



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MAYLA ARACELLI ARAÚJO DANTAS

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-  
C COM MARCADOR DE LINHAGEM: ANÁLISE DO CROMOSSOMO Y**

CAMPINA GRANDE - PB

2016

MAYLA ARACELLI ARAÚJO DANTAS

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-  
C COM MARCADOR DE LINHAGEM: ANÁLISE DO CROMOSSOMO Y**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de em Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Simone Silva dos Santos  
Lopes

**Área de concentração:** Genética Humana e Medica  
Populacional.

CAMPINA GRANDE - PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

D192a Dantas, Mayla Aracelli Araújo.

Ancestralidade de pacientes com Mucopolissacaridose tipo III-C com marcador de linhagem [manuscrito] : análise do Cromossomo y / Mayla Aracelli Araújo Dantas. - 2016.  
59 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Mucopolissacaridoses. 2. Marcadores moleculares. 3. Haplogrupo do Y. I. Título.

21. ed. CDD 572.86

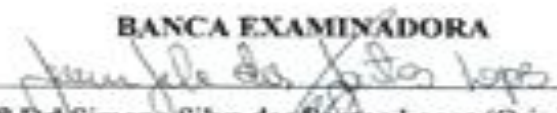
MAYLA ARACELLI ARAÚJO DANTAS

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-C COM MARCADOR DE LINHAGEM: ANÁLISE DO CROMOSSOMO Y**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de em Bacharel em Ciências Biológicas

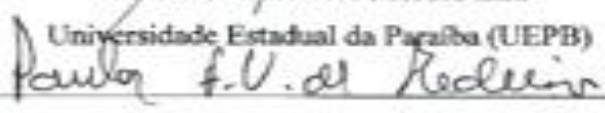
Aprovado em: 30 / 10 / 2016

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Silva dos Santos Lopes (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Walclécio Moraes Lira

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Franassinetti Vasconcelos de Medeiros  
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

CAMPINA GRANDE - PB

2016

A todos que compartilharam da minha caminhada de graduanda,  
contribuindo para a construção da mesma e para o presente estudo.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela força de perseverar e não desistir dos meus sonhos, pela paz e direcionamento das minhas escolhas.

À professora e orientadora Dr<sup>a</sup> Simone Lopes pela oportunidade de ter me aceitado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM), aumentando ainda mais minha paixão por esse universo fantástico da Genética e da Biologia Molecular. Sou imensamente grata pela confiança depositada para realizar a pesquisa, pelos conselhos, conversas e tenho bastante respeito e admiração em conhecer uma grande profissional e uma grande pessoa, tenho orgulho em ter sido sua orientanda.

À técnica de Laboratório Patricia Rocha, pela amizade, alegria, conselhos e conversas e principalmente pela ajuda em toda minha caminhada dentro do laboratório, tenho bastante respeito e admiração.

À minha família, meus pais Maria Aparecida e Hugo Dantas, meu irmão Victor Hugo, Minha cunhada Carla Juliana e meu sobrinho Davi Hugo por todo o apoio dado a minha graduação, incentivo, conselhos, paciência e compreensão durante os meus estudos. Principalmente aos meus pais por todos os ensinamentos na minha vida no qual me fizeram tornar a pessoa que sou hoje.

Aos meus companheiros do Laboratório, que ao longo desses quase três anos de convivência, ganhei diversas amizades através de alegrias, tristezas, festas, conversas, e conhecimentos compartilhados acompanharam a concretização desse trabalho. Em especial Eliene, Nathalya, Denise, Álisson, Mayara, Hugo e Jessica que me deram todo o apoio e suporte no Laboratório.

À BioG e minhas amigas e grande companheiras de curso que passaram a ser uma grande família, em especial Camila, Eliene, Ivynna, Fleurianne que durante esses quatro anos, vivenciamos muitas aventuras, alegrias, tristezas. Obrigada pela paciência e todo o apoio e incentivo das minhas decisões. Os momentos mais marcantes durante minha graduação foram com vocês, amizade para o resto da vida.

Á Ana Paula por apoiar e aconselhar nas minhas decisões, pelo companheirismo, alegrias, incentivo e compressões durante a realização do trabalho. Aos meus amigos Anderson e Tarsila que mesmo não compreendendo o assunto abordado, tiveram presentes com incentivos e alegrias, torcendo para meu sucesso.

“Para ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas.”

Steve Jobs

## RESUMO

As Mucopolissacaridose (MPSs) fazem parte do grupo das doenças lisossômicas de depósitos, ocasionadas por um erro enzimático na qual compromete a degradação das GAGs acumulando-se dentro dos lisossomas. MPS do tipo III- C é uma doença rara autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima da membrana lisossomal, denominada acetil-CoA  $\alpha$ -glucosaminidase N-acetiltransferase (HGSNAT), acumulando assim o sulfato de heparan, o que a diferencia no quadro clínico das outras MPSs é o fato de ser uma doença neurodegenerativa, que ainda não possui tratamento, como a MPS IV-A e VII que as possuem. A etnia e a miscigenação entre europeus, africanos e ameríndios deram origem a população brasileira, não ocorrendo com distribuição homogênea, diferem significativamente entre as regiões. Os marcadores moleculares são uma importante ferramenta para o entendimento das relações populacionais tais como variabilidade e estrutura genética da mesma, compreendendo e reconstruindo assim a história de um povo. O cromossomo Y possui uma região não recombinante que é herdada de uma forma patrilinear, servindo como marcador de linhagem. Esta pesquisa utilizou os seguintes marcadores moleculares do cromossomo Y: YAP, DYS199, SRY-1532, M343 e 12f2, cada um deles define um haplogrupo específico que defini um grupo populacional. O haplogrupo DE\* encontrado na região Sub-Sahariana estendendo-se ao Norte da África é definido pelo marcador YAP (+/-); o Q3\*, haplogrupo das regiões das Américas é caracterizado pelo DYS199 (C/T). O haplogrupo R\* representa a região europeia e deles derivam dois subhaplogrupos R1a, presente na Europa Oriental definido pelo marcador SRY-1532 (A/G) e o R1b encontrado principalmente na região ibérica definido pelo marcador M343 (A/C). O haplogrupo J\* definido pelo marcador 12f2 é mais comum no Leste-Oeste da Europa, originário do Oriente médio. O presente estudo teve como objetivo a análise da ancestralidade paterna dos pacientes com MPS tipo III-C da Paraíba para identificar a origem do haplótipo e entender os fatores evolutivos compartilhados. Dos 7 pacientes observados na Paraíba foram analisados 4 pacientes são do sexo masculino. Nestes pacientes observou uma frequência de 50% do subhaplogrupo R1b (Europa Ocidental, encontrado com altas frequências em Portugal) e 50% do haplogrupo R\* amplamente distribuído na Europa. Não foram observados os haplogrupos DE\*, Q3\* e J\*. Conclui-se que de acordo com os dados genéticos obtidos neste estudo, é possível inferir uma origem ancestral paterno Europeia para MPS III-C na Paraíba, e os alelos terem vindo para a região por causa dos homens portugueses que colonizaram Paraíba.

**Palavras-Chave:** Mucopolissacaridoses, Marcadores Moleculares, Haplogrupo do Y.



## ABSTRACT

The Mucopolysaccharidosis (MPSS) are part of the group of lysosomal diseases deposit, caused by an enzymatic error in which compromises the degradation of GAGs accumulating in lysosomes. MPS type III-C is a rare autosomal recessive disease caused by deficiency of the lysosomal membrane enzyme, acetyl-CoA dependent  $\alpha$ -glucosaminidase N-acetyltransferase (HGSNAT), thus accumulating the heparan sulfate which differentiates the clinical picture of MPSS other is the fact that a neurodegenerative disease, which does not have any treatment, such as MPS IVa and VII. Ethnicity and miscegenation between Europeans, Africans and Amerindians led the Brazilian population, not occurring with homogeneous distribution, differ significantly between regions. Molecular markers are an important tool for understanding the population relations such as variability and genetic structure of the same, understanding and thus reconstructing the history of a people. The Y chromosome has a non-recombinant region that is inherited from a patrilineal form, serving as line marker. This research used the following molecular markers of the Y chromosome: YAP, DYS199, SRY-1532, M343 and 12f2, each of which defines a specific haplogroup that define a population group. The haplogroup DE \* found in Sub-Saharan region extending to North Africa is defined by the label YAP (+/-); Q3 \* haplogroup regions of the Americas is characterized by DYS199 (C / T). The R \* haplogroup is the European region and of them derive two sub-clades 1a, present in Eastern Europe defined by the SRY-1532 marker (A / G) and R1b mostly found in the Iberian region defined by the M343 marker (A / C). The haplogroup J \* defined by marker 12f2 is more common in East-West Europe, originating in the Middle East. This study aimed to analyze the paternal ancestry of patients with MPS III-C of Paraiba to identify the origin of haplotype and understand the shared evolutionary factors. Of the 7 patients observed in paraíba were analyzed four patients are male. In these patients a frequency of 50% of R1b sub-clades (Western Europe, found at high frequencies in Portugal) and 50% haplogrupo R \* widely distributed in Europe. The \* DE haplogroups, Q3 \* and J \* were observed. It follows that according to the genetic data obtained in this study, it is possible to infer a European paternal ancestral origin for MPS IIIC in Paraiba, and alleles coming to the region because of Portuguese men who colonized Paraíba.

Keywords: Mucopolysaccharidosis, Molecular Markers, Haplogroup the Y.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Mapa da Teoria do Estreito de Bering .....	22
<b>Figura 2-</b> Mapa Territorial da Paraíba .....	24
<b>Figura 3-</b> Distribuição Global do Haplógrupo Y .....	26
<b>Figura 4-</b> Esquema e Estrutura do Cromossomo Y .....	28
<b>Figura 5-</b> Árvore Filogenética dos Haplogrupos do Cromossomo Y .....	29
<b>Figura 6-</b> Análise do marcador YAP. 39.....	41
<b>Figura 7-</b> Análise do marcador DYS199. ....	42
<b>Figura 8-</b> Análise do marcador SRY 1532. ....	43
<b>Figura 9-</b> Sequenciamento do marcador M343 dos pacientes com MPS IIIC. ....	424
<b>Figura 10-</b> Análise do marcador 12f2.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Porcentagem Equivalente para cada Haplogrupo .....	46
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das MPSs.....	34
--	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Marcadores Moleculares Utilizados.....	39
<b>Quadro 2.</b> Resultados das Análises dos marcadores. ....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
DL	Doença Lisossômica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EXO I	Exonuclease I
EIM	Erro Inato do Metabolismo
G	Guanina
GAG	Glicosaminoglicanos
HGSNAT	Heparan acetil-CoA: $\alpha$ -glucosaminida N-acetiltransferase
HUAC	Hospital Universitário Alcides Carneiro
<i>Indel</i>	Inserção/Deleção
ISOGG	<i>International Society Of Genetic Genealogy</i> (Sociedade Internacional de Genealogia Genética)
Kb	Quilobase/Kilobase
LGBM	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version</i>
Min	Minuto
mM	Mili-Molar
MSY	<i>Male Specific Region of Y-chromosome</i> (Região específica masculina do cromossomo Y)
MPS	Mucopolissacaridose
NRY	<i>Non-recombining Region of Y-chromosome</i> (Região não recombinante do cromossomo Y)
PAR	Região pseudo-autossômica
Pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SRY	Sex-Determining Region on Y (Gene determinante sexual da região do Y)
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismos de Nucleotídeo Único)
STR	<i>Short tandem repeats</i> ( Pequenas repetições tandem)
s	Segundos
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
TBE	Tris-Borato-EDTA
T	Timina
UEP	<i>Unique event polymorphisms</i> - Polimorfismo de Evento Único
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
YAP	<i>Y-Alu insertion polymorphism</i> (Polimorfismo de inserção Alu no cromossomo
Y)	
YCC	Consórcio do cromossomo Y

