urbanas. Portanto, o conceito de semi-isolamento vivido por estas comunidades novamente é posto em questão, visto os dados ora apresentados.

O F_{st} obtido na análise de variância molecular para o cromossomo Y é superior ao encontrado para o X, quando as amostras masculinas são analisadas separadamente ou em conjunto com as femininas, e inferior na comparação apenas com as amostras femininas. Tal resultado pode ser uma consequência direta das propriedades genéticas dos marcadores analisados em cada cromossomo, que traz mais alternativas genéticas ao conjunto do Y, e da deriva genética que age mais intensamente em conjuntos cromossômicos com tamanho efetivo populacional menores (Schaffner, 2004), que aumenta a possibilidade de divergência interpopulacional devido a efeitos randômicos.

Marcadores bialélicos Y-específicos foram analisados por Ribeiro (2005), o qual observou valores maiores de F_{st} ($F_{st} = 0,067$; $P < 0,05$) do que para os STRs do cromossomo X. Esta diferença, ao contrário do explicado para o X, não pode ser devido às peculiaridades de cada tipo de marcador, mas pode ter sido causada pela seleção dos marcadores, uma vez que Ribeiro (2005) buscou polimorfismos com grandes diferenças nas proporções alélicas das populações parentais, o que contribuiu para o aumento deste índice em comparação ao observado para os STR Y-específicos que são voltados à diferenciação individual. Esta hipótese pode ainda explicar a ausência de estruturação observada entre os remanescentes de quilombos e a população brasileira, uma vez que o poder de discriminação individual destes marcadores moleculares valorizou as diferenças individuais dentro de cada população e acabou por equiparar as distribuições interpopulacionais.

Finalmente, alguns destes marcadores aqui analisados foram já avaliados para estas populações por meio de outras metodologias (Ribeiro *et al.*, 2009), e o resultado aqui encontrado se assemelha ao observado neste trabalho anterior. Os valores de F_{st} ($F_{st} = 0,015$; $P < 0,05$) foram ainda mais baixos, o que indica que o aumento do número marcadores STR no conjunto haplotípico analisado contribuiu para uma melhor representação das estimativas de sub-estruturação populacional.

A AMOVA *locus a locus* para os microsatlélites do cromossomo Y mostrou que oito dos marcadores STRs (DYS389I, DYS439, DYS438, DYS437, DYS19, DYS390,

DYS385a e DYS385b) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os remanescentes de quilombos. Isso é um indicativo de que estes oito marcadores são os prováveis causadores das diferenças populacionais observadas. Destes, o maior destaque ficou para o DYS439 e o DYS19 que apresentaram índices de F_{st} superiores a 10%. Os outros quatro marcadores apresentaram índices de F_{st} positivos, porém não suportados estatisticamente.

Na comparação par a par entre as populações remanescentes de quilombos, pôde-se observar que todas elas apresentaram diferenciação com os seus pares. Destaca-se a população de Riacho de Sacutiaba que apresentou os maiores índices. A razão para esta observação poderia ser o semi-isolamento que levaria estas comunidades a apresentarem uma menor variabilidade genética do que populações não isoladas devido ao fluxo gênico reduzido e uma maior sujeição aos efeitos aleatórios da deriva genética devido ao pequeno tamanho populacional (Futuyma, 1998). Entretanto, como vimos anteriormente a hipótese de isolamento está sendo abandonada e, certamente, o que melhor explica estes resultados são as diferenças históricas na formação de cada uma destas comunidades aliadas ao poder de discriminação e evolução destes marcadores STRs.

7.3 Mistura Genética

A composição genética ancestral de uma população, formada a partir da contribuição de vários grupos parentais, é uma análise bastante peculiar, visto que de acordo com o tipo e origem do marcador utilizado os resultados poderão apresentar variações que indicam diferentes grupos como a principal fonte genética na história destas comunidades. Portanto, tais análises devem sempre ser inseridas no contexto genético histórico dos marcadores moleculares e cromossomo analisados, assim como no histórico de formação populacional. No caso dos remanescentes de quilombos brasileiros, espera-se que os três principais grupos parentais formadores da população brasileira - ameríndio, africano e europeu, também tenham participado da história deste tipo de população.

Como afirmado anteriormente, as comunidades estudadas neste trabalho já foram alvo de alguns trabalhos utilizando diversos marcadores, inclusive alguns do próprio cromossomo Y, com o mesmo objetivo de estimar o grau de mistura genética

de cada uma delas. Devido à sua biologia hemizigótica, o cromossomo Y guarda em seu genoma a história evolutiva das linhagens paternas. Portanto, os estudos que avaliam esta entidade genética buscam conhecer apenas a história de um dos gêneros envolvido na formação e desenvolvimento populacional.

A herança uniparental do cromossomo Y avaliada por meio deste conjunto de doze marcadores microsatélites forneceu estimativas interessantes a respeito da composição genética ancestral das quatro comunidades afro derivadas. A participação européia foi observada em três das quatro comunidades – Kalunga, Mocambo e Rio das Rãs, sendo que em todos esses casos ela correspondeu ao principal componente parental. A participação africana foi observada em todas as quatro comunidades, entretanto sempre em segundo plano, exceto para Riacho de Sacutiaba onde as linhagens Y-específicas africanas foram estimadas como às principais. Por fim, os dados de mistura genética indicaram baixos índices para contribuição ameríndia em Kalunga e Rio das Rãs. Em Riacho de Sacutiaba a participação ameríndia foi mais notável, apesar do baixo coeficiente de determinação. Essa comunidade foi a única a não apresentar contribuição das três populações parentais em sua composição genética da linhagem paterna.

As análises de mistura genética em estudos prévios com estas comunidades, como relatado na seção referente ao cromossomo X, indicam que de acordo com os marcadores clássicos Kalunga e Rio das Rãs apresentaram uma contribuição africana maior que a européia e a primeira foi a que mostrou a maior representatividade ameríndia, enquanto que Mocambo foi a única que apresentou um quadro de estimativas invertido, com a contribuição européia maior que a africana (Pedrosa e Oliveira, 2004). Quanto aos STRs autossômicos o quadro observado foi semelhante ao obtido para os marcadores clássicos, sendo que Riacho de Sacutiaba apresentou uma formação parecida com a de Mocambo e nessa foi evidenciada a melhor representação da contribuição ameríndia (Pedrosa, 2006). Os marcadores bialélicos autossômicos informativos de ancestralidade apresentaram uma distribuição destas estimativas divergente, onde todas as comunidades apresentaram o componente africano em maiores proporções que os demais.

Com relação a herança uniparental, a análise do DNAm (Ferreira, 2006) revelou um quadro similar para todas as comunidades, sendo que o principal componente na formação da linhagem materna destas populações foi o africano, seguido pelo ameríndio. Não foi observada participação europeia na formação destas populações a partir desta ferramenta. Já para marcadores bialélicos do cromossomo Y (Ribeiro, 2005), as proporções observadas indicam que o componente europeu é o mais intenso em todas elas, exceto no caso de Rio das Rãs que apresentou o componente africano como principal, além disso, a participação ameríndia nas linhagens paternas é pouco evidente.

O quadro de estimativas de mistura genética obtido a partir de dados de microsatélites do cromossomo Y foi similar ao obtido para os marcadores bialélicos deste mesmo cromossomo. As principais diferenças observadas entre estas distribuições foi a ausência da participação europeia na formação da comunidade de Riacho de Sacutiaba e os menores índices nas estimativas da participação africana para os dados de Y-STR. Com relação aos dados obtidos em trabalho similar (Ribeiro *et al.*, 2009), porém com diferenças metodológicas e no número de marcadores de STR do cromossomo Y, os dados são bastantes congruentes para Kalunga e Mocambo, apesar da incorporação de mais sete marcadores moleculares. Rio das Rãs apresentou neste trabalho uma pequena contribuição ameríndia antes não observada. A principal divergência entre estas duas estimativas de mistura por meio de marcadores STR do cromossomo Y ficou por conta da população de Riacho de Sacutiaba, que apresentou um padrão de mistura diferente do observado no trabalho anterior com a introdução destes novos marcadores moleculares.

Tais diferenças podem ser explicadas pela baixa quantidade de trabalhos com estes marcadores em populações ameríndias, o que pode levar a escolhas errôneas desta população parental, além da dificuldade em determinar haplótipos típicos de populações ameríndias que acabam por misturar-se nos demais grupos, principalmente europeus. Além disso, outro fator que pode estar relacionado a estas divergências nas estimativas é a metodologia utilizada para o cálculo de mistura no caso dos marcadores bialélicos, que foi diferente da utilizada no caso dos microsatélites.

Comparando as distribuições obtidas para o cromossomo Y e para o X em células masculinas, verifica-se que os padrões para cada população são completamente diferentes. Tal situação se repete na comparação com as estimativas obtidas com o X presente em células femininas. Essas divergências são esperadas, visto que são entidades genômicas com históricos e características biológicas diferentes (Schaffner, 2004). Além disso, em se tratando de estudos com marcadores de herança uniparental, deve-se sempre considerar a possível perda de informação quando populações vivas são estudadas (Jobling e Tyler-Smith, 1995).

As estimativas quanto às proporções genético parentais da linhagem paterna também foram calculadas para a população brasileira a partir de dados de STR Y-específicos. Os resultados evidenciam um padrão até certo ponto inesperado, visto que o principal componente foi o europeu, seguido por proporções muito baixas de participação africana e, especialmente, ameríndia. Entretanto, a participação desses grupos parentais foi observada na composição da linhagem paterna das populações brasileiras de todas as regiões administrativas em índices superiores aos obtidos nesta análise de mistura genética (Barcelos, 2006; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Alves-Silva *et al.*, 2000). A escolha incorreta de populações parentais pode, novamente, ter contribuído para esta observação, visto que pode ocasionar na aproximação das distribuições alélicas entre as parentais e encobrir a contribuição genética de uma delas.

A estimativa de mistura genética na formação da linhagem paterna na população de Sacutiaba deve ser analisada cuidadosamente. As razões para isso são os desvios e o coeficiente de determinação obtidos nesta distribuição. O erro padrão alto encontrado, pode ser devido ao pequeno número amostral desta comunidade que acaba por não fornecer dados suficientes para conclusões mais precisas. O coeficiente de determinação - R^2 , que representa a proporção da variabilidade observada definida por modelos estatísticos é relativamente baixo em comparação ao observado para as demais populações. Este dado pode ser um indicativo da proximidade desta distribuição à rejeição, podendo ser ocasionado pela incompatibilidade entre o modelo estatístico e a distribuição alélica observada, assim como pela presença de variáveis pouco informativas. Outro fator que corrobora a atenção que deve ser dada na interpretação destes dados de mistura para a população de Riacho de Sacutiaba é a presença do haplótipo H85 em alta

freqüência nesta comunidade. Este haplótipo foi observado principalmente nas populações européias, com ocorrência inclusive na população portuguesa (Alves *et al.*, 2007). Estes dados, aliados à metodologia utilizada para o cálculo de mistura por meio da freqüência alélica e não da haplotípica, sugerem que estas estimativas obtidas para a comunidade de Riacho de Sacutiaba devem ser rejeitadas.

Tendo em vista que é pouco comum uma correlação perfeita, uma vez que existem muitos fatores que determinam as relações entre variáveis (Everitt, 2002) pode-se assumir as distribuições de estimativas de mistura genética obtidas para todas as comunidades afro derivadas, exceto Riacho de Sacutiaba, e para a população urbana brasileira como válidas.

A árvore em UPGMA construída a partir da distribuição de F_{st} das comunidades remanescentes de quilombos calculado por meio dos dados de marcadores STRs do cromossomo Y apresentou uma aglomeração destas comunidades junto ao conjunto parental europeu. Tal disposição gráfica está de acordo com o observado nas estimativas calculadas para mistura genética destas comunidades, exceto para Riacho de Sacutiaba que ficou posicionada entre a população portuguesa e a africana, sendo que em suas estimativas de mistura genética não foi evidenciado a participação européia em sua constituição paterna. Isto também corrobora o dado do coeficiente de determinação que aponta para uma representação não fiel das estimativas de mistura genética. Como esta árvore foi construída a partir de dados haplotípicos, a sua representação da população de Riacho de Sacutiaba deve ser mais fidedigna do que as estimativas de mistura genética.

Como já comentado, ao contrário do que muitos imaginam, os quilombos não foram formados apenas por escravos rebelados, mas, também, por ameríndios, desertores da corte portuguesa, fugitivos e negociadores (Queirós Mattoso, 1982). Conseqüentemente, os processos de miscigenação destas comunidades afro descendentes com outras culturas durante o período seguinte à fundação de cada uma delas, assim como o fluxo gênico, que contribui para a continuação da mistura genética nestas populações quilombolas, não devem ser esquecidos quando populações com tais características sócio-culturais são analisadas geneticamente.

Novamente é necessário destacar a possibilidade de fundação destas comunidades por escravos afro descendentes já miscigenados, devido ao cruzamento direcional entre homens euro descendentes e escravas africanas. Portanto, os escravos homens possuidores do cromossomo Y europeu também participaram da fundação dessas comunidades e, assim, provocaram um efeito do fundador que pôde ser verificado por meio dos dados aqui apresentados, graças à propriedade deste cromossomo de não sofrer recombinação, o que preservou a sua constituição e o acesso a estas informações.

Portanto, a presença de mistura genética nestes remanescentes de quilombos é observada devido a eventos evolutivos como efeito do fundador e fluxo gênico, que de certa maneira introduziram na composição genética destas comunidades haplótipos Y-específicos de outras culturas como ameríndios e, principalmente, europeus. Destaca-se novamente que as divergências observadas entre os resultados destas comunidades afro derivadas alvo deste trabalho são, provavelmente, uma conseqüência direta dos diferentes processos históricos de miscigenação, como descrito para outras populações afro derivadas (Silva Jr *et al.*, 1999).

Estes resultados estão em acordo com dados da literatura que afirmam que os quilombos mantinham laços econômicos e sociais com outras culturas (Arruti, 1997; Palacín e Moraes, 1994; Queirós Mattoso, 1982). Porém, nota-se que o fluxo gênico entre estas populações e tribos indígenas era direcionado basicamente na incorporação de mulheres às comunidades afro derivadas, apesar da observação da participação ameríndia na constituição genética da linhagem patrilinear de todas as comunidades afro derivadas, corroborando assim os dados observados para as estimativas de mistura genética obtidas por meio dos marcadores do cromossomo X e DNAm analisados para estas populações.

A participação européia na formação dos quilombos também é relatada na literatura, visto que indivíduos de qualquer grupo populacional que por alguma razão, seja ela econômica ou pessoal, preferiam os quilombos à cidade, também habitavam estas comunidades isoladas. A contribuição européia na linhagem patrilinear destas comunidades aliado aos dados do DNAm para estas mesmas comunidades (Ferreira, 2006) corrobora os dados publicados para a população

brasileira como um todo (Barcelos, 2006; Carvalho-Silva, *et al.*, 2001; e Alves-Silva *et al.*, 2000), a qual apresenta o europeu como o principal componente paterno, seguido do africano e pelo lado materno este último apresenta-se como o mais importante seguido do ameríndio.

Como ressaltado na seção referente ao cromossomo X, a seleção das populações parentais para a análise de composição genética é uma etapa crucial nesse tipo de análise. A relativa escassez de dados na literatura referentes a populações ameríndias restringiu de certa forma a seleção de populações parentais adequadas para a análise de composição genética utilizando os STRs do cromossomo Y e, portanto, variações nos resultados, provavelmente, seriam observadas caso essas parentais fossem diferentes.

8 CONCLUSÃO

As quatro populações em análise não se apresentam isoladas geograficamente. Essa conclusão baseou-se na análise dos dados de marcadores Indel do cromossomo X e STR do cromossomo Y que permitiu observar que novos alelos estão sendo incorporados a estas comunidades a partir de movimentos migratórios.

Além disso, os índices de estruturação calculados apresentaram resultados abaixo do esperado para as comparações entre os remanescentes e a população urbana brasileira, o que evidencia uma proximidade genética entre estas comunidades rurais e populações urbanas vizinhas. Esses dados vão de encontro à hipótese do isolamento, que pode ter ocorrido no passado remoto destas comunidades, em especial, no período de caça aos refugiados. Após este período, portanto, tal barreira foi sendo transposta e o fluxo gênico tornou-se comum a ponto de transformar estas comunidades afro derivadas e as populações vizinhas geneticamente homogêneas em termos práticos, quase não apresentando diferenças em suas composições X e Y específicas.

A estruturação populacional calculada para as populações remanescentes de quilombos, evidenciou índices baixos para todos os testes realizados. A menor variação interpopulacional observada para o conjunto amostral masculino corroborou o esperado, visto que o tamanho amostral do cromossomo X e Y na população masculina é menor do que a do X encontrado na população feminina e a taxa de evolução do cromossomo X nas células masculinas é menor. A observação de que essas populações apresentaram-se geneticamente pouco diferenciadas entre si, além de contradizer o isolamento sócio cultural, permite conferir o poder de discriminação dos conjuntos de marcadores moleculares analisados. Portanto, os altos índices de variação intrapopulacional observados nas análises de variância molecular corroboram o propósito forense de identificação individual que estes conjuntos foram criados e sugerem que os marcadores utilizados possam não ser adequados para a análise de diferenciação entre populações.

A análise de mistura genética evidenciou as peculiaridades biológicas de cada cromossomo. Enquanto o cromossomo Y apresentou um quadro que destacava a

participação européia na formação da linhagem paterna dessas comunidades, o cromossomo X apresentou resultados mais similares aos observados para a linhagem materna, o principal componente foi o africano, seguido do ameríndio e, por último, o europeu. Destaca-se que a utilização da metodologia do índice de ancestralidade africana mostrou-se útil nas análises populacionais para marcadores bialélicos com diferenças grandes entre as frequências alélicas de cada componente parental, entretanto seria interessante uma adaptação do cálculo deste índice para populações tri-íbridas, visto que originalmente a fórmula do IAA prevê apenas a probabilidade do genótipo ser europeu ou africano.

As divergências observadas entre os resultados dessas populações remanescentes de quilombos foram, provavelmente, uma consequência direta dos diferentes processos históricos de miscigenação. Os resultados de mistura genética obtidos para a linhagem paterna da população de Sacutiaba foram rejeitados devido aos grandes desvios e o baixo coeficiente de determinação, que sinaliza a adequação do modelo estatístico à distribuição observada.

A participação de culturas não-africanas na formação dos remanescentes de quilombos está intimamente relacionada à história dessas populações. A participação do escravo africano é a grande responsável pela existência de tais comunidades no território do Brasil, havendo também a contribuição européia, especialmente portuguesa, e de nativos americanos.

Tais resultados corroboram a história colonial brasileira, onde relatos históricos apontam para o cruzamento direcional entre homens europeus ou euro descendentes e mulheres escravas africanas. Isso acarretaria em novas gerações de escravos descendentes de europeus que viriam a participar da fundação dos quilombos e produzir efeitos do fundador. Esta explicação é fácil de ser compreendida para a linhagem do cromossomo Y, entretanto, para o cromossomo X, é preciso extrapolar e levar em consideração que o componente europeu no cromossomo X, como estava concentrado na participação masculina, estaria em desvantagem numérica aos seus semelhantes africanos, e a associação dessa hipótese com as propriedades da deriva genética poderia levar em algumas gerações à extinção das linhagens européias do cromossomo X nestas populações.

Destaca-se que ambos os conjuntos de marcadores utilizados neste trabalho foram criados com o objetivo de análises forense. O kit multiplex dos marcadores do tipo STR Y-específicos são comercializados e utilizados nos mais diversos laboratórios de análise forense, enquanto que o kit de Indels do cromossomo X foi criado com a mesma proposta. Os dados referentes à distribuição haplotípica do conjunto de marcadores Indel do cromossomo X, quando comparados aos dos STR Y-específicos, apresentaram uma quantidade muito grande de haplótipos compartilhados tanto entre as populações como entre indivíduos. Apesar desta observação ser esperada devido à biologia de cada grupo de marcadores moleculares, isto sugere evidências contrárias ao propósito forense do conjunto de Indels do cromossomo X. Um ponto importante observado neste trabalho foi o de que marcadores voltados para aplicação forense apresentam grande utilidade na área de genética de populações, visto que diversas populações já foram genotipadas para estes sistemas e as análises comparativas tornam-se mais fáceis e fiéis.

Portanto, pesquisas como esta, com o emprego de marcadores moleculares associados à genética forense podem oferecer novas perspectivas para o estudo da história da espécie humana. Além disso, a exploração de um novo arcabouço de dados genéticos, como o cromossomo X, pode não apenas servir como uma ferramenta genética complementar nas análises populacionais, como revelar informações ainda obscuras nas análises mais costumeiras, que também poderão ser úteis para o melhor conhecimento da história evolutiva humana.

Genética e Quilombos

9 CONTEXTUALIZAÇÃO

Este capítulo foi redigido com o objetivo de analisar os dados genéticos de populações remanescentes de quilombos já disponíveis na literatura. Para tanto, um banco de dados (levantamento bibliográfico) dos resultados obtidos em análises populacionais de comunidades conhecidas como afro derivadas, quilombolas ou remanescentes de quilombos da América Latina foi gerado. As populações já estudadas geneticamente, as referências bibliográficas e algumas outras informações estão disponíveis na tabela presente no Anexo C.

O despertar para este levantamento ocorreu durante à procura por referências bibliográficas que tratassem deste assunto, momento no qual foi percebido a escassez destes na literatura não só brasileira, como da América Latina.

Como relatado na introdução deste trabalho, Anjos (2009) coordenou o desenvolvimento de um projeto antropológico sobre a geografia afro brasileira, sendo que um dos principais objetivos deste estudo foi a realização de um Cadastro Municipal dos Territórios Quilombolas do Brasil. Este levantamento, em sua última edição, constatou a existência de cerca de 2.200 comunidades brasileiras cujas características sócio-culturais refletem um passado marcado pela presença africana na formação histórica destas. Entretanto, apenas 1.342 comunidades já foram certificadas pela Fundação Cultural Palmares e apenas 1.124 tiveram suas certidões emitidas pelo governo brasileiro até meados de 2009.

O estudo da composição genética das diferentes populações humanas sempre ocupou uma posição de destaque na ciência. Nesse sentido, os grupos de pesquisa em genética de populações despertaram o interesse em estudar as populações remanescentes de quilombos já na década de 1980 (Schneider *et al.*, 1987), visto que por meio destas análises seria possível avaliar o processo de colonização portuguesa e espanhola e conhecer melhor a história da ocupação africana no território latino americano. Neste levantamento, a grande maioria das populações já estudadas está localizada no território brasileiro e algumas estão situadas na Venezuela – figura 16.



Figura 16: Localização geográfica aproximada das comunidades remanescentes de quilombos do Brasil e da Venezuela já estudadas. O mapa foi montado a partir da base obtida por meio do software GoogleEarth®, disponibilizado gratuitamente na rede mundial de computadores.

Certamente, existem populações afro derivadas, assim caracterizadas, em outros países da América Latina, entretanto não foram encontrados na bibliografia

estudos genético populacionais sobre estas comunidades em outros países, o que de fato limitou o horizonte de abrangência desta análise.

A formação de um banco de dados, como este, é uma atividade que não visa o término imediato pois as informações deverão ser continuamente inseridas nas planilhas de análise e serem disponibilizadas aos interessados por meio de solicitação pessoal.

A planilha contendo os dados tabulados não foi inserida neste trabalho por razão do tamanho que esta ocuparia e da dificuldade em analisá-la em papel. Esta expõe os objetos de análise populacional obtidos da literatura e as frequências alélicas de cada um dos marcadores analisados nestas populações remanescentes de quilombos, cujos dados foram recuperados, e nas populações parentais que julgamos mais adequadas. A maioria das populações foi avaliada para marcadores protéticos, enquanto apenas algumas foram objetos de análises mais detalhadas a respeito do processo de mistura genética e estruturação populacional.