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	Microlitro
%	Por cento
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	20
3.1. EVOLUÇÃO HUMANA E POVOAMENTO DAS AMÉRICAS .....	20
3.2. FORMAÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	21
3.3. COLONIZAÇÃO DA POPULAÇÃO PARAIBANA.....	21
3.4. MARCADORES MOLECULARES .....	23
3.5. MARCADORES DE LINHAGEM.....	24
<b>3.5.1. Cromossomo Y</b> .....	25
3.5.1.1. YAP.....	28
3.5.1.2. DYS199.....	28
3.5.1.3. 12f2 .....	29
3.5.1.4. SRY-1532.....	29
3.5.1.5. M343 .....	30
3.6. MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS) .....	30
3.7. MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-C.....	33
3.8. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO.....	36
4.3. ANÁLISES MOLECULARES .....	36
<b>4.3.1. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)</b> .....	36
<b>4.3.2. Análise em Gel de Poliacrilamida</b> .....	37
<b>4.3.3. Análise em Gel de Agarose</b> .....	37
<b>4.3.4. Sequenciamento das Amostras</b> .....	37
<b>4.3.5. Tipagem por Análise de <i>RFLP</i></b> .....	38
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	38
5.1. ANÁLISE DO MARCADOR YAP .....	39
5.2. ANÁLISE DO MARCADOR DYS199.....	39

5.3.	ANÁLISE DO MARCADOR SRY-1532.....	40
5.4.	ANÁLISE DO MARCADOR M343.....	41
5.5.	ANÁLISE DO MARCADOR 12f2.....	42
5.6.	ANÁLISES DOS HAPLOGRUPOS.....	43
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
	<b>ANEXO A – Reagentes e Temperaturas Padronizadas.....</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXO B – Cromatogramas de todos os indivíduos analisados, bem como seus valores de confiança (Phred) respectivos.....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A população brasileira é a mais diversificada do mundo, resultado de uma miscigenação entre as etnias ameríndia, europeia, africana e mais recentemente asiática. Sendo alvo de diversos estudos de genética de populações, tendo como foco não apenas o conhecimento sobre o conjunto gênico que compõe a população atual como também a compreensão de todo o processo de colonização (PEDROSA, 2006; ABE-SANDES, 2003).

Compreender a heterogeneidade e a mistura dos brasileiros dentro e entre regiões geográficas é importante, pois favorece a compreensão das doenças endêmicas e suas implicações. Além disso, favorece a interpretação de ensaios clínicos, contribuem na genética clínica e medicina genômica, e na implementação da farmacogenética para conhecimento específicos na prescrição de medicamentos (PENA *et al.* 2011).

O cromossomo Y possui características particulares como ser haploide, ou seja, não recombina na sua maior porção com outras regiões ou outros cromossomos, tornando a herança de pais para filhos inalterada, e a ocorrências das variações alélicas devido as mutações geradas, indicam a utilização destas para a formação de haplótipos e consequentemente haplogrupos que define a origem ancestral do indivíduo e da população (MACHADO, 2012).

As análises de marcadores genéticos herdados de forma uniparental, incluindo os a porção não recombinantes do cromossomo Y e as sequências do DNA mitocondrial, têm se mostrado eficientes ferramentas moleculares para remontar a origem das populações atuais existentes (CORACH *et al.*, 2006).

As mucopolissacaridoses (MPS) são um grupo de doenças de depósitos lisossômicos que se caracterizam pelo acúmulo intralissossômico de glicosaminoglicano (GAGs), ocasionado pela deficiência na atividade de uma enzima lisossômica envolvida na degradação dessas moléculas. O acúmulo anormal compromete a função celular e orgânica, ocasionando inúmeras manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam diversos órgãos (WRAITH, 1995).

A classificação das MPS é baseada na deficiência enzimática específica. Embora haja diferentes fenótipos clínicos para o mesmo defeito enzimático, assim como fenótipos semelhantes para deficiências enzimáticas diferentes (VIEIRA *et al.*, 2008).

A síndrome de Sanfilippo do tipo III-C é uma doença autossômica recessiva neurológica grave causada pela falta de degradação enzimática do sulfato de heparano nos lisossomos. A deficiência da enzima acetil-CoA  $\alpha$ -glucosaminidase N-acetiltransferase,

produzido pelo gene HGSNAT, localizado na região 8p11.1, resultando no acúmulo progressivo e excessivo do sulfato de heparano (PSHEZHETSKY,2015; LIMA, 2009).

O estado da Paraíba possui um número elevado de pacientes com MPS III-C em comparação aos dados nacional de um total de 21 pacientes (Rede MPS Brasil, 2012). Em Portugal estima-se a prevalência de 1:800.000 nascidos vivos para a MPS III-C (COUTINHO, 2008). Dessa forma, o objetivo deste estudo será responder qual a linhagem paterna destes pacientes, para identificar a origem populacional da mutação que está sendo compartilhada entre os pacientes de MPSIII-C da Paraíba, para dessa forma entender quais os fatores evolutivos que estão contribuindo para a manutenção destes alelos na população atual.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Realizar a análise de ancestralidade dos pacientes com Mucopolissacaridose tipo III-C da Paraíba acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) com o marcador de linhagem (Cromossomo Y) para identificar a ancestralidade paterna dos pacientes.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a ancestralidade paterna dos pacientes com MPS acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC), hospital de referência para MPS do estado e representante da Paraíba na Rede MPS Brasil;
- Analisar os marcadores genéticos (YAP, DYS199, 12f2, SRY-1532, M343,);
- Identificar e analisar as frequências dos Haplogrupos (DE\*, Q3\*, J\*, R\*, R1a, R1b) nos pacientes estudados;
- Comparar as frequências dos haplogrupos encontrados com as outras populações.

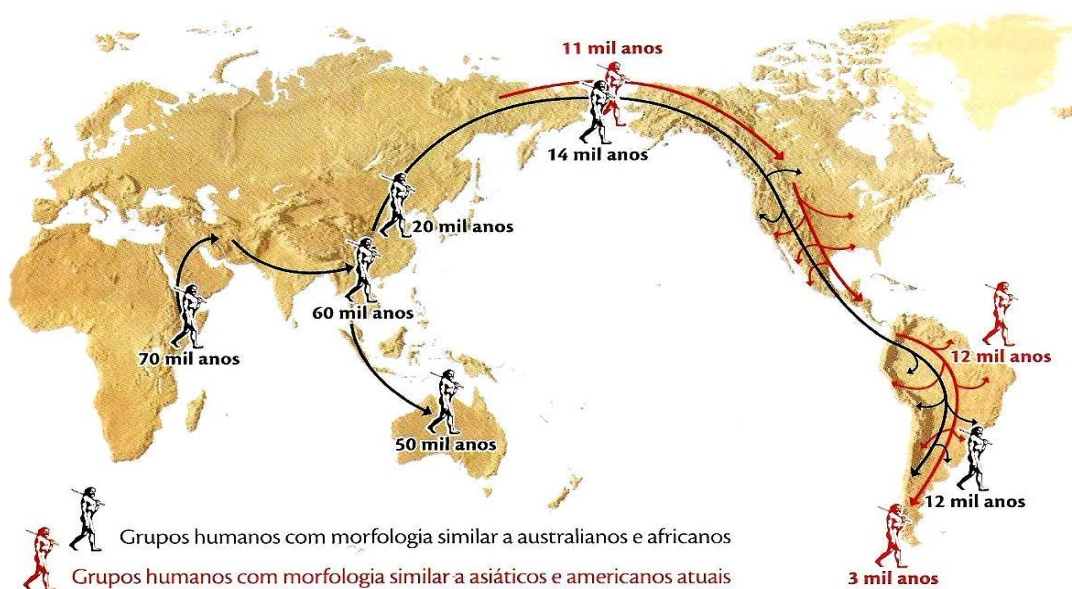
### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. EVOLUÇÃO HUMANA E POVOAMENTO DAS AMÉRICAS

Um dos principais fatores evolutivos que resulta na diversidade genética de populações humanas é a migração (MACHADO, 2012). Com isso, para interpretar a história evolutiva humana, são necessárias compreender as causas, e os efeitos das migrações, ajudando assim no entendimento das alterações nas frequências alélicas e genotípicas nas populações assim como na dispersão dos variantes alélicos, como por exemplo os que são responsáveis pelas doenças genéticas (MACHADO, 2012).

O homem moderno teve uma origem única e relativamente recente (cerca de 100 mil anos atrás) na África, migrando pela Ásia, Europa, Oceania e as Américas (PENA, 2002). Ao cruzar o estreito de Bering, da Sibéria para a América do Norte, iniciou-se então o povoamento do Novo Mundo. Apesar de ter sido esse o caminho mais provável, ainda existe discussões e incertezas sobre a forma de fixação dos primeiros americanos (SILVA-JR *et. al.*, 2002).

**Figura 1.** Mapa da Teoria do Estreito de Bering



**Fonte:** <http://www.revistadehistoria.com.br/secao/artigos/caminhos-pre-colombianos>

Essa migração acompanhou de diferenças morfológicas, sendo resultado das adaptações das condições climáticas e ambientais, isolamento geográfico e inovações tecnológicas, como por exemplo - a produção de ferramentas e alimentos (BARROS, 2006).

### 3.2. FORMAÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA

O povo brasileiro possui uma característica bem marcante em relação a outras populações do mundo devido ter sido alvo de diversos fluxos migratórios ao longo de sua história. Desde as chegadas dos europeus em 1500, o território já se encontrava povoado por ameríndios (PEDROSA, 2006). Estima-se que cerca de cinco milhões de europeus, incluindo os portugueses, chegaram ao Brasil entre 1500 e 1960, e que inicialmente o “grupo” era composto quase que exclusivamente por homens (PENA, 2002; RIBEIRO, 1995).

Desses portugueses, alguns eram Judeus que estava em Portugal no período de 1509 e que foram expulsos devido à inquisição, tornando-se “cristãos-novos” (PENA, 2002). A imigração de europeus não-portugueses aumentou no final do século XIX, com o término do tráfico de escravos africanos (1538-1888), e continuou até meados do século XX, com o início da imigração asiática (PEDROSA, 2006).

Como fatores dessa miscigenação, pode-se afirmar que a população brasileira é baseada em três etnias principais: ameríndio, europeu e africano. Porém essa distribuição não é homogênea no território brasileiro (PEDROSA, 2006).

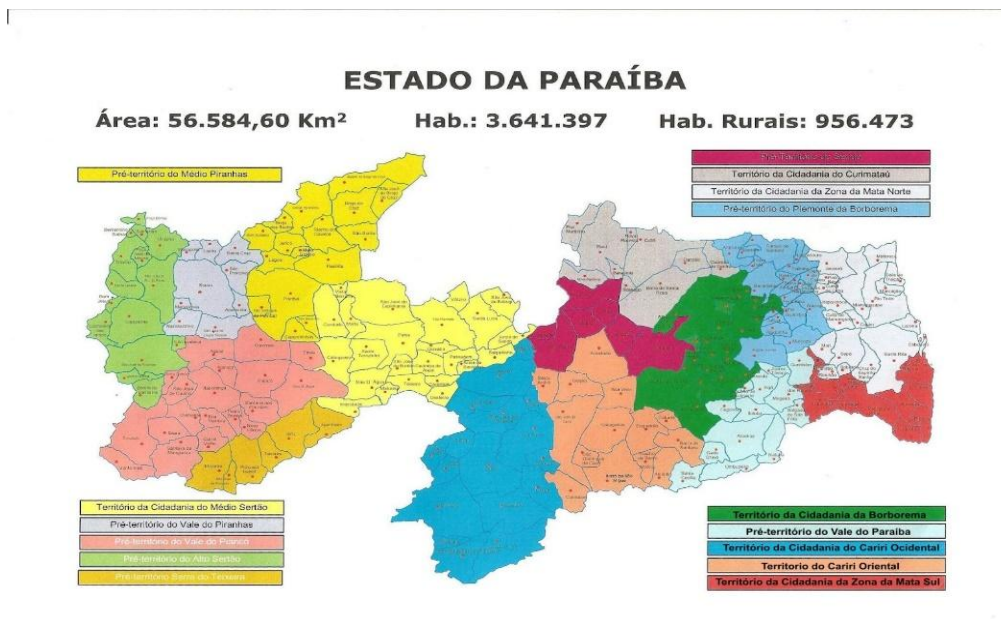
A imigração dos europeus e africanos na colonização do Brasil interferiu de forma direta na população e na distribuição territorial dos indígenas, ocorrendo a eliminação ou o deslocamento deste povo cada vez mais para o interior do país (MACHADO, 2012). Porém, alguns desses nativos americanos permaneceram convivendo e formando alianças nas regiões onde os portugueses ocuparam (MONTEIRO, 1996).