Este levantamento foi atualizado, pela última vez, em abril de 2009 e revela que 31 comunidades afro derivadas tiveram seu material genético avaliado de alguma forma. A pequena quantidade de populações analisadas aliada aos problemas e dificuldades de análise que o fluxo gênico ocasiona, além da natural extinção de algumas alternativas alélicas, traz um grau de urgência nos estudos genéticos destas comunidades. Isso porque, os dados produzidos, além de permitirem o acesso às características genéticas das populações ancestrais, podem fornecer informações a respeito de alguns eventos evolutivos que ocorreram no passado dessas populações, corroborando ou não dados históricos e, conseqüentemente, auxiliando no processo de reconstrução do passado histórico colonial brasileiro (Romualdi *et al.*, 2002).

Um dos grandes interesses dos trabalhos genético populacionais com quilombolas é a análise da mistura genética, avaliando assim o processo de miscigenação pré-fundação e, também, o decorrente do fluxo gênico. Estas análises não devem ser resumidas apenas ao caráter biológico e estatístico da pesquisa, mas também, devem sempre levar em consideração a história de formação da população a ser estudada, para que as hipóteses sejam comprovadas ou refutadas de acordo

com a produção dos resultados. Logo, todo estudo que aborde os eventos de mistura de alguma população brasileira deve abordar o que já foi citado anteriormente: que a população brasileira foi formada basicamente por europeus, africanos e ameríndios, em um processo de miscigenação que se estende por mais de 500 anos.

Tendo isto em vista, os dados protéticos obtidos por diversos grupos de pesquisa que trabalham com genética de populações de remanescentes de quilombos, apontaram que, com raras exceções – Jequié e Mocambo, a contribuição africana é sempre superior à fornecida pelos demais grupos parentais - tabela 24.

Tabela 24: Contribuição parental africana, europeia e ameríndia em remanescentes de quilombos do Brasil estimadas a partir de dados de marcadores clássicos.

	Africana	Europeia	Ameríndia	Referencia
Cametá	48,00	17,90	34,10	Bortolini <i>et al.</i> , 1992
Cajueiro	67,40	32,60	--	Bortolini <i>et al.</i> , 1992
Curiaú	73,60	26,40	--	Guerreiro <i>et al.</i> , 1999
Itamoari	48,00	17,00	35,00	Oliveira, SF, com. pess.
Mimbó	61,00	17,00	22,00	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999
Pacoal	44,30	27,40	28,30	Guerreiro <i>et al.</i> , 1999
Paredão	79,10	2,80	18,10	Bortolini <i>et al.</i> , 1992
Sítio Velho	72,00	12,00	16,00	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999
Trombetas	62,00	27,00	11,00	Schneider <i>et al.</i> , 1987
Jequié	34,40	51,10	14,50	Sousa, 2001
São Gonçalo	54,00	31,60	14,40	Sousa, 2001
Valongo	97,30	2,70	--	Souza e Culpi, 2005
Mocambo	33,96	59,94	6,10	Pedrosa e Oliveira (2004)
Rio das Rãs	52,75	41,14	6,11	Pedrosa e Oliveira (2004)
Kalunga	68,50	21,10	10,40	Pedrosa e Oliveira (2004)

*Os dados de apenas algumas populações foram apresentados devido aos artigos originais de algumas delas não conterem determinadas informações sobre constituição genética ancestral.

Os marcadores protéicos, assim como afirmado na introdução deste trabalho, representam apenas uma parcela da variação genética do DNA, pois estes são os resultados fenotípicos da expressão genética. Por isso, muitas vezes acabam limitados e não fornecem informações suficientes para a formação de um quadro fiel da composição genética ancestral de uma população.

A utilização de marcadores de DNA altera bastante o quadro geral de mistura genética populacional - tabela 25. Os marcadores moleculares de DNA indicam, possivelmente, um quadro mais fiel à realidade histórica de cada população, pois não representam apenas uma parcela da variação genética. Entretanto, a escolha do marcador pode influenciar no resultado final, uma vez que cada um deles apresenta uma história evolutiva diferente e, conseqüentemente, fornecem dados informativos de eventos evolutivos que ocorreram em períodos distintos. As divergências quanto às estimativas de mistura genética podem ser observadas na comparação entre as tabelas 25 e 26, onde na primeira o trabalho foi realizado com marcadores STRs autossômicos e na segunda as mesmas populações foram analisadas para marcadores bialélicos informativos de ancestralidade - AIMS.

Tabela 25: Percentual de contribuição genética ancestral para a formação de populações de remanescentes de quilombos por meio de marcadores STRs autossômicos (Pedrosa, 2006).

	Africana	Européia	Ameríndia
Mocambo	34,19	54,83	10,98
Rio das Rãs	78,47	19,00	2,52
Kalunga	88,73	3,76	7,51
Riacho de Sacutiaba	26,06	73,94	--

*Os dados de apenas algumas populações foram apresentados devido aos artigos originais de algumas delas não conterem determinadas informações sobre constituição genética ancestral.

Tabela 26: Percentual de contribuição genética ancestral para a formação de populações de remanescentes de quilombos por meio de marcadores AIMS autossômicos (Pedrosa, 2006).

	Africana	Européia	Ameríndia
Mocambo	43,42	37,77	18,81
Rio das Rãs	60,56	30,78	8,66
Kalunga	61,05	29,76	9,18
Riacho de Sacutiaba	53,94	43,33	2,73

*Os dados de apenas algumas populações foram apresentados devido aos artigos originais de algumas delas não conterem determinadas informações sobre constituição genética ancestral.

Dentre os marcadores de DNA, também se destacam os uniparentais, que são aqueles herdados pela prole de apenas um dos pais. Estes são representados pelos presentes no cromossomo Y e no DNA mitocondrial - DNAMt. A introdução da análise destes marcadores buscou avaliar se havia ou não diferenças quanto à contribuição parental masculina e feminina para a formação populacional (Ferreira, 2006; Barcelos, 2006; Ribeiro, 2005; Abe-Sandes *et al.*, 2004; Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2002; Silva Jr *et al.*, 1999). Em se tratando de estudos com marcadores de herança uniparental, deve-se considerar a possível perda de informação quando populações vivas são estudadas, isso porque as linhagens do cromossomo Y e do DNAMt podem ser extintas mais facilmente do que seqüências presentes nos cromossomos autossômicos. Por outro lado, a escolha de marcadores restritos a uma linhagem ou que possam ter os seus resultados separados quanto à herança materna ou paterna é bastante útil para as análises de genética de populações, pois permitem uma maior e, talvez, melhor avaliação populacional e individual (Jobling e Tyler-Smith, 1995). Além disso, a análise conjunta de dados do cromossomo Y e do DNAMt permite a comparação com dados autossômicos e até mesmo uma melhor representação da constituição genética populacional, visto que são regiões genômicas fisicamente separadas e que, conseqüentemente, não sofrem recombinação entre elas.

Na tabela 27, estão apresentados os dados de algumas populações remanescentes de quilombos analisadas para marcadores bialélicos do cromossomo Y. Observa-se que na maioria delas destaca-se uma grande participação masculina europeia na formação histórica de cada uma, o que certamente levou a uma diminuição na contribuição africana. Provavelmente, o motivo para essa alta contribuição europeia, já relatado nos capítulos anteriores, deve-se ao assédio de homens descendentes de europeus às mulheres escravas nas senzalas que, por sua vez, vinham a gerar filhos portadores de cromossomos Y específicos de europeus, introduzindo assim haplótipos específicos de europeus nas gerações seguintes de escravos, visto as peculiaridades já elucidadas deste cromossomo. Logo, estes escravos miscigenados, ao fugirem e fundarem comunidades quilombolas, estariam propiciando a ocorrência de efeitos do fundador com características genéticas europeias.

Tabela 27: Percentual de contribuição genética ancestral para a formação das populações de remanescentes de quilombos analisadas por meio de marcadores bialélicos do cromossomo Y (Ribeiro, 2005; Abe-Sandes *et al.*, 2004).

	Africana	Europeia	Ameríndia	Ampla
Mocambo	22,80	45,40	4,50	27,30
Rio das Rãs	36,80	34,20	10,50	18,50
Kalunga	44,80	52,60	2,60	--
Riacho de Sacutiaba	--	80,00	--	20,00
Barra	77,30	9,10	--	13,60
São Gonçalo	58,80	23,50	--	17,70

*Os dados de apenas algumas populações foram apresentados devido aos artigos originais de algumas delas não conterem determinadas informações sobre constituição genética ancestral.

Assim como o observado para os marcadores de DNA de cromossomos autossômicos, a escolha do marcador pode também influenciar no resultado final

observado para a linhagem paterna por meio de dados do cromossomo Y. Marcadores bialélicos apresentam uma taxa de evolução diferente de microsátélites e, portanto, podem estar sinalizando momentos históricos diferentes. Tal observação pode ser constatada na comparação entre os dados apresentados na tabela 27 com os produzidos neste trabalho para as mesmas comunidades afro derivadas, já discutida no capítulo referente aos STR Y-específicos – tabela 23, página 101.

Finalmente, a tabela 28 fornece as mesmas informações anteriores colocadas, entretanto, com relação aos marcadores do DNAMt dessas comunidade. Nota-se que a contribuição africana é superior em todas elas, exceção à Cametá, e que a participação materna européia é nula em todas as populações representadas.

Tabela 28: Percentual de contribuição genética ancestral para a formação das populações de remanescentes de quilombos analisadas por meio de marcadores do DNAMt (Ferreira, 2006; Silva Jr *et al.*, 2006; Abe-Sandes *et al.*, 2004).

	Africana	Européia	Ameríndia
Mocambo	78,60	--	21,40
Rio das Rãs	86,00	--	14,00
Kalunga	86,70	--	13,30
Riacho de Sacutiaba	84,60	--	15,40
Barra	77,80	--	22,20
São Gonçalo	93,80	--	6,20
Cajueiro	70,00	--	30,00
Cametá	40,00	--	60,00
Trombetas	90,00	--	10,00

*Os dados de apenas algumas populações foram apresentados devido aos artigos originais de algumas delas não conterem determinadas informações sobre constituição genética ancestral.

As estimativas de mistura genética para o DNAm_t corrobora o motivo relatado para a alta contribuição européia na linhagem paterna, visto que também sugere que no período colonial havia um cruzamento preferencial entre homens europeus e mulheres africanas ou ameríndias, uma vez que as terras do Novo Mundo não tinham muitos atrativos às mulheres européias. A análise de marcadores uniparentais, portanto, indica diferenças sensíveis quanto à contribuição parental masculina e feminina para a formação populacional dos quilombos analisados.

Alternativamente a estas divergências nas proporções de mistura genética obtidas para diferentes marcadores e tendo em vista que as comunidades de Mocambo, Rio das Rãs, Riacho de Sacutiaba e Kalunga foram objetos de diversos trabalhos de genética de populações tanto com marcadores biparentais como uniparentais. Os dados genéticos produzidos para estas populações nos permitem fazer aproximações matemáticas sobre a contribuição parental na formação de cada uma delas, com o objetivo de obter uma distribuição mais real. Foi realizado uma média da distribuição obtida para o marcadores bialélicos, os quais são melhores para evidenciar eventos evolutivos mais remotos, do cromossomo Y com do DNAm_t - tabela 29.

Tabela 29: Percentual de contribuição genética ancestral observada para quatro populações remanescentes de quilombos por meio da média entre as contribuições da linhagem materna e paterna.

Y + DNAm_t	Africana	Européia	Ameríndia
Mocambo	54,98	31,23	13,79
Rio das Rãs	65,58	20,98	13,44
Kalunga	65,75	26,30	7,95
Riacho de Sacutiaba	42,30	50,00	7,70

Como foram utilizados marcadores com características biológicas similares, era esperado que o quadro de composição genética ancestral gerado pela análise dos marcadores bialélicos autossômicos nos fornecesse uma visão geral que pudesse ser representada por uma média entre as contribuições obtidas para as linhagens paterna e materna. Os cálculos envolvendo média simples e, também, ponderada, indicaram a mesma tendência observada para marcadores de evolução lenta do conjunto genético autossômico, porém com diferenças sensíveis nas proporções. A média simples foi a apresentada na tabela 29 por melhor se aproximar dos dados dos marcadores autossômicos.

Os quadros de mistura genética produzidos por meio de dados provenientes de marcadores de herança biparental e uniparental são, em sua grande parte, divergentes quanto à proporção de cada grupo parental na formação das populações remanescentes de quilombos. Aparentemente, estas divergências podem ser justificadas por três motivos, são eles: a escolha dos marcadores do cromossomo Y, os quais não apresentaram poder de discriminação suficiente para alguns indivíduos das populações de Mocambo, Rio das Rãs e Riacho de Sacutiaba. Adicionalmente, a população de Kalunga, que teve todas as suas amostras definidas para algum haplogrupo de distribuição restrita, apresentou estimativas de mistura genética para o conjunto Y/DNAmt mais próximas aos do DNA autossômico. As outras possíveis razões correspondem as taxas de evolução de cada um dos conjuntos genômicos, que levaram a mudanças, apesar de pequenas, sensíveis na composição genética ancestral observada para cada uma das populações e a diferença no número amostral na análise do cromossomo Y e DNAmt.

A análise de marcadores presentes no cromossomo X poderia ser uma alternativa para fornecer um quadro melhor representativo da realidade populacional, visto que esta entidade genômica une em sua biologia as peculiaridades dos padrões de herança uni e biparental.

No trabalho ora desenvolvido, observou-se que as distribuições das proporções alélicas de marcadores bialélicos do cromossomo X forneceram dados de mistura genética, apresentados na tabela 17 – página 62, diferentes dos já obtidos. As comunidades remanescentes de quilombos apresentaram distribuições da contribuição parental intermediárias aos valores observados para as linhagens

uniparentais, exceto para Rio das Rãs. Evidenciou-se uma maior semelhança com os dados dos marcadores mitocondriais, visto que a participação europeia não foi observada, exceto na população de Kalunga, e o componente africano foi o principal entre eles para todas as comunidades.

Novamente, os dados genéticos já produzidos para as comunidades de Mocambo, Rio das Rãs, Riacho de Sacutiaba e Kalunga permitiram fazer outras análises sobre a contribuição parental na formação dessas. Na tabela 30, ao modelo da tabela anterior, foi montado um quadro das estimativas de mistura genética a partir de dados de marcadores bialélicos do cromossomo X e do Y. Neste caso, novas estimativas de mistura genética foram estabelecidas a partir do conjunto cromossômico sexual, onde o X representa $\frac{3}{4}$ deste conjunto e o Y o restante.

Tabela 30: Percentual de contribuição genética ancestral observado para quatro remanescentes de quilombos por meio de aproximações matemáticas entre as contribuições obtidas para os dados de marcadores bialélicos dos cromossomos X e Y.

X + Y	Africana	Europeia	Ameríndia
Mocambo	62,79	15,61	21,60
Rio das Rãs	80,66	10,49	8,85
Kalunga	65,55	22,00	12,45
Riacho de Sacutiaba	46,50	25,00	28,50

Divergências podem ser observadas entre as estimativas de mistura genética dos dados do conjunto X/Y e de marcadores AIMs autossômicos. As mesmas justificativas apresentadas para as discrepâncias obtidas na comparação entre o conjunto autossômico e Y/DNAmt também podem ser aplicadas nesta última. Destaca-se que a participação africana ficou ainda mais evidente quando comparada aos dados autossômicos e do conjunto Y/DNAmt. Além disso, a

contribuição ameríndia mostrou-se também mais importante do que nas outras estimativas, exceto para Rio das Rãs. Já a participação europeia manteve-se em patamares consideráveis, entretanto com proporções menores.

Outro fator que pode estar influenciando estes resultados é a diferença nas peculiaridades de cada conjunto de marcador, visto que os marcadores bialélicos do cromossomo X apresentam um relativo poder de discriminação individual alto (Monteiro, 2007). Enquanto que os marcadores bialélicos autossômicos e do cromossomo Y são informativos de ancestralidade e destinados para as análises de mistura genética (Pedrosa, 2006; Ribeiro, 2005). Além disso, a escassez de estudos populacionais realizados com as Indels do cromossomo X podem acarretar na escolha de populações parentais inadequadas que traz como consequência a obtenção de estimativas não ideais.

Em relação ao levantamento, um destaque negativo observado é que não há uma convergência nos marcadores avaliados pelos diferentes grupos de pesquisa em genética de populações, ou seja, para cada pesquisa, um grupo de marcadores foi eleito, sem levar em consideração a capacidade comparativa, entre os pares de populações remanescentes de quilombos, que os resultados poderiam trazer. Tal situação, impossibilita uma análise populacional mais robusta, onde todos os dados de cada uma das populações seriam utilizados para cálculos de estruturação e filogenia.

A escolha das populações parentais nem sempre eram congruentes entre as análises de cada trabalho. Portanto, foram realizadas novas análises individuais de mistura genética para cada população – tabela 31, com um grupo único de populações parentais, com o objetivo de construir um quadro único das estimativas de composição genética ancestral das populações afro derivadas, por meio da utilização do maior número de dados possível para cada uma destas comunidades e, com isso, comparar os perfis obtidos.

As populações de Bananal, Itamoari, São Gonçalo, Muquém e Quilombo não puderam ser analisadas quanto aos novos cálculos de mistura genética, uma vez que o software utilizado – *ADMIX* (Chakraborty, 1985), apresenta uma limitação da quantidade mínima de *loci* analisados que impediu a utilização destas comunidades.

Este programa calcula o índice de mistura genética para dados de no mínimo três marcadores diferentes. Como foram encontrados apenas a distribuição das proporções fenotípicas dos marcador clássico de hemoglobina para essas populações, elas tiveram que ser descartadas.

Tabela 31: Contribuição parental africana, europeia e ameríndia em remanescentes de quilombos estimadas a partir de todos os dados comparáveis obtidos no levantamento de remanescentes de quilombos analisados geneticamente por meio do programa *ADMIX* (Chakraborty, 1985).

Comunidade	População Parental			R ²
	Africana	Europeia	Ameríndia	
Abobral	0,6578 ± 0,0157	0,0842 ± 0,0257	0,2580 ± 0,0121	0,999833
Barra	0,5009 ± 0,0813	0,3938 ± 0,1202	0,1053 ± 0,0606	0,990214
Birongo	0,7463 ± 0,0342	0,1274 ± 0,0198	0,1263 ± 0,0293	0,980754
Cajueiro	0,8621 ± 0,0711	0,1379 ± 0,0711	--	0,936355
Cametá	0,7424 ± 0,1409	0,0988 ± 0,0572	0,1589 ± 0,1025	0,894927
Curiau	0,4290 ± 0,0554	0,2491 ± 0,0937	0,3219 ± 0,1016	0,861382
Curiepe	0,8916 ± 0,0564	0,1084 ± 0,0564	--	0,961563
Galvão	0,8618 ± 0,0329	0,1382 ± 0,0329	--	0,995652
Gaucinha	0,4140 ± 0,0750	0,3176 ± 0,0940	0,2685 ± 0,0828	0,925779
Jequié	0,7348 ± 0,1287	--	0,2652 ± 0,1287	0,890641
Kalunga	0,6173 ± 0,0136	0,3759 ± 0,0253	0,0068 ± 0,0242	0,989973
Maria Rosa	0,5678 ± 0,0775	0,2251 ± 0,1242	0,2071 ± 0,0561	0,997613
Mimbó	0,6618 ± 0,0217	0,2821 ± 0,0273	0,0561 ± 0,0224	0,996859
Mocambo	0,4424 ± 0,0091	0,4214 ± 0,0184	0,1363 ± 0,0181	0,990940
Pacoval	0,3680 ± 0,0359	0,2476 ± 0,0624	0,3844 ± 0,0708	0,912012
Panaquire	0,8507 ± 0,0654	0,0244 ± 0,0266	0,1250 ± 0,0438	0,994041

Comunidade	População Parental			R ²
	Africana	Européia	Ameríndia	
Paredão	0,8734 ± 0,1504	0,0874 ± 0,0671	0,0392 ± 0,1342	0,913877
Pedro Cubas	0,7146 ± 0,0685	--	0,2854 ± 0,0685	0,973186
Pilões	0,4531 ± 0,0025	0,4206 ± 0,0040	0,1263 ± 0,0018	0,999998
Rio das Rãs	0,5873 ± 0,0249	0,4127 ± 0,0249	--	0,939370
Sacutiaba	0,4560 ± 0,0288	0,5440 ± 0,0188	--	0,940561
São Pedro	0,9158 ± 0,0287	--	0,0842 ± 0,0287	0,999563
Valongo	0,8882 ± 0,0144	0,1118 ± 0,0144	--	0,997655
Sítio Velho	0,6589 ± 0,0557	0,2111 ± 0,0698	0,1300 ± 0,0615	0,974180
Sotillo	0,8403 ± 0,0739	0,0685 ± 0,0240	0,0913 ± 0,0620	0,940317
Trombetas	0,9115 ± 0,0754	0,0885 ± 0,0754	--	0,966938

Como esperado, a maioria das populações apresentou como principal contribuinte genético para a sua formação o componente africano. As exceções ficaram por conta de Pacoval, que apresentou uma proporção maior de ascendência ameríndia, e Riacho de Sacutiaba, cujos dados apontaram para uma maior participação européia. Como o segundo principal componente para a formação destas populações foi observado, geralmente, o europeu, seguido pelo ameríndio.

Para uma análise regional das comunidades afro derivadas, foram realizadas duas divisões levando em consideração a localização geográfica de cada uma destas. Na primeira, as populações foram separadas de acordo com as regiões administrativas brasileiras mais a Venezuela e na segunda, de acordo com o processo de colonização da América do Sul (Gruzinski, 2003; Reis e Gomes, 1996; Queirós Mattoso, 1982), que claramente distinguiu os processos na América espanhola da portuguesa. Esta última ocorreu de acordo com os ciclos econômicos, podendo ser separada em regiões, são elas: do atlântico sul, atlântico norte, atlântico oriental e região central brasileira – figura 17.

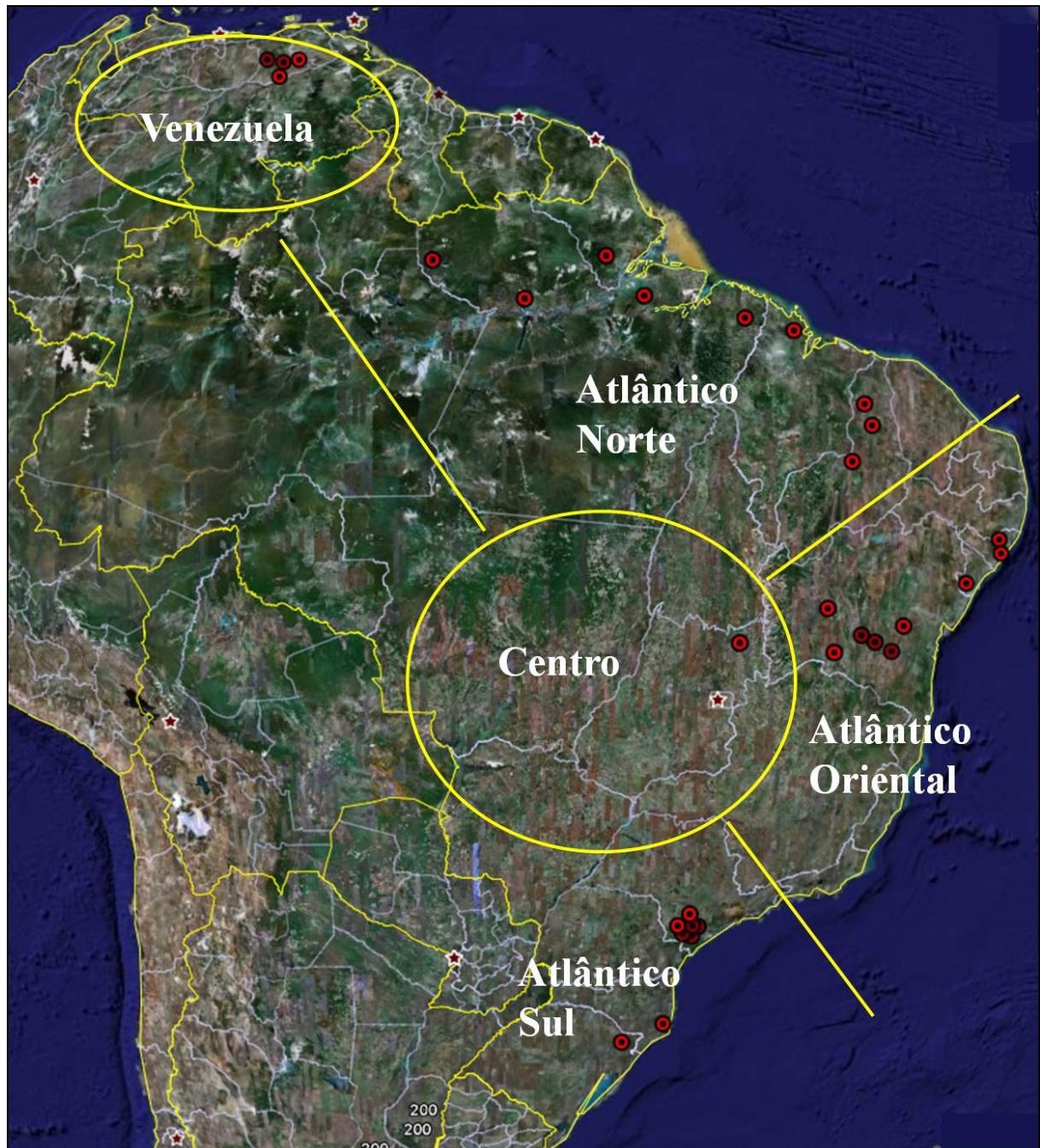


Figura 17: Regiões geográficas da América Latina divididas de acordo com o processo de colonização deste continente. O mapa foi montado a partir da base obtida por meio do software GoogleEarth®, disponibilizado gratuitamente na rede mundial de computadores.