Estima-se que entre 1820-1975, seis milhões de europeus (70% eram portugueses e italianos) e outros povos, como espanhóis, alemães, sírios, libaneses e japoneses também se estabeleceram no Brasil nesse período (IBGE, 2000).

### 3.3. COLONIZAÇÃO DA POPULAÇÃO PARAIBANA

Atualmente a Paraíba é dividida em 223 municípios, distribuídos em uma superfície de 56.584,6 km<sup>2</sup>, (figura 2). Grande parte desse território pertencia à capitania de Itamaracá (se estendia do rio Santa Cruz até Baía da Traição) de onde foi desmembrando em 1534, formando à Capitania Rio Paraíba (MOREIRA *et. al*, 2003).

Figura 2. Mapa Territorial da Paraíba



Fonte: <http://www.coisaspraver.com/2013/02/mapa-da-paraiba-com-todos-os-municipios.html>

A conquista do território paraibano ocorreu um século após o descobrimento do Brasil. O ponto inicial desse processo foi a fundação da cidade de Felipéia de Nossa Senhora das Neves (1585), que mais a frente foi chamada de Frederica (1634), de Parahyba (1654) e finalmente, a conhecida por todos como João Pessoa em 1930 (MOREIRA *et. al*, 2003). Ocorreram cinco expedições para a conquista do estado entre 1574 até 1584 (GOVERNO DA PARAIBA, 2016).

Os franceses já estavam instalados nas terras paraibanas antes mesmo dos portugueses chegarem, eles possuíam uma relação de paz em relação aos índios nativos potiguaras devido o interesse pelo Pau-Brasil, além de possuírem união matrimonial com tais índios. Para os portugueses invadirem o território, conquistaram os outros índios nativos da região: Os tabajaras. Após essa união, lutaram contra os potiguaras, resultando na vitória e expulsando os mesmo para o Rio Grande do Norte, e conseqüentemente reduzindo os franceses no litoral do estado (RIBEIRO, 1995; MELLO, 2013). No Império, ocorreu o controle holandês sobre a Paraíba que durou vinte anos (1634-1654), porém não há relatos de um domínio total ou muita miscigenação tenha ocorrido (FELINTO, 2000).

A cana de açúcar e o gado foram atividades pioneiras durante o processo de ocupação do estado, no qual, tais atividades foram se desenvolvendo através da concessão de sesmarias, acrescidas com a expansão do algodão no século XIX, surgindo núcleos de povoamento, o que originou as primeiras vilas, e posteriormente as cidades (MOREIRA *et. al*, 2003).



Durante esse processo cinco municípios foram criados: João Pessoa e Mamanguape no litoral, Areia, no Brejo Paraibano e Piancó e Pombal, no sertão. Ainda no período do Império, devido ao crescimento populacional, vinte e cinco novos municípios foram criados na então Província e conseqüentemente com o passar das épocas históricas esse crescimento tendeu a aumentar, criando assim, mais e mais municípios (MELO, 2002; MOREIRA *et. al.*, 2003).

#### 3.4. MARCADORES MOLECULARES

A variação genética ocorre devido às mutações e recombinações de forma natural. Essas mudanças das frequências alélicas ao longo da evolução humana pode ser explicada por fatores evolutivos, tais como fluxo gênico, deriva genética e seleção natural, dependendo tanto dos processos biológicos como dos demográficos e históricos (CHAKRAVARTI 1999; FUTUYMA. 1998).

Os marcadores genéticos são uma importante ferramenta para o entendimento das relações populacionais, como variabilidade e estrutura genética. Essa estrutura genética populacional visa a heterogeneidade na distribuição dos genótipos e a variabilidade genética intra e interpopulacional, construindo assim a evolução humana, principalmente na reconstrução de rotas e a determinação das origens de povoamento (PEDROSA, 2006, KAMADA *et. al.*, 2009).

Em 1980, os estudos sobre as populações baseavam-se nas características demográficas e nos dados de polimorfismos de marcadores clássicos – proteicos e sorológicos. O desenvolvimento da biologia molecular trouxeram avanços na possibilidade de detecção de polimorfismos, como por exemplo: enzimas de restrição com técnicas de *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), técnicas como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o sequenciamento automático de fragmentos de DNA (PEDROSA, 2006).

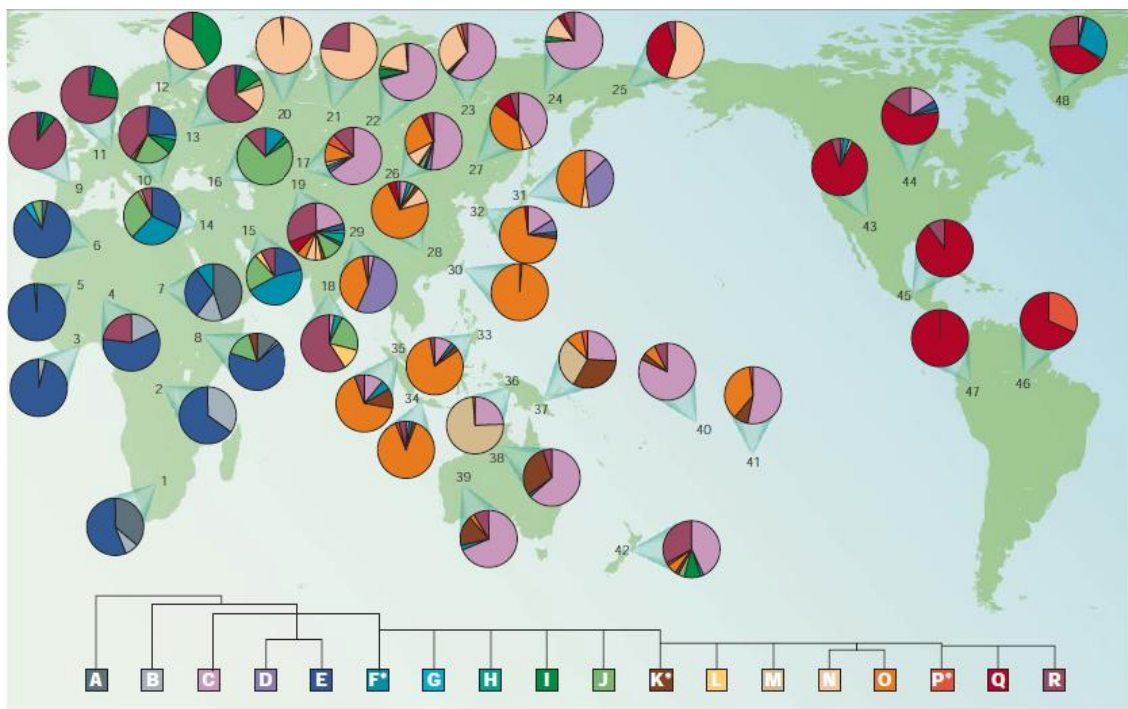
Existem vários marcadores genéticos, dentre eles podemos citar os *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*), ou polimorfismo de ponto; os *INDELS*, que são os polimorfismos de inserções e deleções; os polimorfismos de elementos de transposição, como por exemplo, inserções *Alu* (*Short Intersperd Repetitive Elements*), sendo bastante usados em estudos evolutivos populacionais; os microssatélites; os minissatélites. Todos estes ajudam a aumentar o volume de informações possíveis de serem acessadas (BASTOS-RODRIGUES *et. al.*, 2006; PEDROSA, 2006).

### 3.5. MARCADORES DE LINHAGEM

Marcadores moleculares de linhagens ou uniparentais seriam o cromossomo Y para designar as linhagens paternas, patrilinhagem e o DNA mitocondrial (DNAMt) para designar linhagens maternas, matrinhagens. Estes apresentam propriedades genéticas comuns, o Y é transmitido através do espermatozoide paterno apenas para filhos homens e o mitocondrial é transmitido através do óvulo materno para filhos e filhas. Além de não se recombinarem com outros segmentos genômicos, são transmitidos em blocos de genes, designado de haplótipos que seria conjunto de alelos, ou seja, sequencias variantes em *locus* que são transmitidos como uma unidade única por causa da sua baixa frequência de recombinação que podem servir como marcadores de linhagem devido serem geográfico-específico (PENA *et. al*, 2000).

Esses blocos permanecem inalterados até que ocorra uma mutação gerando polimorfismos dos haplótipos servindo como marcadores de linhagem durante a evolução humana, alcançando várias gerações tanto na patrilinhagem quanto na matrinhagem reconstruindo toda uma história genética. Um grupo de haplótipos, que compartilham um ancestral em comum, designa um haplogrupo. Este é definido como um grupo de indivíduos que compartilham variações e que geralmente são restritos em área geográfica. (PENA *et. al*, 2000; MORAIS, 2013). Na figura 3 observa-se a distribuição global do haplógrupo Y.

**Figura 3.** Distribuição Global do Haplógrupo Y



**Fonte:** JOBLING *et.al.*, 2003.

### 3.5.1. Cromossomo Y

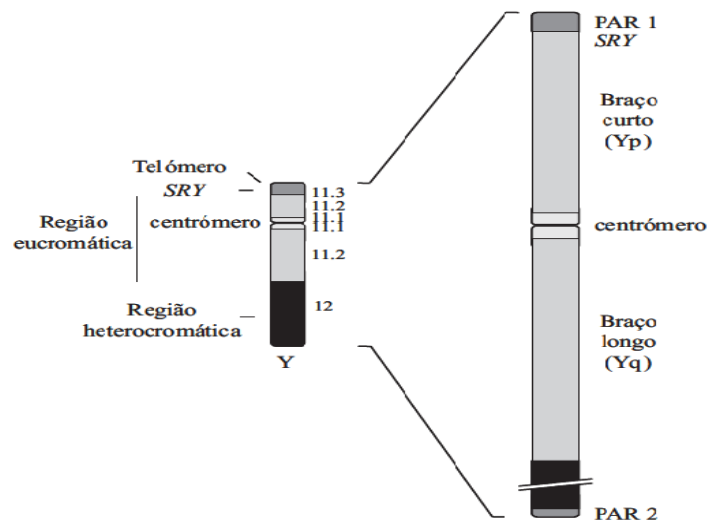
O cromossomo Y é o terceiro menor do cromossomo humano em torno de 60Mb e representa cerca de 2% - 3% de um genoma haploide (QUINTANA-MURCI, 2001; MARTINS, 2008). Cerca de 95% do seu conteúdo é constituído por uma região não recombinante (NRY), ou seja, não sofre recombinação com nenhum outro cromossomo (PAGE *et. al.*, 1982; LAHN *et. al.*, 1997; BARROS, 2006), recentemente renomeado como male-specific (MSY) (SKALESTSKY *et. al.*, 2003).

Observações citogenéticas baseado nas bandas-cromossômicas permitiram ser identificados regiões Y diferentes: as regiões eucromatina, heterocromatina e porções pseudoautossômicas dividida em duas regiões PAR1, localizada na região terminal do braço curto Yp e PAR2, localizada no braço longo Yq, estas são responsáveis durante a meiose pelo pareamento, recombinação e segregação corretas do par de cromossomo. (QUINTANA-MURCI *et. al.*, 2001; CRAIG *et. al.*, 2004).

O cromossomo Y é importante para a determinação sexual masculina, formação e manutenção de células germinativas. O Yp tem como função o desenvolvimento testicular, onde se localiza o gene SRY (Sex-Determining Region on Y - Yp11.3), responsável pela diferenciação e crescimento testicular e o Yq pelos fatores envolvidos da espermatogênese (KRAUSZ, 2005; BORGES *et. al.*, 2015; SANTOS, 2011). O SRY está situado próximo à fronteira pseudoautossômica e é expresso no início do desenvolvimento das células do cordão germinativo antes da diferenciação dos testículos (BORGES *et. al.*, 2015).

Cerca de um terço da região eucromatina MSY é composto de grandes unidades repetitivas, de diferente composição, tamanho, número de cópias e orientação, ocorrendo polimorfismos dispersos ao longo dos braços curtos e longos do cromossomo Y (TILFORD *et. al.*, 2001). Estes polimorfismos presentes no cromossomo Y podem ser bialélicos *UEPs* (*Unique Events Polimorphisms*), como os *SNPs*, e multialélicos como os *STRs* (*Short Tandem Repeats*) (SANTOS, 2004). Na figura 4, pode-se observar o cromossomo Y.

**Figura 4.** Esquema e estrutura do Cromossomo Y



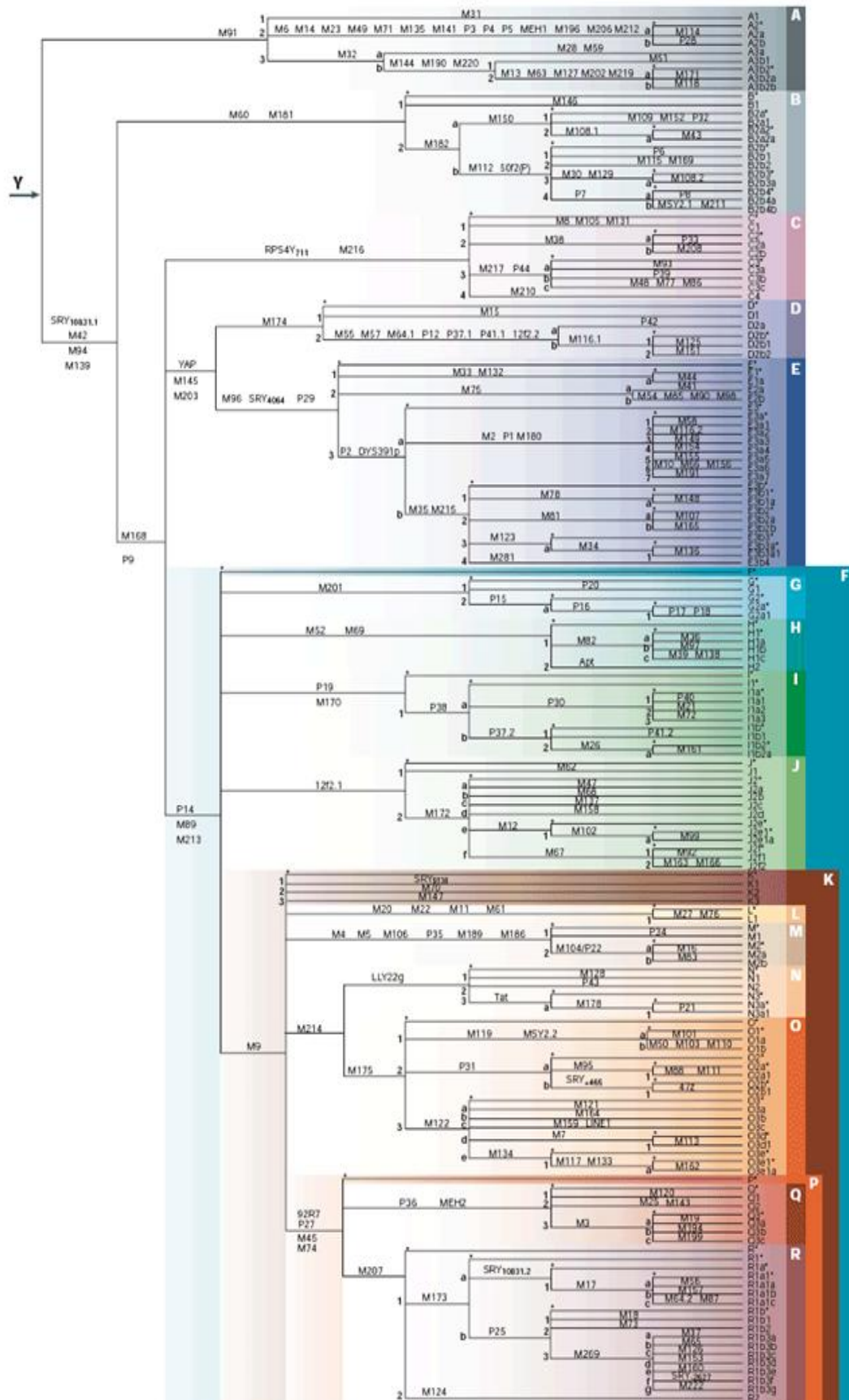
Fonte: FERRÁS *et.al*, 2004

Os SNPs são mutações raras caracterizadas pela substituição de um único nucleotídeo na sequência do DNA, permitindo definir o haplogrupo do indivíduo através da mutação. Os STRs são sequências repetitivas diversificadas em determinados *loci* com um número diferente de repetições, definindo haplótipos e o grau de variação dentro de um mesmo, possibilitando induzir uma possível origem (ALBUQUERQUE, 2014; FRANCALACCI *et. al.*, 2008).

Os polimorfismos dessa região são valiosos para investigar o fluxo gênico mediado pelo homem desde a antiguidade até o presente momento, além de complementar as bases de estudo do DNAm (DNA mitocondrial) (HAMMER, 1995; LAHN, 2001).

Segundo ISOGG (*International Society Of Genetic Genealogy*), a árvore filogenética do cromossomo Y identifica os haplogrupos com as letras de A à T, no qual estes são subdividido em ramos. A nomenclatura foi criada em 2008 pelo YCC (*Y- Chromosome Consortium*), como apresentado da figura 5.

Figura 5. Árvore Filogenética dos Haplogrupos do Cromossomo Y.



Fonte: The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age, 2003.

### 3.5.1.1. YAP

A mutação YAP (*Y-Chromosome Alu Polomorphic Element*) está presente em populações da África Subsaariana, Norte Africano e populações Europeias, ao contrário do que se vê em populações Asiáticas, que é completamente ausente na sua maioria. Apresenta uma inserção de retrotransposon, no qual faz parte da família *Alu*, que são repetições intercaladas curtas, estando presente em alguns indivíduos do sexo masculino por ser a única localizada no cromossomo Y humano. Amplifica fragmentos com 455pb (YAP+) ou 150 (YAP-) identificando a ausência ou presença de inserção, respectivamente (HAMMER, 1994; HAMMER, 1995; AGRAWAAL *et. al.*, 2005). Define o haplogrupo DE\*, surgiu há cerca de 65.000 anos atrás (JIN *et. al.*, 2003; KARAFET *et. al.*, 2008)

A família *Alu* possui essa denominação devido a maioria de seus membros serem clivados por endonucleases de restrição bacteriana (*Alu I*). Tem cerca de 300 pares de bases e são relacionados uns aos outros, porém não exibem uma sequência idêntica entre eles (MARTINS, 2007).

Inserções *Alu* são marcadores ideais para estudos evolucionários humanos devido a retrotransposição produzir eventos irreversíveis e amplamente distribuídos, cada qual com um ancestral conhecido (WATKINS *et. al.*, 2001).

### 3.5.1.2. DYS199

O DYS199 (M3) é um *SNP*, polimorfismo de nucleotídeo único, caracterizado por uma transição de C → T na posição -199, definido o haplogrupo Q3\*. (UNDERHILL *et. al.*, 1996; LELL *et. al.*, 1997, LARDONE *et. al.*, 2013). Estima-se que esse haplótipo fundador surgiu em torno de 30.000 ano atrás, ocorrendo especificamente nas Américas até o presente (CARVALHO-SILVA *et. al.*, 1999; UNDERHILL *et. al.*, 1996).

Estudo de várias populações da Sibéria identificaram a presença do alelo DYS199 T apenas em esquimós asiáticos e tribos afins da região do Estreito de Bering ou Beringia. Isto sugere que o alelo DYS199 T é um marcador útil para identificação de haplótipos do cromossomo Y originado depois da primeira migração para as Américas ou Beringia (KARAFET *et al.*, 1997; LELL *et. al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1999).

A clivagem dos fragmentos ocorre por meio de enzima de restrição *Mfel* (SANTOS *et. al.*, 1999). No qual os tamanhos seria de 202pb para o alelo T moderno sem o reconhecimento

da enzima e 181+21pb para o alelo C ancestral reconhecendo o sitio da enzima, ou seja, com o sítio de reconhecimento da enzima (CARVALHO-SILVA *et. al.*, 1999).

#### 3.5.1.3. 12f2

O marcador 12f2 define o haplogrupo J\*, mais comum no Leste-Oeste da Europa (FRANCALACCI *et. al.*, 2008). Originário do Oriente médio e encontrado também na Grécia, Itália, Ibéria e Europa ocidental, norte da Índia (OLIVEIRA, 2011).

É um marcador polimórfico caracterizando a mutação do tipo *Indel*, com deleção de 9pb (ROSSER *et. al.*, 2000; KAMP *et. al.*, 2000). O amplicon 12f2 está ausente em indivíduos de origem africana, e que tal mutação surgiu devido a uma deleção durante a evolução humana cerca de 31.700 mil anos atrás (SEMINO *et. al.*, 2004).

#### 3.5.1.4. SRY-1532

É um *SNP*, polimorfismo de nucleotídeo único, com uma transição de A → G, na posição -1532 do gene SRY, localizado no braço curto do cromossoma Y (WHITFIELD *et. al.*, 1995; REBELO, 2003).

Foi descrito pela primeira vez por Whitfield *et. al.*, 1995, no qual identificou o alelo ancestral a partir de um chimpanzé e outros primatas. A sequência do fragmento de 18.3 Kb; identificou na posição 10831 a base A, a variante ancestral, enquanto a forma mutada apresentava o alelo G, devido à isto, ficou muito conhecida como SRY10831. Este polimorfismo identifica o subhaplogrupo R1a, derivado do haplogrupo R\* (KARAFET *et. al.*, 2008; REBELO, 2003).

A clivagem dos fragmentos ocorre por meio de enzima de restrição *DraIII*, no qual os tamanhos seriam de 167pb para o alelo A ancestral, não apresentando o reconhecimento da enzima e 112+55pb para o alelo moderno G, ou seja, com o sítio de reconhecimento da enzima. Com o alelo moderno, permiti a determinação dos variantes alélicos, porém com o ancestral, permiti determinar os indivíduos serem de populações europeias (centro da Europa) e asiáticas, estando em populações africanas e ameríndias (RAMANA, 2001; REBELO, 2013; WHITFIELD *et. al.*, 1995)

O R1a encontra-se frequentemente na parte leste da Europa, concentrado na Europa Oriental (CHIARONI, 2009). O R1a surgiu na Ásia Central, aparentemente no Sul da Sibéria, e há

aproximadamente 8.000 a 9.000 anos atrás se espalharam pela parte leste da Europa e Ilhas Britânicas (KLYOSOV et al., 2012).

#### 3.5.1.5. M343

O marcador M343 define o subhaplogrupo R1b que ocorreu há cerca de 35.000 anos e é mais comum na Europa Ocidental onde possui grandes concentrações na Península Ibérica e nas Ilhas Britânicas, diminuindo sua proporção de oeste para leste, derivado do haplogrupo R\*. O Marcador M343 é um polimorfismo de nucleotídeo único, *SNP* (MYRES *et. al.*, 2011; OLIVEIRA, 2011; MARTINS, 2007). Pertencente a um subhaplogrupo do R1 definido pelo marcador M173 (FRANCALACCI *et. al.*, 2008).

Os membros do subhaplogrupo R1b, específicos de Portugal, são os descendentes diretos dos primeiros Europeus modernos conhecidos como “Homem de cro-Magnon” (SOUZA, 2006).