Destaca-se que para estas análises regionais foram utilizados todos os dados comparáveis obtidos no levantamento de remanescentes de quilombos analisados geneticamente. A divisão administrativa evidenciou que as regiões obedeceram ao padrão de mistura genética – africano como principal componente, seguido do europeu e por último o ameríndio, exceto nos casos da região sudeste brasileira e venezuelana que apresentaram a contribuição ameríndia maior do que a européia – tabela 32.

Tabela 32: Percentual de contribuição genética ancestral para a formação das populações de remanescentes de quilombos de cada uma das regiões administrativas brasileiras e venezuelana.

	Africana	Européia	Ameríndia
Sudeste	69,52	14,47	16,02
Centro-Oeste	61,73	37,59	0,68
Nordeste	59,09	30,23	10,68
Norte	61,27	17,10	21,63
Sul	88,08	9,96	1,96
Venezuela	83,22	8,22	8,57

O maior percentual de participação africana foi observado na região sul brasileira. Tal resultado pode ser explicado pela baixa quantidade de populações dali estudadas e, talvez, pelo menor índice de fluxo gênico. As proporções venezuelanas também apresentaram um alto índice de africanidade. Estes percentuais altos de participação africana também podem estar relacionados ao processo de seleção amostral adotado pelos grupos de pesquisa responsáveis pelas análises genéticas das populações destas regiões. Por outro lado, as regiões que tiveram os maiores percentuais de participação européia e ameríndia foram Centro-Oeste e Nordeste, e Norte, Sudeste e Nordeste, respectivamente. Destaca-se a região Centro-Oeste cuja distribuição foi obtida a partir de dados de uma única população, o que pode não

caracterizar fielmente a participação de cada um desses grupos parentais na formação das populações desta região.

Entretanto, tais resultados corroboram o esperado uma vez que a região Centro-Oeste foi a última a ser colonizada e, portanto, as populações de escravos africanos já estavam muito miscigenadas com as européias, o que certamente contribuiu para o evidenciado. Além disso, a região Nordeste é historicamente conhecida por ter possuído uma quantidade razoável de tribos indígenas no período colonial e ter sido o porto de chegada dos europeus ao Brasil, o que justifica as proporções observadas. Por fim, a região Norte sempre foi bem populosa de indígenas, os quais contribuíram com suas culturas e características genéticas, por meio do fluxo gênico, para a formação destas comunidades escravo-derivadas.

A tabela 33, por sua vez, apresenta a análise quanto às divisões por períodos coloniais. No século XVI, o Brasil, após o descobrimento, testemunhou o seu primeiro ciclo econômico, que era o da extração do pau-brasil. Os portugueses escravizaram, principalmente, o trabalho de índios para o corte e carregamento da madeira, entretanto no fim deste século alguns africanos já foram trazidos para o Brasil, principalmente para as regiões Norte e Nordeste. O ciclo econômico da cana de açúcar perdurou entre os séculos XVII e XVIII, período durante o qual o litoral brasileiro como um todo poderia ser considerado como uma zona de importação de escravos.

Por fim, o ciclo da mineração no século XVIII, que foi o responsável pela interiorização da colonização brasileira, abasteceu de mão de obra escrava as terras de Minas Gerais e do Centro-Oeste. Neste período, os escravos africanos eram desembarcados principalmente em Salvador e Rio de Janeiro, de onde muitos eram levados para o interior, com o intuito de trabalharem na mineração (Unesco, 2000).

Tabela 33: Percentual de contribuição genética ancestral para a formação das populações de remanescentes de quilombos de cada uma das regiões divididas quanto aos períodos coloniais.

	Africana	Européia	Ameríndia
Região Atlântico Norte	63,10	20,41	16,37
Região Atlântico Oriental	54,43	35,44	10,14
Região Atlântico Sul	74,16	13,34	12,50
Região Central	61,73	37,59	0,68
Venezuela	83,22	8,22	8,57

Os resultados obtidos nesta análise de mistura genética quanto às fases coloniais mostraram que as populações afro derivadas venezuelanas apresentaram a maior média de contribuição africana em suas formações. Entre os territórios brasileiros destaca-se a porção do atlântico-sul com o maior índice de africanidade. Tais resultados podem ser uma consequência de uma menor taxa de miscigenação entre africanos e europeus ou de baixo fluxo gênico. A porção central do território brasileiro também apresentou proporções africanas altas, entretanto o destaque ficou para a quase ausência de contribuição ameríndia e a maior proporção européia entre as regiões. Neste caso das comunidades afro derivadas desta porção territorial, as estimativas podem apresentar desvios do quadro de mistura real, novamente devido ao fato de que uma única população dificilmente representará a composição genética total de uma região.

O Atlântico Norte apresentou uma distribuição similar à da região central. Entretanto, o destaque ficou para a participação ameríndia, a qual foi a mais alta entre as analisadas. Tal resultado é o esperado pois sabidamente as regiões que representam a porção do Atlântico Norte são as que sempre apresentaram a maior quantidade de tribos indígenas. Por fim, a região do Atlântico Oriental foi a que apresentou o maior equilíbrio entre as proporções genético parentais, reflexo talvez

do período em que as populações representantes desta região foram fundadas, o início do processo colonial. Período este de maior perseguição aos escravos fugitivos e, conseqüentemente, de maior isolamento das comunidades quilombolas.

Novamente destaca-se que a escolha das populações parentais é um passo crítico neste tipo de análise. Provavelmente, a distribuição das proporções de mistura genética ora apresentada possui alguns desvios que de certa forma não influenciam o quadro geral de formação das populações remanescentes de escravos. A comparação entre populações do território brasileiro com populações presentes na porção espanhola da América Latina deve atentar ao fato de que a população parental européia de cada uma delas, por mais próxima geograficamente que sejam, são diferentes e podem trazer em seu arcabouço genômico divergências importantes para os cálculos de mistura genética. Além disso, os critérios adotados na coleta de amostras por cada grupo de pesquisa são diferentes, o que fatalmente implica em resultados incongruentes que podem dificultar e, em certos casos, até mesmo invalidar as comparações.

10 CONCLUSÃO

A escravidão africana foi um modo de produção adotado não só pelo Brasil, mas por toda a América Latina. Os reflexos deste sistema escravocrata podem ser percebidos facilmente na composição fenotípica dos povos latino americanos, os quais receberam de uma forma um tanto variável a participação africana em suas composições. A formação dos quilombos foi um processo natural de rebelião encontrado pelos escravos, comum a todos os países que utilizaram este sistema de produção. A ocorrência, nestes locais, de populações remanescentes de quilombos, portanto, é esperada.

O processo escravocrata de produção na América Latina e no Caribe é um desenvolvimento tardio na evolução da escravidão na sociedade humana. A escravidão era conhecida na maioria das culturas e regiões do mundo, desde as origens de sociedades complexas. A exploração mineradora foi a atividade econômica mais importante na América espanhola e portuguesa, sendo a responsável pela colonização do interior brasileiro e das terras da Espanha, apesar de já haver ocupação anterior, no Caribe e América Central (Gruzinski, 2003).

As estimativas de mistura genética obtidas para os remanescentes de quilombos brasileiros e venezuelanos revelaram as diferenças no processo de colonização de cada região e, também, dos diversos períodos coloniais conduzidos de acordo com os interesses econômicos. A participação africana esteve destacada em todas as análises, contudo contribuições de outros grupos parentais não-africanos também foram evidenciadas.

Os dados apresentados neste capítulo dão subsídio à conclusão de que a contribuição parental para a formação de uma população varia de acordo com o tipo de marcador analisado. A utilização de marcadores moleculares com diferentes taxas de mutação e de diferentes regiões genômicas é muito importante para estudos populacionais, pois permite uma melhor avaliação dos processos de mistura genética e subestruturação ocorridos na formação da população de interesse, além da variabilidade genética populacional, uma vez que esta não é necessariamente a mesma quando avaliada por meio de diferentes fontes (Salzano, 1998).

Os dados obtidos para o cromossomo X forneceram estimativas de mistura genética diferentes dos já obtidos, semelhantes aos padrões do DNAMt. Os resultados mostraram que o cromossomo X não pode ser ainda considerado como uma das principais ferramentas genéticas na análise de estimativas de mistura genética, uma vez que poucas populações mundiais foram analisadas para o conjunto de marcadores deste cromossomo e a contribuição europeia na formação destas populações remanescentes de quilombos é sabidamente superior ao encontrado. A escassez de estudos populacionais realizados com estes marcadores provavelmente gerou equívocos na escolha de populações parentais, etapa crucial para a definição das proporções de mistura genética.

A análise conjunta de dados do cromossomo Y e do DNAMt, assim como daquele e do cromossomo X, permitiram a comparação com dados autossômicos e até mesmo uma melhor representação da constituição genética populacional, visto que são regiões genômicas fisicamente separadas e que, conseqüentemente, não sofrem recombinação entre elas. Entretanto, ainda não foi possível determinar um conjunto de marcadores que forneça todas as informações genéticas necessárias e de forma precisa para a elaboração de um quadro de estimativas de contribuição parental na formação de uma população. Portanto, ainda é necessário a análise de marcadores de diversas regiões genômicas para um melhor entendimento das relações populacionais e evolutivas.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A genética de populações fornece subsídios para que se tenha uma visão mais aprofundada da formação e constituição das comunidades humanas. Neste trabalho a constituição genética de quatro comunidades afro derivadas brasileiras - Kalunga, Riacho de Sacutiaba, Rio das Rãs e Mocambo - foi avaliada com relação ao comportamento populacional de alelos de marcadores situados nos dois cromossomos sexuais. Foram escolhidos marcadores polimórficos tanto com baixas taxas de mutação - Indels, como com altas taxas - STRs.

A análise do cromossomo Y mostrou-se útil para complementar o quadro genético obtido com as análises prévias deste cromossomo e melhor entender a formação das linhagens paternas destas populações. Já com relação ao cromossomo X, foi possível observar diferenças nos padrões genéticos entre as distribuições populacionais de amostras masculinas e femininas, além disso mostrou-se similar ao observado para os dados de DNAm.

Os resultados de ambos os sistemas foram de encontro à hipótese de isolamento que estas comunidades se submeteram. As análises de diferenciação populacional respeitaram o esperado, visto que os dados de marcadores microsatélites resultaram em índices mais elevados do que nas distribuições para os marcadores bialélicos do X, exceto para o conjunto amostral feminino. Em todas as análises, o componente intrapopulacional foi o que apresentou a maior variabilidade. Destaca-se que os valores de estruturação populacional ficaram abaixo do esperado, especialmente para o conjunto de marcadores STR Y-específicos, muito provavelmente devido ao poder de discriminação alto dos conjuntos de *loci*.

A análise de mistura genética evidenciou as peculiaridades biológicas de cada cromossomo. Ambas as estimativas corroboraram a hipótese de miscigenação pré fundação que provocou uma congruência nos perfis genéticos populacionais observados. As divergências observadas entre os resultados dessas populações remanescentes de quilombos foram, provavelmente, uma consequência direta dos diferentes processos históricos de miscigenação.

A utilização na genética de populações de conjuntos de marcadores moleculares criados com o objetivo de suprir às exigências das análises forenses apresentou resultados interessantes. Tais conjuntos oferecem novas perspectivas para o estudo da história da espécie humana uma vez que diversas populações já foram genotipadas e as análises comparativas tornam-se mais fáceis e fiéis.

Traçar o perfil genético de populações remanescentes de quilombo brasileiras e da Venezuela, baseado nos dados disponíveis na literatura assim como com os dados aqui gerados mostrou-se uma estratégia conveniente para a demonstração das diferenças no processo colonial de regiões e períodos distintos. Entretanto, a formação de um banco de dados que reúna as freqüências alélicas dos diversos marcadores moleculares nas populações remanescentes de quilombos da América Latina é uma atividade que requer constante atualização, pois as informações deverão ser continuamente inseridas.

Ressaltamos que este trabalho teve como objetivo exclusivo avaliar a composição genômica atual destas populações para melhor entender a dinâmica de sua formação. Não existiu qualquer pretensão de fazer interpretações a respeito dos importantes valores culturais, sociais e antropológicos que estas populações preservam no âmbito do estudo da construção da identidade da nação brasileira. O reconhecimento como remanescente de quilombo deve partir única e exclusivamente de valores histórico-culturais que essas populações apresentam. Além disso, a preservação dos territórios quilombolas que, por guardarem parte da história do país, deve ser prioritária nas decisões sobre políticas públicas sociais e culturais. Tais comunidades representam o passado histórico da população brasileira e os dados genéticos obtidos a partir de suas análises populacionais são úteis para o melhor conhecimento da conjuntura histórico biológica que imperava durante o período colonial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe-Sandes K. Diversidade genética de afro-brasileiros: DNA mitocondrial e cromossomo Y. Tese (Doutorado em Genética de Populações) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 2002.
- Abe-Sandes, K. *et al.* Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. *Hum Biol*, 76(1), 77-86, 2004.
- Altshuler, D. *et al.* A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), 1299-1320, 2005.
- Alves, C. *et al.* Population data for Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs (AmpFISTR YFiler) in Portugal. *Forensic Science International*, 171, 250–255, 2007.
- Alves-Silva, J. *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*, 67, 444–461, 2000.
- Andrade MJS. A mão de obra escrava em Salvador, 1811 – 1860. Corrupio, São Paulo, CNPq, Brasília, 1988.
- Anjos RSA. Territórios das comunidades remanescentes de antigos quilombos no Brasil – Primeira configuração espacial. Mapas Editora e Consultoria, Brasília-DF, 2000.
- Anjos, RSA. Quilombos: Geografia Africana - Cartografia Étnica - Territórios Tradicionais. Brasília - DF: Mapas Editora & Consultoria, 2009.
- Arpini-Sampaio, Z. *et al.* Genetic polymorphisms and ethnic admixture in African-derived black communities of northeastern Brazil. *Hum Biol*. 71(1), 69-85, 1999.
- Arruti, JMA. A emergência dos “remanescentes”: notas para o diálogo entre indígenas e quilombolas. *Mana*, 3(2), 7-38, 1997.
- Arruti, JMA. Agenciamentos Políticos da “Mistura”: Identificação Étnica e Segmentação Negro-Indígena entre os Pankararú e os Xocó. *Estudos Afro-Asiáticos*, 2, 215-254, 2001.
- Associação Brasileira de Antropologia - <http://www.abant.org.br/> - Site acessado em agosto de 2003.
- Ayub, Q. *et al.* 'Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information.', *Nucleic Acids Res* 28(2), e8, 2000.

-
- Bamshad, MJ. *et al.* Human population genetic structure and inference of group membership. *Am J Hum Genet*, 72, 578–589, 2003.
- Bandelt, H-J. *et al.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48, 1999.
- Barbosa, AAL. *et al.* Microsatellite studies on an isolated population of African descent in the Brazilian state of Bahia. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 23-30, 2006.
- Barcelos RSS. Diversidade genética das populações do Centro-Oeste: DNA mitocondrial e cromossomo Y. Tese (Doutorado em Genética de Populações) – Universidade de Brasília (UnB), 2006.
- Bastos-Rodrigues, L. *et al.* The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Annals of Human Genetics*, 70, 1-8, 2006.
- Bini, C. *et al.* Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. A collaborative study. *Forensic Sci Int*, 153, 231-236, 2005.
- Bonfim, M. O Brasil na América - Caracterização da formação brasileira. Editora Topbooks, Rio de Janeiro-RJ, 1997.
- Bortolini MC *et al.* Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African-Brazilian populations. *Hum Biol*, 69, 141-159, 1997b.
- Bortolini, MC. *et al.* Genetic studies in three American black populations. *Gene Geogr*, 6, 1-16, 1992.
- Bortolini, MC. *et al.* Genetic variability in two Brazilian ethnic groups: a comparison of mitochondrial and protein data. *Am J Phys Anthropol*, 103, 147-156, 1997a.
- Bortolini, MC. *et al.* Protein and hypervariable tandem repeat diversity in eight african- derived south american populations. Inferred relationships do not coincide. *Human Biology*, 70(3), 443-461, 1998.
- Bradman, N. e Thomas, M. Why Y? The Y chromosome in the study of human evolution, migration and prehistory. *Science Spectra*, 14, 1998.
- Britten RJ *et al.* Majority of divergence between closely related DNA samples is due to Indels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4661-4665, 2003.

- Budowle, B. e Brown, BL. El uso del análisis de ADN en la identificación forense. *Forénsica*, 1(1), 9-22, 2001.
- Butler, JM. *et al.* A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y-chromosome STR markers. *Forensic Sci Int*, 129(10), 2002.
- Butler, JM. *Forensic DNA typing. Biology, technology and genetics of STR markers*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 2005.
- Butler, JM. Recent developments in Y-single tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis. *Forensic Sci Rev*, 15, 91, 2003.
- Bydlowski, SP. *et al.* DNA polymorphisms of apolipoprotein B and AI-CII-AIV genes in a Brazilian population: a preliminary report. *Braz J Med Biol Res*, 29(10), 1269-74, 1996.
- Cali, F. *et al.* DXYS156: a multi-purpose short tandem repeat locus for determination of sex, paternal and maternal geographic origins and DNA fingerprinting; *Int J Legal Med*, 116(133); 2002.
- Callegari-Jacques, SM. e Salzano, FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciênc Cult*, 51, 166-174, 1999.
- Cann, RL. *et al.* Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325, 31–36 1987.
- Carvalho-Silva, DR. e Pena, SD. Molecular characterization and population study of an X chromosome homolog of the Y-linked microsatellite DYS391; *Gene*, 247, 233, 2000.
- Carvalho-Silva, DR. *et al.* The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet*, 68, 281-286, 2001.
- Cavalli-Sforza, LL. *et al.* *History and Geography of Human Genes*. Princeton. Princeton University Press, 1994.
- Cayres Vallinoto, IMV. *et al.* Allele frequency distributions of six hypervariable loci (D1S80, APOB, D4S43, vW1, F13A and DYS19) in two African-Brazilian communities from the Amazon region. *Genetics and Molecular Biology*, 26(3), 235-240, 2003.
- Chakraborty, R. Gene identity in racial hybrids and estimation of admixture rates. In: *Genetic Microdifferentiation in Man and Other Animals* (eds Neel JV, Ahuja Y), pp. 171–180. Indian Anthropological Association, Delhi, 1985.

- Chantratita, W. *et al.* Thai population data on nine tetrameric STR loci - D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 and D7S820. *Forensic Sci Int*, 1, 115(1-2):113-5, 2001.
- Charlesworth, B. *et al.* The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371(6494):215-20, 1994.
- Coelho, M. *et al.* On the edge of Bantu expansions: mtDNA, Y chromosome and lactase persistence genetic variation in southwestern Angola. *BMC Evolutionary Biology*, 9:80, 2009.
- Coon, CS. *The living races of man*. Alfred A. Knopf. New York, 1965.
- Cotrim, NH. *et al.* Polymorphic Alu Insertions in Six Brazilian African-Derived Populations. *Am J Hum Biol*, 16, 264-277, 2004.
- Cummings, CJ. e Zoghbi, HY. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 281-328, 2000.
- Curtin, PD. *The Atlantic slave trade: a census*. The University of Wisconsin Press, Milwaukee, 1969.
- de Knijff, P. *et al.* Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects; *Int J Legal Med* 110:134; 1997.
- Donis-Keller, H. *et al.* A genetic linkage map of the human genome. *Cell*, 51(2), 319-37, 1987.
- Dória, SZ. e Carvalho, JJ. Símbolos e projeções míticas da história. In *O quilombo do Rio das Rãs*, CARVALHO, J.J. (org.), p.155-180. EDUFBA, Salvador, 1995.
- Drobnic, K. e Budowle, B. The analysis of three short tandem repeat (STR) loci in the Slovene population by multiplex PCR. *J Forensic Sci*, 45(4), 893-5, 2000.
- Dupuy, BM. *et al.* DXYS267: DYS393 and its X chromosome counterpart; *Forensic Sci Int*, 112, 111, 2000.
- Edelmann, *et al.* Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Science International*, 129, 99-103, 2002.
- Edwards, A. *et al.* DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 49, 746-756, 1991.
- Everitt, BS. *Cambridge Dictionary of Statistics (2nd Edition)*. CUP. ISBN 0-521-81099-x, 2002.

-
- Excoffier, L. e Slatkin, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol. Biol. Evol*, 12, 921-927, 1995.
- Excoffier, L. *et al.* Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491, 1992.
- Excoffier, L. *et al.* Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinform. Online* 1, 47–50, 2005.
- Fausto, B. História do Brasil. 12ª edição. EDUSP - ISBN: 8531402409, 2004.
- Ferreira, LB. Diversidade do DNA Mitocondrial de Populações Brasileiras Ameríndias e Afrodescendentes. Tese (Doutorado em Genética de Populações) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 2006.
- Ferreira, ME. e Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 220 p, 1995.
- Fundação Cultural Palmares - <http://www.palmares.gov.br/> - Site acessado em junho de 2009.
- Futuyma, D. *Evolutionary Biology*. Third edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998.
- Grattapaglia, D. *et al.* Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *Forensic Sci Int*, 149(1), 99-107, 2005.
- Gruzinski, S. *A Colonização do Imaginário*. Ed. Companhia das Letras, 2003.
- Guerreiro, JF. *et al.* Genetic-demographic data from two Amazonian populations composed of descendats of African slaves: Pacoval and Curiau. *Genet Mol Biol*, 22, 163-167, 1999.
- Gusmao, L. *et al.* Molecular characteristics of four human Y-specific microsatellites (DYS434, DYD437, DYS438, DYS439) for population and forensic studies; *Ann Hum Genet*, 65, 285, 2001.
- Hammer, M.F. A recent common ancestry for human Y chromosome. *Nature*, 378, 376-378, 1995.
- Hammer, MF. e Zegura, S. The role of the chromosome in human evolutionary studies. *Evol Anthropol*, 5, 116-134, 2002.

- Harris, EE. e Hey, J. X chromosome evidence for ancient human histories. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 3320–3324, 1999.
- Hartl, DL. e Clark, AG. *Principles of Population Genetics*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc, 1997.
- Hering, S. e Szibor, R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker DXS9898 for forensic purposes. *J Forensic Sci*, 45, 929–931, 2000.
- Hinds, DA. *et al.* Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*, 307, 1072-9, 2005.
- Human Genome Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and other nucleotide variations – criado por John M. Butler e Dennis J. Reeder. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/> - site acessado em abril de 2009.
- Jeffreys, AJ. *et al.* Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature* 10;316(6023), 76-79, 1985.
- Jobling, MA. e Tyler-Smith, C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet*, 11(11), 449–456, 1995.
- Jobling, MA. In the name of father: surnames and genetics. *Trends Genet*, 17, 353-357, 2001.
- Kayser, M. *et al.* Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping. *Electrophoresis*, 18,1602–1607, 1997.
- Kayser, M. *et al.* Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet*. 66(5), 1580-8, epub 2000.
- Kayser, M. *et al.* Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study; *Int J Legal Med* 110:125; 1997.
- Kendrew, J. (ed) *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 1994.
- Lahn, BT. e Page, DC. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science*, 286(5441), 964-7, 1999.
- Leite, FPN. *et al.* Y-STR Analysis in Brazilian and South Amerindian Populations. *American Journal of Human Biology*, 20, 359–363, 2008.