O marcador (rs9786184) caracterizado pela transversão  $C \rightarrow A$ , onde a mutação encontra-se na posição 120 do gene, possui um tamanho de 194pb. O alelo ancestral C define o haplogrupo R\*, enquanto o alelo moderno A define o subhaplogrupo R1b (ROTHER, 2014; NASCIMENTO, 2016).

### 3.6. MUCOPOLISSACARIDOSES (MPS)

Os Glicosaminoglicanos (GAGs) são componentes do tecido conjuntivo conectivo, que quando produzidos, localizam-se primeiramente na superfície da célula ou na matriz extracelular, podendo estar livres ou associados a proteínas formando uma molécula maior chamada de proteoglicanos (CLARKE, 2008). Esta, cuja função é o de controlar o fluxo de água e nutrientes para célula a partir do momento que as GAGs absorvem uma certa quantidade de água, adquirem uma certa consistência, garantindo assim uma função lubrificante e de união entre os tecidos, permitindo, por exemplo, o movimento das articulações (LIMA, 2009).

Os proteoglicanos que estão na matriz extracelular, quando degradados, realizado pelas proteases e com a remoção de suas porções endoglicosídicas (CLARKE, 2008), geram as GAGs e o ácido hialurônico como produtos. Estes GAGs gerados entram nos lisossomos através da digestão intracelular, e a depender das moléculas que os constituam (sulfato de dermatan, sulfato de heparan, sulfato de keratan e sulfato de condroitina), serão digeridos



por uma das quatro vias possíveis de degradação lisossômica. A degradação progressiva dos GAGs requer dez diferentes enzimas: quatro glicosidasas, cinco sulfatases e uma transferase não hidrolítica, cuja estrutura, biossíntese, processamento e a sequência do cDNA já são extensivamente documentados (COUTINHO *et. al*, 2011).

As mucopolissacaridoses (MPS) fazem parte do grupo das doenças lisossômicas de depósitos (DLD) (SANCHEZ, 2006). Manifestam-se devido aos erros inatos do metabolismo dos GAGs, antigamente chamado de mucopolissacaridose, dando o nome a doença (KOK, 2003), que não são degradados pelos lisossomos devido à deficiência na produção das enzimas específicas para esta função, gerando o acúmulo progressivo destas macromoléculas.

O primeiro caso de MPS foi descrito em 1917 por Hunter, mas as bases bioquímicas da doença só foram elucidadas entre as décadas de 50 e 60, sendo mais tarde-identificadas suas bases moleculares e os seus subtipos (SANTANA, 2004).

As MPS são classificadas em nove tipos e seis subtipos, de acordo com as enzimas deficientes no organismo: MPS I, MPS II, MPS III (MPS III-A, MPS III-B, MPS III-C e MPS III-D); MPS IV (MPS IV -A e MPS IV-B); MPS V; MPS VI; MPS VII; MPS VIII e MPS IX (Tabela 1). Como a maioria dos erros inatos do metabolismo (EIM), as MPS são herdadas de modo autossômico recessivo, com a exceção da MPS II, ou Síndrome de Hunter, na qual a herança é recessiva e está ligada ao cromossomo X, ou seja, afeta todos os homens filhos de mães portadoras, sendo raro em pacientes femininos (VIERA *et. al*, 2008; MUENZER, 2011).

Apesar das diferentes enzimas afetadas, as MPSs são síndromes multi-sistêmicas e progressivas que compartilham manifestações clínicas, tais como organomegalia, malformações ósseas, retardo do crescimento, disfunção cardíaca, disfunção neurológica, entre outras (MUENZER, 2011). Atualmente o diagnóstico de MPS é baseado em diferentes análises (quantitativas e qualitativas) de GAGs em biofluidos (tais como urina e plasma) e pela medida das atividades enzimática (LEHMAN *et. al*, 2011).

**Tabela 1.** Classificação das MPSs.

<b>Patologia</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Enzima deficiente</b>	<b>Gene</b>	<b>GAG afetada</b>
<b>MPS I</b>	Hurler (H)	$\alpha$ -L-iduronidase	<i>IDUA</i> 4p16.3	Dermatan e heparan sulfato
	Huler – Schie (H/S)	$\alpha$ -L-iduronidase		Dermatan e heparan sulfato
	Schie (S)	$\alpha$ -L-iduronidase		Dermatan e heparan sulfato
<b>MPS II</b>	Hunter	Irudonate sulfatase	<i>IDS</i> Xq28	Dermatan e heparan sulfato
<b>MPS III</b>	Sanfilippo A	Heparan-N-sulfatase	<i>SGSH</i> 17q25.3	Heparan sulfato
	Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetylglucosaminidase	<i>NAGLU</i> 17q21	Heparan sulfato
	Sanfilippo C	Heparan acetyl-CoA: $\alpha$ -glucosaminide N-acetyltransferase	<i>HGSNAT</i> 8p.11.1	Heparan sulfato
	Sanfilippo D	N-acetylglucosamine 6-sulfatase	<i>GNS</i> 12q14	Heparan sulfato
<b>MPS IV</b>	Morquio A	Galactose 6-sulfatase	<i>GALNS</i> 16q24.3	Keratan e chondroitin sulfato
	Morquio B	$\beta$ -galactosidase	<i>GLBI</i> 3p21.33	Keratan sulfato
<b>MPS V</b>	A princípio Síndrome Scheie, depois descobriu ser uma deficiência $\alpha$ -L-iduronidase e alélicas a Síndrome de Huler			
<b>MPS VI</b>	Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase B (N-acetylglucosamine 4-sulfatase)	<i>ARSB</i> 5p11-q13	Dermatan sulfato
<b>MPS VII</b>	Sly	$\beta$ -glucuronidase	<i>GUSB</i> 7q21.11	Dermatan, keratan e chondroitin sulfato
<b>MPS VIII</b>	Uma deficiência de glucosamina-6-sulfato foi relatado em um paciente com características clínicas da Síndrome de Morquio e Sanfilippo e atribuído como MPS VIII, mas esse relatório foi posteriormente retraído. O termo MPS VIII não é mais usado			
<b>MPS IX</b>	Natowicz	Hyaluronidase	<i>HYAL</i> 3p21.3	Ácido Hialurônico

**Fonte:** adaptado de COUTINHO *et. al.*, 2011; GUARANY *et. al.*, 2015; MUENZER, 2011.

Ainda não há cura para as MPSs, contudo existem tratamentos para a reposição da enzima deficiente, que retardam a progressão da doença, melhoram as anormalidades sistêmicas e proporcionam uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Evidenciando que as MPS I, II e IV-A e VI são os únicos tipos que atualmente recebem Terapia de Reposição de Enzima – TR. Há tratamentos de suporte, em que os pacientes são acompanhados por diversas especialidades médicas e profissionais da área de reabilitação que visam à melhoria dos sintomas clínicos, manutenção das funções clínicas existentes e orientação aos pacientes e familiares (GUARANY *et. al*, 2015; RIBEIRO, 2013).

A MPS pode ser facilmente detectada por exames clínicos, quando os estágios estiverem avançados, através de um profissional da atenção básica em saúde, mas sua identificação nos estágios iniciais ou em quadros mais brandos ou atípicos é mais difícil, requerendo um conhecimento mais profundo da doença (TURRA *et. al*, 2009).

Mesmo que as MPSs possuem uma série de sintomas conhecidos, diversos autores contestam a dificuldade de diagnosticar, devido "a falta de conhecimento dos profissionais da saúde à respeito da doença" (VIEIRA, 2008).

### 3.7. MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-C

A síndrome de Sanfilippo, conhecida como MPS III, se dá devido a degradação deficiente da GAG sulfato de heparan, por causa da disfunção de quatro enzimas: Heparan N-sulfatase, N-acetilglucosaminidase, acetil-CoA: glicosaminide-acetiltransferase ou N-acetilglucosamina-6-sulfatase, todas relacionadas às MPSs III-A, III-B, III-C, III-D, respectivamente (NEUFELD; MUENZER, 2001; FELDHAMMER *et al*, 2009; LAU *et al*, 2008). Em um nível clínico, os quatro subtipos são bastantes semelhantes, com uma característica da degeneração do sistema nervoso central grave associada com à doença somática leve. O início das características clínicas geralmente ocorre entre 2 e 6 anos, a degeneração neurológica grave ocorre na maioria dos pacientes entre 6 e 10 anos de idade, e a morte ocorre tipicamente durante a segunda e terceira década de vida (COUTINHO *et. al*, 2011).

A Síndrome de Sanfilippo (MSP III-C) foi descrita pela primeira vez em 1976, por Kress e colaboradores, no qual relatou três pacientes com o fenótipo da síndrome e a deficiência de acetilação sulfado de heparan (KLEIN *et. al*, 1978).

Essa síndrome caracteriza-se pelo mesmo quadro clínico MPS III-A, incluindo retardo mental grave com características somáticas relativamente leve, tais como: mão em formato de

garras moderadamente grave e visceromegalia, pouca ou nenhuma opacificação da córnea, pouca ou nenhuma mudança vertebral. Geralmente, esta patologia é caracterizada por hiperatividade acentuada, tendências destrutivas, distúrbios do sono, perda da fala, problemas neuropsiquiátrico, perda da audição e outras anormalidades comportamentais (COUTINHO *et. al*, 2011; MARTINS *et. al*, 2015; PSHEZHETSKY, 2015).

A MPS III-C é uma doença rara autossômica recessiva causada pela deficiência da enzimática da membrana lisossomal do sulfato de heparan, denominada acetil-CoA  $\alpha$ -glucosaminida N-acetiltransferase (HGSNAT). (FELDHAMMER, 2009). O heparan sulfato é um polissacarídeo encontrado em proteoglicanos associados com a membrana celular, em quase todas as células. A enzima da membrana lisossomal, acetil-CoA:  $\alpha$ -glucosaminida N-acetiltransferase é necessário para N-acetilato de glucosamina terminal de resíduos de sulfato de heparan antes da hidrólise do  $\alpha$ -N-acetil glucosaminidase. O substrato de acetil-CoA é rapidamente degradado no lisossoma, N-acetiltransferase emprega um único mecanismo, atuando tanto como enzima e um canal de membrana, e catalisa a acetilação transmembranar do sulfato de heparan (Hřebíček *et. al*, 2006).

Ausseil e colaboradores (2004) confirmaram que o locus do gene da Sanfilippo C está na região pericêntrica do cromossomo 8p11.1 e contém 18 exons. Pshezhetsky (2015) relatou a clonagem do gene HGSNAT mostrando defeitos moleculares em pacientes com MPS III-C em um total de 63 mutações que afetam quase todos os 18 exons e muitos introns do gene dos pacientes.

### 3.8. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A rede MPS Brasil é uma parceria dos centros brasileiros que atendem pacientes com a doença, coordenada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, disponibiliza métodos de diagnósticos para estas patologias em todo território nacional, facilitando assim o melhor conhecimento acerca da prevalência dessas doenças, tendo identificado cerca de 500 novos casos de MPS entre abril de 2004 e abril de 2010 (DORNELLES *et. al*, 2014).

Estudos na Holanda e na Austrália mostraram que a incidência da síndrome de Sanfilippo é de aproximadamente 1 cada 70.000 nascimentos, sendo que MPS III-A é a mais comum no noroeste europeu, MPS III-B, no sudoeste europeu, e MPS III-C e III-D são raros em qualquer lugar. No Brasil, ocorre um subdiagnóstico da MPS III em relação às outras MPSs, podendo ser explicado pelo envolvimento predominante neurológico das MPS III (nas

outras MPSs, o envolvimento físico é mais importante do que na MPS III, o que facilita a suspeita do diagnóstico) (SGM-HCPA, 2011).

A incidência de todas as MPS é estimada em 1 em 25.000 grupos nascidos vivos. Os distúrbios da MPS pertencem a um maior grupo de cerca de 50 doenças hereditárias. Estima-se que doenças de depósito lisossômico ocorrem em cerca de 1 em cada 5.000 a 7.000 nascimentos. MPS III tem uma ocorrência de 1 em 66.000 nascimentos, com a forma IIIC sendo responsável por 1 em 1.407.000 ( The MPS and Related Diseases Society of Australia, 2013).

A MPS-IIIC ocorre cerca de 25% de todos os casos de Sanfilippo, mas a doença tem prevalência mais elevada de natalidade em alguns países, como Portugal e Holanda, onde sua frequência foi estimada como 0,12 e 0,21 por 100,000 nascimentos, respectivamente (PINTO *et. al*, 2004; POOTHUIS *et. al*, 1999). No estado da Paraíba, encontram-se 38% dos pacientes com MPS tipo III-C existentes em todo Brasil, o que corresponde a 8 pacientes em um total de 21 (Rede MPS Brasil, 2012).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular – LGBM da Universidade Estadual da Paraíba, responsável pelas análises moleculares de ancestralidade. Os 7 pacientes (4 homens e três mulheres) com diagnóstico clínico confirmado para Mucopolissacaridose Tipo III-C (síndrome de Sanfilippo) oriundos da Paraíba (Mogero, Alagoa Nova, Cabaceiras, Taperoá e Catolé do Rocha) assinaram um termo de consentimento autorizando a utilização das amostras para pesquisa científica.

### 4.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Todas as amostras dos pacientes utilizadas foram cedidas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 4.3. ANÁLISES MOLECULARES

#### 4.3.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Cada marcador de linhagem (Cromossomo Y) foi amplificado por PCR (Reação em Cadeira de Polimerase). As reações foram realizadas no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). Os iniciadores (primers) estão descritos Hammer *et al.*, 1995; Adaptado de Kamp *et al.*, 2000; Adaptado de Santos *et al.*, 1999; Adaptado de Whitfield *et al.*, 1995; Rothe, 2014. Segue na próxima página um quadro 1 com sequências e tamanhos. Os reagentes (volume final de 12,5) e temperaturas padronizadas, colocados no termociclador (Veriti 96 Thermo Fisher) podem ser vistos no apêndice A.

**Quadro 1.** Marcadores Moleculares Utilizados

<b>Marcador</b>	<b>Sequencias de Primers</b>	<b>Tamanho do Fragmento</b>
YAP	5' CAGGGGAAGATAAAGAAATA 3' 5' ACTGCTAAAAGGGGATGGAT 3'	455pb (YAP+) ou 150pb (YAP-)
12F2	5' CTGACTGATCAAAATGCTTACAGATC 3' 5' TCTTCTAGAATTTCTTCACAGAATT 3'	427pb
DYS1999	5' TAATCAGTCTCCTCCCAGCA 3' 5' AGGTACCAGCTCTTCCCAATT 3'	202pb
SRY-1532	5' TCCTTAGCAACCATTAATCTGG 3' 5' AAATAGCAAAAAATGACACAAGGC 3'	167pb
M343	5' TCTGATTCGCACAAGGCTC 3' 5' CACCTTTGTCCTCTTGCTC 3'	194pb

#### 4.3.2. Análise em Gel de Poliacrilamida

A análise dos produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em cuba vertical com tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089M; Ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) por aproximadamente 120 minutos, com voltagem de 120V e 36 miliAmperes Posteriormente, os géis foram corados com nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Creste *et al.*, (2001).

#### 4.3.3. Análise em Gel de Agarose

Os fragmentos serão separados em gel de agarose a 1% e submetido à diferença de potencial de 120V por 1h30min. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em um Transluminador

#### 4.3.4. Sequenciamento das Amostras

O marcador M343 foi o único a ser sequenciado para que fosse possível conferir a posição da mutação e, por meio disso, definir o haplogrupo das amostras. Primeiramente, as amostras amplificadas foram purificadas utilizando as enzimas hidrolíticas *EXO I*

(Exonuclease I), que tem por função digerir o excesso de primers e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) que é utilizada para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Em seguida, a PCR foi submetida à reação com *Byg Dye Terminator v3.1 CycleSequencing kit*, usando 4,75µl de água ultra pura, 1,75µl de tampão de sequenciamento 5X, 0,5µl de *Dye Terminator*, 0,031µl do primer e 6 µl do produto de PCR. As condições de termociclagem da reação consistiram em 1 minuto a 96°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Em seguida os produtos sequenciados foram purificados por precipitação com EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) e então sequenciados bidirecionalmente em sequenciadores automáticos de DNA: ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer, de 24 capilares.

#### 4.3.5. Tipagem por Análise de *RFLP*

Para a identificação das variações alélicas entre os indivíduos, foi utilizada a enzima de restrição para o marcador *DYS199*, *Mfel*, com alelo ancestral de 202pb, com o alelo moderno 181pb + 21pb e para o marcador *SRY-1532*, *DraIII*, com o alelo ancestral 167pb, com o alelo moderno 112+55pb, ambas as enzimas são do fabricante Fermentas®. Utilizou-se o protocolo previamente padronizado pelo LGBM para as duas enzimas, no qual apresentava 0,5µL de tampão 1X, 0,2 µL da enzima específica, 5 µL de PCR, 4,3 µL de água mili-q, totalizando um produto de 10µl. Sendo incubado em banho-maria a 37°C por aproximadamente 13 horas. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%.

#### 4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICA

Para a verificação da qualidade da sequência foram utilizados o programa Genetic Analyzer 3.0 (Applied Biosystems) e o Sequencing Analysis v.5.1. A formação do *contig* foi dado a partir da utilização do programa computacional *Standen* (pregap4 e gap 4) (BONFIELD *et al.*, 1995) e o alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version*) v.6.0, descrito por Tamura *et al.* (2013). Foi utilizada estatística direta afim de obter as frequências dos haplogrupos analisados.

### 5. RESULTADOS

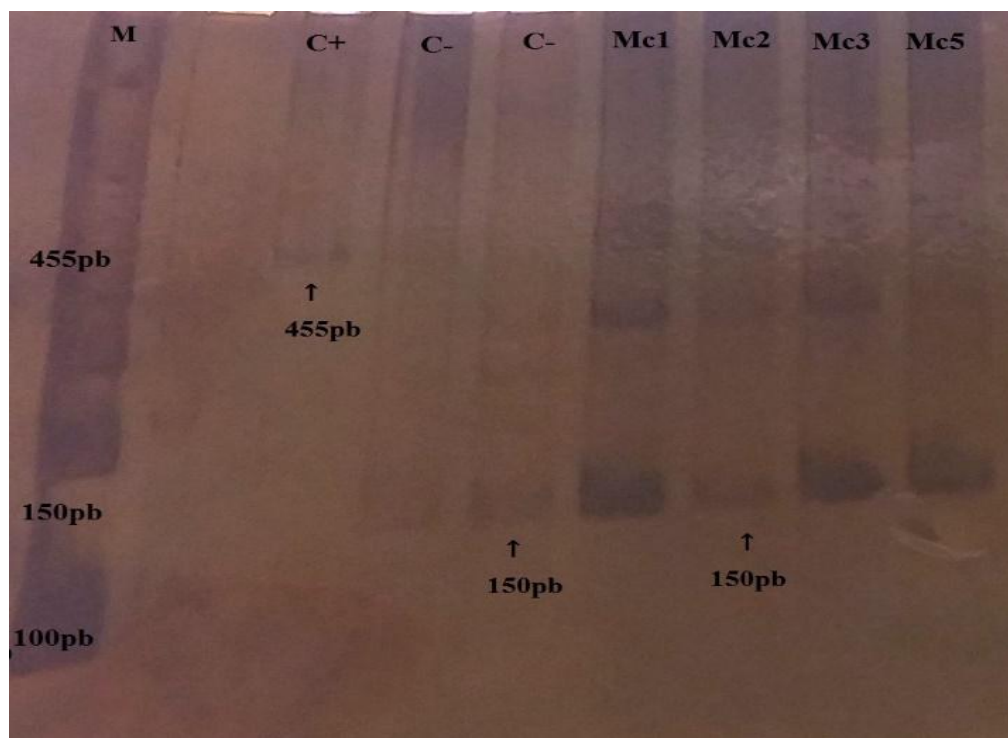


Foram analisados os seguintes marcadores do cromossomo Y: YAP, DYS199, SRY-1532, M343 e 12f2. Dos 7 pacientes apenas 4 foram analisados por serem do sexo masculino. As análises seguiram um padrão hierárquico, as quais, não sendo definido para um determinado haplogrupo, eram direcionadas para os próximos marcadores. Em todas as PCRs foram utilizados controles (positivo e negativo).

### 5.1. ANÁLISE DO MARCADOR YAP

Iniciou-se a genotipagem pelo marcador YAP para a definição do Haplogrupo DE\* (mais frequente na África Subsaariana), no qual, 150pb seria não africano definido como YAP- e 455pb seria africano definido como YAP+. Como pode-se na figura 6 observar todos os pacientes obtiveram um tamanho de 150pb, ou seja, não africano (YAP-) não pertencendo ao haplogrupo DE, como mostra a figura 6

**Figura 6.** Análise do marcador YAP. M (marcador) de 100 pb.; MC1, MC2, MC3, MC5 (pacientes); Br (Branco); C+ (controle positivo); C- (controle negativo).

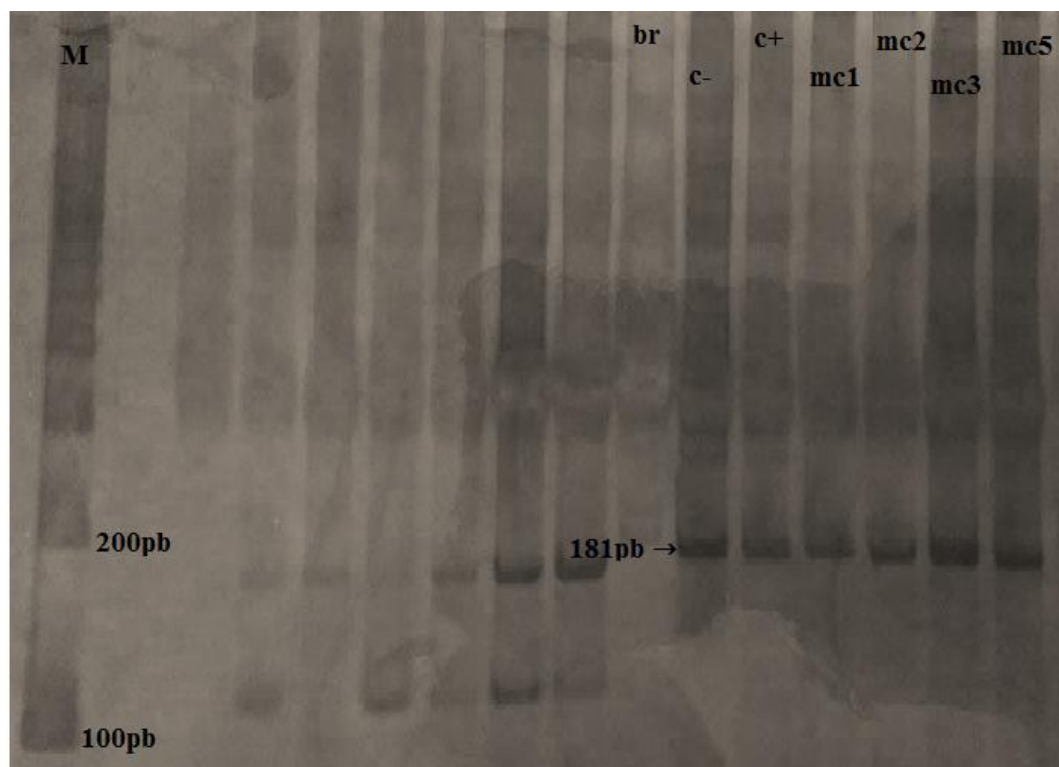


Fonte: Própria.

### 5.2. ANÁLISE DO MARCADOR DYS199

Como todas as amostras foram YAP- passamos para o marcador DYS199, possuindo uma mutação de C → T na posição -199. Utilizando enzima de restrição *MfeI*, para reconhecer o sitio com alelo ancestral C com 181pb + 21pb, com o alelo moderno T com 202pb, definindo o haplogrupo Q3\*, os nativos americanos, ou seja, populações ameríndias. Todos os pacientes possuem o alelo ancestral, ou seja não pertencendo ao haplogrupo Q3, como mostrado na figura 7.