-
- Lewis, PO. e Zaykin, D. 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Lins, AM. *et al.* Multiple sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci: Silver stain and fluorescence detection. *BioTechniques*, 20, 882-889, 1996.
- Lucotte, G. *et al.* Y chromosome DNA polymorphisms in two African populations. *Am. J. Hum. Genet*, 45, 16–20, 1989.
- Maca-Meyer, N. *et al.* Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. *BMC Genet*, 2(1), 13, 2001.
- Mills, RE. *et al.* An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res*, 16(9), 1182-90, epub 2006.
- Monteiro, EHG. Desenvolvimento e aplicação de polimorfismos de inserção/deleção do cromossomo x em genética forense. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas, concentração Genética de Populações) – Departamento de Ciências Genômicas, Universidade Católica de Brasília (UCB), 2007.
- Morton, NE. Parameters of the human genome, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88, 7474–7476, 1991.
- Moura, C. Quilombos. Resistência ao escravismo. Editora Ática, São Paulo, 1993.
- Moxon, ER.e Wills, C. "DNA microsatellites: Agents of Evolution?" *Scientific American*. Jan, 72-77, 1999.
- Mulero, JJ. *et al.* Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. *J Forensic Sci*, 51(1), 64-75, 2006.
- Mullis, KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262(4):56-61, 64-5, 1990.
- Nachman, MW. *et al.* DNA variability and recombination rates at X-linked loci in humans. *Genetics* 150, 1133–1141, 1998.
- Nagelkerke, NJD. A Note on a General Definition of the Coeficient of Determination. *Biometrika*, 78, 691-692, 1991.
- Neme, S. e Andrade, CO. Quilombo: forma de resistência. Proposta histórico-arqueológica. In: *Insurreição Negra e Justiça* (eds. G. Huber e F.B. De Souza). Rio de Janeiro, OAB, 1987.

- Nielsen, R. Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms. *Genetics*, 154, 931-942, 2000.
- Novion, HPI. *et al.* Perfil demográfico y alteraciones de frecuencias de apellidos por migración en remanecientes de quilombos brasileiros. *Memorias del VII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica*, 2005.
- Oliveira, SF. *et al.* Heterogeneous distribution on HbS and HbC alleles in Afro-derived Brazilian populations. *International Journal Of Human Genetics*, India, 2(3), 153-160, 2002.
- Oliveira, SF. *et al.* Uni- and Bi-parental Analyses of the Genetic Contribution in an Afro-Descendent Community in Central Brazil. *Biología de poblaciones humanas: Diversidad, tiempo, espacio*. Organizador: José E. Egocheaga. Editora: Universidad de Oviedo p.609-616, ISBN: 84-609-1519-0, 2003.
- Page, RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358, 1996.
- Palacín, L. e Moraes, MAS. *História de Goiás*. Universidade Católica de Goiás, UCG. Goiânia, 122 pp, 1994.
- Pante-De-Sousa, G. *et al.* Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. *Ann Hum Biol*, 26(4), 365-73, 1999.
- Parra, FC. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 177-82, 2003.
- Pedrosa, MAF. *Composição Genética de Quatro Populações Remanescentes de Quilombos do Brasil com Base em Microsatélites e Marcadores de Ancestralidade*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal, concentração Genética de Populações) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília (UnB), 2006.
- Pedrosa, MAF. e Oliveira, SF. *Mixtura étnica en poblaciones afro-descendientes semi-aisladas de Brasil*. Caracas. *Anais do VIII Congresso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica*, 2004
- Pedrosa, MP. *A presença africana em Alagoas: contribuições da genética e da biologia molecular ao perfil das comunidades de Muquém e Quilombo*. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, 1998.
- Pena, SDJ. e Chakraborty, R. Paternity testing in the DNA era. *Trends in Genetics*, 10, 204-209, 1994.

- Pena, SDJ. e Jeffreys, AJ. Breve introdução às impressões digitais de DNA. *Brazilian Journal of Genetics*, 15, 857-879, 1993.
- Pereira, RW. e Pena, SD. Phylogeography of haplotypes of five microsatellites located in a low-recombination region of the X chromosome: studies worldwide and in Brazilian populations. *Genetica*, 126(1-2): 243-250, 2006.
- Pumpernik, D. *et al.* Replication slippage versus point mutation rates in short tandem repeats of the human genome. *Mol Genet Genomics*, 279(1), 53-61, 2008.
- Queirós Mattoso, K. *Ser escravo no Brasil*. São Paulo, Editora Brasiliense, 1982.
- Redd, AJ. *et al.* Forensic value of 14 novel STRs on the human Y-chromosome; *Forensic Sci Int*, 130, 97; 2002.
- Reis, JJ. e Gomes, F. *Liberdade por um fio. História dos quilombos no Brasil*. São Paulo; Companhia das Letras, Editora Schwarcz, 1996.
- Ribeiro, D. *O povo brasileiro - A formação e o sentido do Brasil*. Editora Companhia das Letras, São Paulo-SP, 1995.
- Ribeiro, GGBL. Contribuição genética masculina, baseada em marcadores Y-específicos, na constituição de quatro comunidades afrodescendentes brasileiras. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal, concentração Genética de Populações) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília (UnB), 2005.
- Ribeiro, GGBL. *et al.* Afro-derived Brazilian populations: male genetic constitution estimated by Y-chromosomes STRs and AluYAP element polymorphisms. *Am J Hum Biol*, 21(3), 354-6, 2009.
- Ribeiro-dos-Santos, AK. *et al.* Dissimilarities in the process of formation of Curiau, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the Amazon region. *Am J Hum Biol*, 14(4), 440-447, 2002.
- Roewer, L. e Epplen, JT. Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Sci Int*, 53, 163-171, 1992.
- Roewer, L. *et al.* Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes; *Forensic Sci Int* 118:106; 2001.
- Romualdi, C. *et al.* Patterns of human diversity, within and among continents, inferred from biallelic DNA polymorphisms. *Genome Res*, 12, 602–612, 2002.
- Rosenberg, NA. *et al.* Genetica structure of human populations. *Science*, 298(5602), 2381-5, 2002.

- Ross, MT. *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 434, 325-337, 2005.
- Salzano, FM. Em busca das raízes. *Ciência Hoje*, 5, 48-53, 1986.
- Salzano, FM. Genetic diversity of South-American human populations at the DNA and protein levels. *Jour. Experim. Zool.*, 282, 157-63, 1998.
- Santos, FR. e Tyler-Smith, C. Reading the human Y chromosome: the emerging DNA markers and human genetic history. *Braz. J. Genet.*, 19(4), 1996.
- Schaffner, SF. The X chromosome in population genetics. *Nat Rev Genet*, 5, 43–51, 2004.
- Schilz, F. *et al.* Automated purification of DNA from bones of a Bronze Age family using the BioRobot® EZ1 workstation. *Historic Anthropology and Human Ecology*, Institute of Zoology and Anthropology, University of Göttingen, Germany, QIAGEN, 2006.
- Schneider, H. *et al.* Isolate breakdown in Amazonian – The blacks of the Trombetas river. *Rev Bras Genet*, 10, 565-574, 1987.
- Schneider, PM. Tandem repeat structure of the duplicated Y chromosomal STR locus DYS385 and frequency studies in the German and three Asian populations. *Forensic Sci Intl*, 97, 61–70, 1998.
- Shriver, MD. *et al.* Forensic ethnic affiliation estimation by use of population-specific allele DNA markers. *Am J Hum Genet*, 60, 957-964, 1997.
- Silva, MAE. *et al.* Identificação e delimitação das terras ocupadas pela comunidade remanescente de quilombo do Mocambo, Município de Porto da Folha, Estado de Sergipe. Parecer nº 48 FCP/DEPP/MinC/97. Diário Oficial da União, 28/05/1997, Brasília, Brasil. Seção 1, pp. 11112-11114, 1997a.
- Silva, MAE. *et al.* Identificação e delimitação das terras ocupadas pela comunidade remanescente de quilombo do Riacho de Sacutiaba e Sacutiaba, Município de Wanderley, Estado da Bahia. Parecer nº49 FCP/DEPP/MinC/97. Diário Oficial da União, 28/05/1997, Brasília, Brasil. Seção 1, pp. 11114-11115, 1997b.
- Silva, R. e Moura-Neto, RS. Allelic frequency distribution for three VNTR markers--D6S132, D7S467, D17S26--in Rio de Janeiro population, Brazil. *Forensic Sci Int*, 94(1-2), 33-8, 1998.
- Silva, WA Jr. *et al.* Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. *Am J Phys Anthropol*, 109(4), 425-437, 1999.

-
- Silva, WA Jr. *et al.* mtDNA haplogroup analysis of black Brazilian and Sub-Saharan populations: Implications for the Atlantic slave trade. *Hum Biol*, 78, 29-41, 2006.
- Simple Interactive Statistical Analysis (SISA) - home.clara.net/sisa/bonhlp.htm. Correção de Bonferroni realizada em Abril de 2009.
- Slatkin, M. e Excoffier, L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, 76, 377-383, 1996.
- Smith, KD. *et al.* Repeated DNA of the human Y chromosome. *Development*, 101(supp), 77-92, 1987.
- Sousa, SMB. Estrutura Genética de uma Comunidade Afro-Brasileira, São Gonçalo (BA). Dissertação (Mestrado em Genética de Populações) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 2001.
- Souza, IR. e Culpi, L. Valongo, an isolated Brazilian black community. I. Structure of the population. *Braz J Genet*, 15, 439-447, 1992.
- Souza, IR. e Culpi, L. Valongo, genetic studies on an isolated Afro-Brazilian community. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 3, 402-406, 2005.
- Souza, LIM. Variabilidade Molecular do Cromossomo Y em Remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira. Dissertação (Mestrado em Biociências, concentração Genética de Populações) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), 2003.
- Szibor, R. *et al.* A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online (<http://www.chrx-str.org/>). *Int J Legal Med*, 120, 252-254, 2006.
- Szibor, R. *et al.* Haplotyping of STR cluster DXS6801–DXS6809–DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int J Legal Med*, 119, 363–369, 2005.
- Telenius, H. *et al.* Minisatellite DNA profiles: rapid sample identification in linkage analysis. *Hum Hered*, 40(2), 77-80, 1990.
- Tenesa, A. *et al.* Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Research*, 17, 520–526, 2007.
- Tishkoff, AS. *et al.* Short Tandem-Repeat Polymorphism/Alu Haplotype Variation at the PLAT locus: implications for Modern Human Origins. *Am J Hum Genet*, 67, 901-925, 2000.
- Toni, C. *et al.* Population data of four X-chromosome markers in Tuscany, and their use in a deficiency paternity case. *Forensic Sci Int*, 137(2-3), 215-6, 2003.

- Tun, Z. *et al.* Simultaneous detection of multiple STR loci on sex chromosomes for forensic testing of sex and identity. *J Forensic Sci*, 44(4), 772-7, 1999.
- Underhill, PA. *et al.* The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann Hum Genet*, 65, 43-62, 2001.
- UNESCO - Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. Slave Route Project. Projeto Rota dos Escravos. Mapa das Rotas de Escravos. 2000. (http://portal.unesco.org/culture/en/ev.php-URL_ID=25659&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html visitado em 10 de setembro de 2008).
- Vila Real, RNS. Cultura e Currículo: Um estudo da escola Kalunga. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1996.
- Weber, JL. *et al.* Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 71:854-62, 2002.
- Willuweit, S. e Roewer, L. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update, *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 83-7, 2007.
- Y Chromosome Consortium, The. A nomenclature system of the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res*, 12, 339-348, 2002.
- Zarrabeitia, MT. *et al.* Unlinked tetrameric microsatellites on the X chromosome: frequency data in males from Cantabria (northern Spain). *J Forensic Sci*, 50(6), 1497-1498, 2005.

ANEXO A:

Aprovação do Comitê de Ética na Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília de acordo com os preceitos da Comissão Nacional de Ética na Pesquisa.