**Figura 7.** Análise do marcador DYS199. M (marcador) de 100 pb.; MC1, MC2, MC3, MC5 (pacientes); Br (Branco); C+ (controle positivo); C- (controle negativo).



Fonte: Própria.

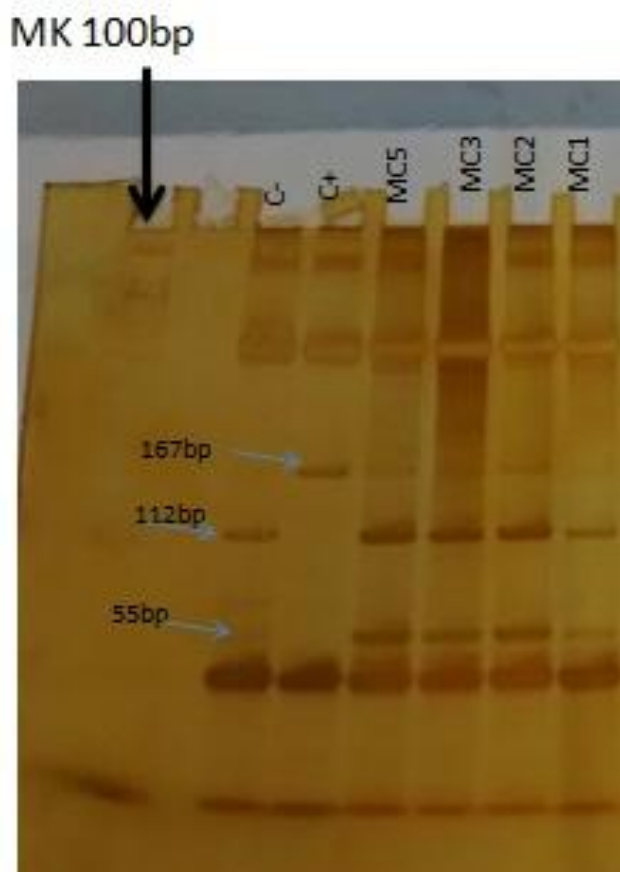
### 5.3. ANÁLISE DO MARCADOR SRY-1532

Definido pela mutação A → G, na posição -1532. Com o alelo A sendo o ancestral com 167pb, Definido o subhaplogrupo R1a, Europa Oriental e o 112+55pb para o alelo G sendo moderno, este é reconhecido pela enzima de restrição *DraIII*, pertencente a qualquer região da Europa, como por exemplo, Europa Ocidental.

Na figura 8, observamos que os pacientes todos tiveram a clivagem na enzima *DraIII* com tamanho 112+55pb, ou seja, todos possuem descendências europeias (por exemplo a

Europa Ocidental), porém não pertencente ao Subhaplogrupo R1a, como observado no C+ com 167pb, pertencente a Europa Oriental.

**Figura 8.** Análise do marcador SRY 1532. MK (marcador) de 100 pb. MC1, MC2, MC3, MC5 (pacientes); Br (Branco); C+ (controle positivo); C- (controle negativo).



Fonte: Própria

#### 5.4. ANÁLISE DO MARCADOR M343

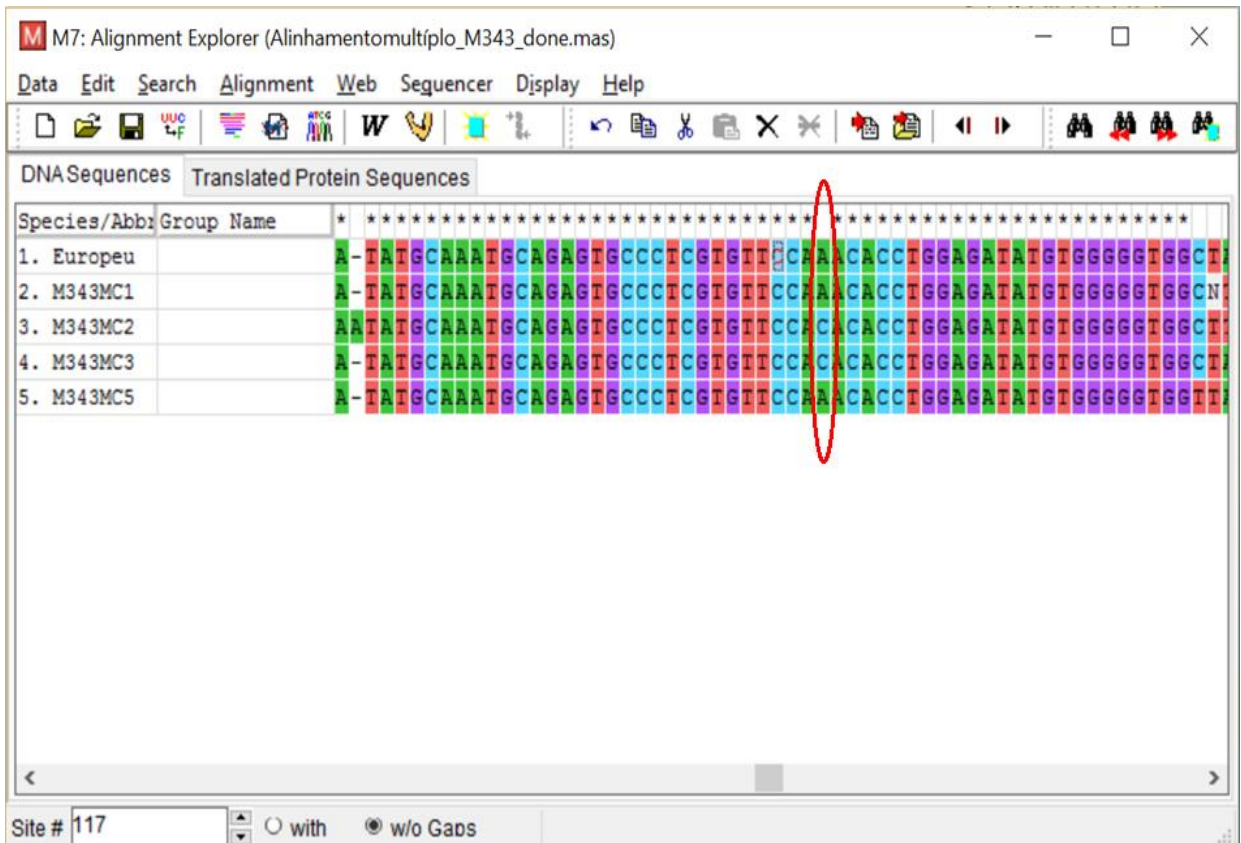
Após a PCR foram amplificados fragmento no tamanho de 194pb, as amostras dos pacientes quanto ao subhaplogrupo R1b foi feita por meio de sequenciamento. O alinhamento da sequência referência europeia (rs9786184) adquirida do banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com as sequências das amostras da pesquisa foi feita no programa Mega6 (TAMURA *et al.*, 2013).

A mutação se encontra na posição 120 do gene. Das 4 amostras sequenciadas, 2 apresentaram o alelo derivado A que define a participação no subhaplogrupo R1b e 2 amostras relataram o alelo ancestral C definido pelo haplogrupo R\*(Figura 9). A confirmação

desses dados também foi feita por meio do alinhamento simples da sequência referência e a amostra em específico no Mega6, além do alinhamento da sequência estudada com demais do Blast no NCBI. Todos os procedimentos confirmaram a presença dos alelos A ou C na posição mencionada.

Os eletroferogramas resultantes do processo de sequenciamento apresentaram no geral nucleotídeos com picos bem estabelecidos, bem como valores de confiança (Phred) superior ou igual a 25 (Anexo B).

**Figura 9.** Alinhamento do marcador M3434 dos pacientes. Em destaque a posição 120.

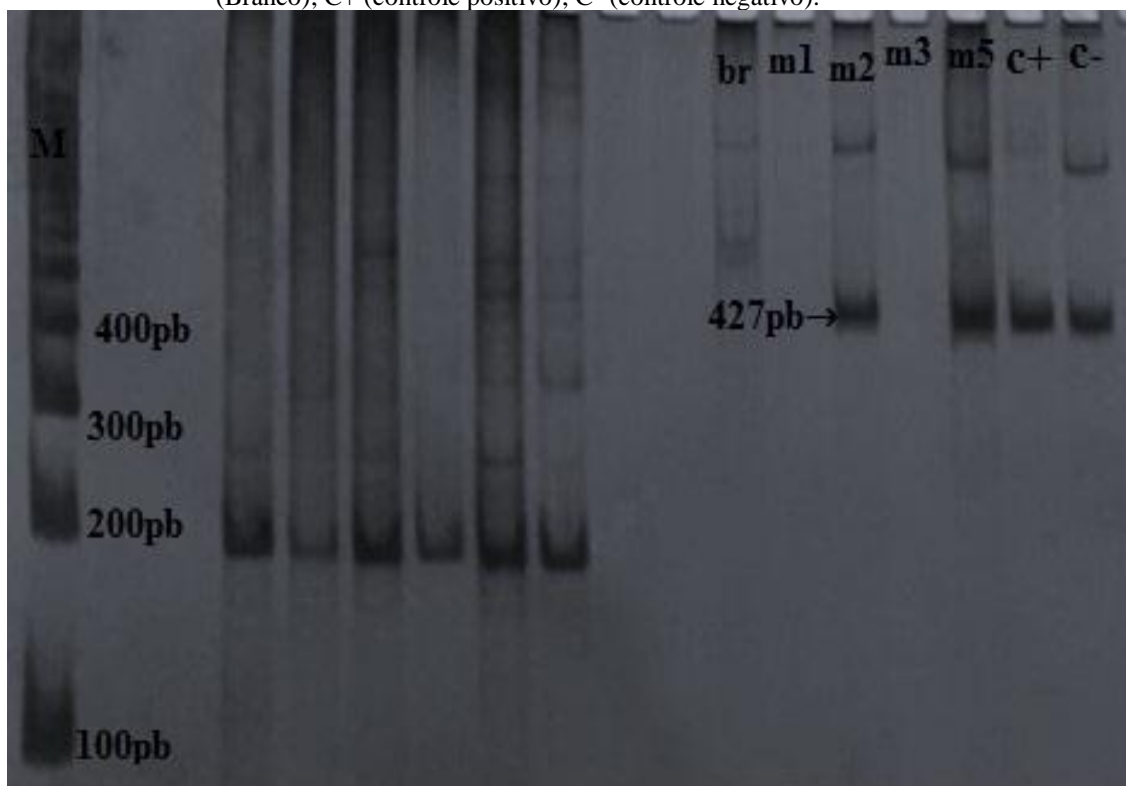


Fonte: Própria.

## 5.5. ANÁLISE DO MARCADOR 12f2

É um marcador do tipo *Indel*, com deleção de 9pb, definindo o haplogrupo J\*. Nenhum paciente dos indivíduos foi pertencente para o haplogrupo. Como mostra a figura 10.

**Figura 10.** Análise do marcador 12f2. M (marcador) de 100 pb.; MC1, MC2, MC3, MC5 (pacientes); Br (Branco); C+ (controle positivo); C- (controle negativo).



Fonte: Própria.

## 5.6. ANÁLISES DOS HAPLOGRUPOS

No Quadro 2 encontra-se todos os resultados das análises dos marcadores e apresenta-se todos os haplótipos, as ancestralidades e os respectivos haplogrupos dos pacientes.