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 Autossômicos”, 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 B:

Protocolo de Extração de DNA com utilização do kit *Illustra Blood™* da *GE-Healthcare™*. Tradução livre da sessão correspondente à extração de DNA do manual do fabricante com modificações

- Lise de Células Sanguíneas

- a. Adicionar 20 µl da Solução de Proteinase K (oferecida pelo fabricante) no fundo de um microtubo com capacidade de 1,5 ml
- b. Adicionar 200 µl de sangue.
- c. Adicionar Solução de Lise (oferecida pelo fabricante) ao tubo.
- d. Agitar a solução com auxílio de vórtex por aproximadamente 10 minutos, até que a solução mude de vermelho para marrom escuro.
- e. Centrifugar por 30 segundos.

- Separação da Porção de Proteínas

- a. Após lise das células sanguíneas, adicionar com uma pipeta cerca de 640 µl do conteúdo do tubo ao centro de uma coluna de extração, oferecida pelo fabricante.
- b. Fechar o tubo e centrifugar por um minuto a 11000 RPM.
- c. Recolher o conteúdo contido na coluna de extração para lavagem e descartar o conteúdo do tubo coletor.

- Primeira Lavagem

- a. Adicionar 500 µl da Solução de Lise à coluna e centrifugar a 11000 RPM por um minuto.
- b. Descartar o conteúdo do tubo coletor após centrifugação.

- Segunda Lavagem

- a. Adicionar Tampão de Lavagem (oferecido pelo fabricante) à coluna e centrifugar a 11000 RPM por três minutos.
- b. Descartar o conteúdo do tubo coletor após centrifugação.

- Eluição

- a. Transferir a coluna de extração para um microtubo limpo.
- b. Adicionar ao centro da coluna 200 µl de Tampão de Eluição (oferecido pelo fabricante) aquecido a 70°C .
- c. Incubar os tubos em temperatura ambiente por cerca de um minuto.
- d. Centrifugar os tubos a 11000 RPM por um minuto.

ANEXO C:

Populações de remanescentes de quilombos estudadas geneticamente, entidades genéticas avaliadas e respectivas referências bibliográficas.

População	Marcador	N	Autor
Abobral	Elementos Alu Autossômicos	APO, ACE, TPA2 e FXIIB	74 Cotrim <i>et al.</i> , 2004
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	DYS19, DYS390, YAP, DYS199 e M168	48 Souza, 2003
Bananal	STRs autossômicos	CSF1PO, TH01, TPOX, F13A1, FES/FPS e Vwa	49 Barbosa <i>et al.</i> , 2006
	Proteína	HB	69 Oliveira <i>et al.</i> , 2002
Barra	SNPs Cromossomo Y	M3, M2, SRY10831a e b, SRY2627, SRY4064, 92R7, P2, P3, M9, M34, M60, M89, M213 e M216	22 Abe-Sandes <i>et al.</i> , 2004
	HSV I DNAm	RSPs e Indel	41 Abe-Sandes, 2002
	Proteína	HB	118 Oliveira <i>et al.</i> , 2002
Birongo (Venezuela)	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	17 Silva Jr <i>et al.</i> , 1999
	Proteína	ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	27 Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	VNTRs e STRs autossômicos	VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs Cromossomo X e Y	DYS19 e DXS52	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
Cajueiro	Proteína		Bortolini <i>et al.</i> , 1992
	HSV I DNAm		Bortolini <i>et al.</i> , 1997a

População	Marcador	N	Autor
	Proteína	ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	35 Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	VNTRs e STRs autossômicos	VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs Cromossomo X e Y	DYS19 e DXS52	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	44 Silva Jr <i>et al.</i> , 1999
	HSV I DNAmT	RFLPs	10 Silva Jr <i>et al.</i> , 2006
Cametá	Proteína		Bortolini <i>et al.</i> , 1992
	HSV I DNAmT		Bortolini <i>et al.</i> , 1997a
	Proteína	ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	VNTRs e STRs autossômicos	VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs Cromossomo X e Y	DYS19 e DXS52	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	40 Silva Jr <i>et al.</i> , 1999
	HSV I DNAmT	RFLPs	10 Silva Jr <i>et al.</i> , 2006
Curiaú	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, VW1 e F13A1	68 Cayres-Vallinoto <i>et al.</i> , 2003
	STRs Cromossomo Y	DYS19	68 Cayres-Vallinoto <i>et al.</i> , 2003
	Proteína	HP, TF, CP, ALB, SC-1 e 2, CA2, ESD, GLO, HB, ABO e RH	140 Guerreiro <i>et al.</i> , 1999
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	DYS19, YAP e DXS19	30 Ribeiro dos Santos <i>et al.</i> , 2002

População		Marcador	N	Autor	
		HSV I DNAm	RFLPs	45	Ribeiro dos Santos <i>et al.</i> , 2002
Curiepe (VEN)	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	25	Silva Jr <i>et al.</i> , 1999	
	Proteína	ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	29	Bortolini <i>et al.</i> , 1998	
	VNTRs e STRs autossômicos	VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	-	Bortolini <i>et al.</i> , 1998	
	STRs Cromossomo X e Y	DYS19 e DXS52	-	Bortolini <i>et al.</i> , 1998	
Galvão	Elementos Alu Autossômicos	APO, ACE, TPA2 e FXIIIB	50	Cotrim <i>et al.</i> , 2004	
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	DYS19, DYS390, YAP, DYS199 e M168	22	Souza, 2003	
Gaucinha	Proteína	HP, PGM1, GLO1, CA2, ESD	43	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999	
	STRs autossômicos	VWF1 e VWF2	43	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999	
Itamoari	Proteína	HB	88	Oliveira <i>et al.</i> , 2002	
Jequié	STRs autossômicos	CSF1PO, TH01, TPOX, F13A1, FES/FPS e Vwa	132	Barbosa <i>et al.</i> , 2006	
	Proteína			Sousa, 2001	
Kalunga	HSV I DNAm	RSPs e Indel	60	Ferreira, 2006	
	Proteína	HB	76	Oliveira <i>et al.</i> , 2002	
	DNA autossômico			Pedrosa, 2006	
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	SRY1532, SRY2627, SRY8299, 92R7, DYS271, DYS199, DYS287, PN2, PN3, M34, M9, 92R7, M2, M213, M216, M3, M34, M60, M89, M9, P2, P3,	38	Ribeiro, 2005	

População		Marcador	N	Autor
		SRY10831a, SRY10831b, SRY2627, SRY4064, YAP, DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393		
Maria Rosa	Elementos Alu Autossômicos	APO, ACE, TPA2 e FXIIB	22	Cotrim <i>et al.</i> , 2004
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	DYS19, DYS390, YAP, DYS199 e M168	9	Souza, 2003
Mimbó	Proteína	HP, PGM1, GLO1, CA2, ESD	176	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999
	STRs autossômicos	VWF1 e VWF2	176	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999
Mocambo	HSV I DNAm	RSPs e Indel	51	Ferreira, 2006
	Proteína	HB	171	Oliveira <i>et al.</i> , 2002
	DNA autossômico			Pedrosa, 2006 Amorim, 2009
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	SRY1532, SRY2627, SRY8299, 92R7, DYS271, DYS199, DYS287, PN2, PN3, M34, M9, 92R7, M2, M213, M216, M3, M34, M60, M89, M9, P2, P3, SRY10831a, SRY10831b, SRY2627, SRY4064, YAP, DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393	23	Ribeiro, 2005
Pacoval	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, VW1 e F13A1	48	Cayres-Vallinoto <i>et al.</i> , 2003
	STRs Cromossomo Y	DYS19	48	Cayres-Vallinoto <i>et al.</i> , 2003
	Proteína	HP, TF, CP, ALB, SC-1 e 2, CA2, ESD, GLO, HB, ABO e RH	166	Guerreiro <i>et al.</i> , 1999
Panaquire (Venezuela)	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	34	Silva Jr <i>et al.</i> , 1999

População	Marcador	N	Autor
	Proteína	ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	VNTRs e STRs autossômicos	VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs Cromossomo X e Y	DYS19 e DXS52	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
Paredão	Proteína		Bortolini <i>et al.</i> , 1992
	HSV I DNAm	RSPs e Indel	5 Bortolini <i>et al.</i> , 1997 ^a
	Proteína	ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	VNTRs e STRs autossômicos	VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs Cromossomo X e Y	DYS19 e DXS52	- Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs autossômicos	D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	16 Silva Jr <i>et al.</i> , 1999
Pedro Cubas	Elementos Alu Autossômicos	APO, ACE, TPA2 e FXIIIB	78 Cotrim <i>et al.</i> , 2004
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	DYS19, DYS390, YAP, DYS199 e M168	60 Souza, 2003
Pilões	Elementos Alu Autossômicos	APO, ACE, TPA2 e FXIIIB	37 Cotrim <i>et al.</i> , 2004
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	DYS19, DYS390, YAP, DYS199 e M168	15 Souza, 2003
Riacho de Sacutiaba	HSV I DNAm	RSPs e Indel	26 Ferreira, 2006
	Proteína	HB	69 Oliveira <i>et al.</i> , 2002
	DNA autossômico		Pedrosa, 2006 Amorim, 2009

População		Marcador	N	Autor
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	SRY1532, SRY2627, SRY8299, 92R7, DYS271, DYS199, DYS287, PN2, PN3, M34, M9, 92R7, M2, M213, M216, M3, M34, M60, M89, M9, P2, P3, SRY10831a, SRY10831b, SRY2627, SRY4064, YAP, DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393	9	Ribeiro, 2005
Rio das Rãs	HSV I DNAm	RSPs e Indel	71	Ferreira, 2006
	Proteína	HB	276	Oliveira <i>et al.</i> , 2002
	DNA autossômico			Pedrosa, 2006 Amorim, 2009
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	SRY1532, SRY2627, SRY8299, 92R7, DYS271, DYS199, DYS287, PN2, PN3, M34, M9, 92R7, M2, M213, M216, M3, M34, M60, M89, M9, P2, P3, SRY10831a, SRY10831b, SRY2627, SRY4064, YAP, DYS19, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393	56	Ribeiro, 2005
São Gonçalo	SNPs Cromossomo Y	M3, M2, SRY10831a e b, SRY2627, SRY4064, 92R7, P2, P3, M9, M34, M60, M89, M213 e M217	17	Abe-Sandes <i>et al.</i> , 2004
	HSV I DNAm	RSPs e Indel	41	Abe-Sandes, 2002
	Proteína	HB	53	Oliveira <i>et al.</i> , 2002
	Proteína			Sousa, 2001
São Pedro	Elementos Alu Autossômicos	APO, ACE, TPA2 e FXIIB	51	Cotrim <i>et al.</i> , 2004
	STR, Alu e SNP Cromossomo Y	DYS19, DYS390, YAP, DYS199 e M168	22	Souza, 2003

População	Marcador	N	Autor
Sertão de Valongo	Proteína ABO, FY, P, RHD- RHCE, GPA-GPB (MNS), KEL, HBB, HP, TF, ESD, CA2, BCHE e CHE2	49	Souza e Culpí, 1992
Sítio Velho	Proteína HP, PGM1, GLO1, CA2, ESD	185	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999
	STRs autossômicos VWF1 e VWF2	185	Arpini-Sampaio <i>et al.</i> , 1999
Sotillo (Venezuela)	STRs autossômicos D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	32	Silva Jr <i>et al.</i> , 1999
	Proteína ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	36	Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	VNTRs e STRs autossômicos VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	-	Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs Cromossomo X e Y DYS19 e DXS52	-	Bortolini <i>et al.</i> , 1998
Trombetas	Proteína ACP, AK, ESD, GLO, G6PD, HBB, HP, PGD, PHM1, TF e CP	-	Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	VNTRs e STRs autossômicos VW1, F13A1, D4S43, D1S80, APOB e PAH	-	Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs Cromossomo X e Y DYS19 e DXS52	-	Bortolini <i>et al.</i> , 1998
	STRs autossômicos D1S80, APOB, D4S43, PAH, F13A1 e vW-1	40	Silva Jr <i>et al.</i> , 1999
	Proteína HSV I DNAm RFLPs	10	Schneider <i>et al.</i> , 1987 Silva Jr <i>et al.</i> , 2006
Muquém	Proteína HBB		Pedrosa, 1998
Quilombo	Proteína HBB		Pedrosa, 1998