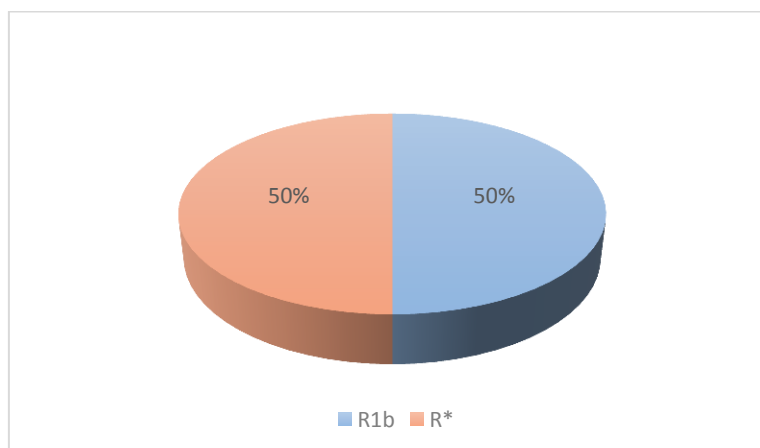
**Quadro 2.** Resultados das Análises dos marcadores.

Pacientes	YAP	DYS199	SRY-1532	M343	12f2	HAPLOGRUPO
-----------	-----	--------	----------	------	------	------------

Mc1	Não Africano (YAP -)	Não Ameríndio (alelo C)	Descendência Europeia (alelo G)	Europeu Ocidental (alelo A)	Não Judeu (sem deleção)	R1b
Mc2	Não Africano (YAP-)	Não Ameríndio (alelo C)	Descendência Europeia (alelo G)	Descendência Europeia (alelo C)	Não Judeu (sem deleção)	R*
Mc3	Não Africano (YAP-)	Não Ameríndio (alelo C)	Descendência Europeia (alelo G)	Descendência Europeia (alelo C)	Não Judeu (sem deleção)	R*
Mc5	Não Africano (YAP-)	Não Ameríndio (alelo C)	Descendência Europeia (alelo G)	Europeu Ocidental (alelo A)	Não Judeu (sem deleção)	R1b

A porcentagem equivalente para cada haplogrupo encontrado está representada no Gráfico 1.

**Gráfico 1:** Porcentagem Equivalente para cada Haplogrupo



Fonte: Própria.

## 6. DISCUSSÃO

Diversos marcadores já foram usados para estimar o grau de miscigenação da população brasileira. Um dos primeiros trabalhos nessa direção foi realizado com migrantes do Nordeste do país, no qual estimou-se 59% de contribuição europeia, 30% de africana e 11% de ameríndia (KRIEGER *et. al.*, 1965). Como já foi mencionado neste trabalho sobre a ancestralidade da MPS-IIIIC, essa distribuição de miscigenação varia de acordo com as diferentes regiões do território brasileiro.

Nos estudos de Santos & Guerreiro (1995), a região do Norte obteve 12% de contribuição africana, 41% ameríndio e 47% europeia. O Rio Grande do Sul observe uma elevada contribuição europeia com 82%, seguida da ameríndia com 11% e da africana com 7% (DORNELLES *et al.*, 1999).

Contudo, uma pesquisa elaborada por Callegari-Jaque e colaboradores (2003) evidenciou a ancestralidade paterna de mil indivíduos em cinco regiões brasileiras diferentes, na qual obteve-se a maior estimativa de 81% de contribuição europeia para a região Sul, em contrates com 68% para a região Nordeste. Ainda nessa pesquisa, foi demonstrado que a região sul apresentou uma menor contribuição africana com 11%, enquanto que as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentaram uma contribuição maior. A contribuição ameríndia foi maior no nordeste com 17% e menor no Sul e Sudeste 7%.

É notório que a contribuição europeia é elevada no Brasil, independente da região estudada, o que não pode-se afirmar em relação às contribuições africana e ameríndia.

A presente pesquisa com os pacientes da MPS III-C obteve 100% de sua ancestralidade com contribuição europeia, apenas revalidando outros estudos apresentados durante o trabalho, na qual durante a colonização do Brasil, ocasionou uma contribuição muito forte do cromossomo Y europeu. Porém, além disso, como todos os pacientes são do estado da Paraíba, que por sua vez foi colonizado primeiramente por franceses e depois por portugueses. Sendo que de acordo com Almeida (1980) os portugueses já tinham uma relação matrimonial com os índios nativos. Afinal as mulheres europeias não eram tão frequentes entre os colonizadores, revalidando a presença da contribuição europeia.

Entende-se que um conjunto de haplótipos, que compartilham um ancestral em comum, designa um haplogrupo. De acordo com Beleza e colaboradores (2006), a população portuguesa é composta por 13% de indivíduos para o haplogrupo E, 5% haplogrupo G, 10% I e J, 1% haplogrupo R1a e 56% para o R1b.

Sabe-se ainda que nos pacientes da respectiva pesquisa, 50% desses foram atribuídos para o haplogrupo R1b, que é frequente na Europa Ocidental, especificamente em Portugal, confirmando assim o domínio português no território paraibano. De acordo com Penna e

colaboradores (2000), as patrilinhagens brasileiras possuem grande contribuição europeia, principalmente ligada aos portugueses. A outra parcela dos pacientes dessa pesquisa foi atribuída ao haplogrupo R\*, definido o continente europeu, a partir dele deriva dois subhaplogrupos, R1a, no qual observou-se ausente no estudo, e R1b a presença desse haplogrupo confirma novamente a contribuição dos europeus na região.

Esse fato pode ser devido que a maior parte das linhagens observadas nas populações contemporâneas europeias caem em seis principais grupos: E, G, I, J, N e R. Normalmente, mais que 50% dos homens na Europa pertencem ao haplogrupo R (MYRES *et. al.*, 2011). Segundo Callegari-Jacques *et. al.*, (1999), dos imigrantes que chegaram ao Brasil entre 1500 e 1978, 58% eram europeus, 40% africanos e 2% asiáticos. O fluxo europeu se intensificou com a abertura dos portos em 1808 até o início do século XX (MACHADO, 2012).

Observou-se também nos pacientes com MPS III-C uma ausência dos haplogrupos DE\* (africanos), Q3\* (ameríndios) mostrando que os africanos deixaram pouca contribuição genética na Paraíba. Segundo Curtin (1969), o Brasil recebeu cerca de quatro milhões de escravos entre 1600 e 1870, e a distribuição dos grupos advindos da África foi bastante heterogênea. Viana-Filho (1988) afirma que o Rio de Janeiro (38%) e a Bahia (25%) receberam os maiores contingentes, seguidos por Pernambuco (13%), São Paulo (12%), Maranhão (7%) e Pará (5%). Na Paraíba, a presença negra foi baixa em comparação aos demais estados nordestinos (FREYRE, 2003). Em 1880 a 1920 ocorreu no país o processo de migração seletiva objetivando o branqueamento da população sendo maioria dos imigrantes europeus provenientes da Itália (SEYFERTH, 1996).

A população ameríndia em vários estudos sobre ancestralidade apresenta-se bastante baixa. Um estudo feito por Carvalho-Silva *et. al.*, (2001) mostraram que de 200 brasileiros auto definidos como brancos de diferentes regiões, demonstrou que 97,5% é de origem europeia, 2,5% são de origem africana e nenhuma de origem ameríndia.

Segundo o IBGE (2000) apenas 0,36% da população no nordeste se declararam nativos americanos.

No estado da Paraíba, os nativos americanos, os potiguaras, devidos a vários conflitos durante a colonização, emigraram para o Rio Grande do Norte, enquanto o outro grupo nativo, tabajaras, por terem uma relação amigável e até mesmo matrimonial, permaneceram no estado (MELLO, 2013).

Enquanto no haplogrupo J não foi observado nenhum descendente, porem como já foi relatado no estudo houve bastante contribuição europeia.



Os dados observados corroboram com os dados históricos em relação à colonização brasileira e paraibana, sendo descritas por serem iniciadas por famílias de portuguesas.

Estudos mostram associações de ancestralidade e determinadas doenças mostrando a existência de risco diferencial de desenvolvimento de algumas doenças dependendo de grupo étnico ou região geográfica, podendo ocorrer associações para doenças (MACHADO, 2012).

A união de pessoas da mesma família, possuindo um mesmo ancestral em comum, é conhecida como casamento consanguíneo (BITTLES, 2001). Esse tipo de acontecimento é um hábito social bastante antigo, cerca de 10,4% dos casamentos de populações mundiais são entre parentes (RAFIEE *et. al*, 2010; BITTLES, 2001).

Esse hábito social é comum no nordeste, como visto na pesquisa de Costa-Motta e colaboradores (2004), que realizaram um estudo sobre a Mucopolissacaridose tipo VI em um município localizado na Bahia, com o objetivo de compreender as influências do efeito fundador, endogamia e consanguinidade, no qual obteve que mais de 1 caso por 5000 nascidos apresentava a doença. Tal estudo mostrou que a grande maioria dos pacientes apresentou a ocorrência de um mesmo alelo em homozigose, no qual observaram que os afetados compartilhavam o mesmo haplótipo, confirmando a origem comum da mutação bem como o parentesco entre os afetados.

Explica-se o fato a MPS III-C ser uma doença autossômica recessiva, pois é um dos principais fatores de casamentos consanguíneos sendo encontrado com maior frequência na Paraíba, no qual, de total 21 pacientes, 8 estão localizados no estado, uma frequência de 38% dos pacientes acompanhados no Brasil.

A MPS VI relatada por Costa-Motta e colaboradores (2004) evidencia o fato de que no Brasil e em Portugal, do qual desse muitos migraram para o território brasileiro, sendo uma frequência maior da MPS VI para as outras. Outros estados do Brasil, como Rio Grande do Norte e Paraíba, existe uma forte tradição de endogamia, em parte devido a geografia e isolamento social (COSTA-MOTA *et. al*, 2004).

## 7. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos pode-se concluir a ancestralidade dos pacientes com MPS-IIIIC condiz com os estudos sobre o cromossomo Y em relação a diversidade da população brasileira e sua colonização. Na qual a ancestralidade europeia permaneceu bem evidente em relação a africana e ameríndia, mesmo contendo um número baixo de pacientes analisados.

Especificamente a ancestralidade ser proveniente da região de Portugal, visto que os pacientes apresentaram 100% distribuição entre os haplogrupos R\* e R1b. Esses resultados confirmam ainda mais os fatos históricos da colonização brasileira e do estado da Paraíba.

Espera-se mais estudos sobre a ancestralidade da doença MPS III-C com espaço amostral maior, visto que não houve disponibilidade das amostras sanguíneas coletadas, no caso de pacientes no sexo feminino, que devem ser oriundas de parentes diretos.

## **REFERÊNCIAS**

ALBUQUERQUE, J. I. S., **Legado Genético do Cromossoma Y Caracterização do haplogrupo J em amostras de origem portuguesa com foco na zona centro**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra, 2014.

AGRAWAAL, S. *et. al.*, YAP, signature of an African–Middle Eastern migration into northern India. **CURRENT SCIENCE**. v. 88, n. 12, 25, 2005.

AUSEEIL, J. *et. al.*, An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC Wbroblasts: A candidate molecule for MPS IIIC. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 87, p. 22–31, 2006.

BARROS, J.E.X.S. **Diversidade haplotípica de microssatélites do cromossomo Y humano na população de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. Universidade Federal de Pernambuco: Recife, 2006.

BENERECETTI, A.S. Origin, diffusion and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean Area. **The American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 1023-1034, 2004.

BLANTON, RE, Silva, LK; Morato, VG; Parrado, AR; Dias, JP; Melo,PRS; Reis,EAG; Goddard, KAB; Nunes, MRT; Rodrigues, SG; Vasconcelos, PFC; Castro, JM; Reis, MG; Barreto, ML and Teixeira, MG. Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. **European Journal of Human Genetics** v. 16, p. 762–765, 2008.

BONFIELD, J.K.; SMITH, K.F.; STADEN R. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 24, p. 4992-4999, 1995.

BORGES-OSÓRIO, MR; ROBINSON, WM. **Genética Humana**. Editora Artmed. v. 2, p. 460, 2001.

BORGES, C. H. S. *et. al.*, Infertilidade masculina decorrente de microdeleções no cromossomo Y. **Sociedade Brasileira de Reprodução Humana**. p. 1413-2087, 2015.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. and SALZANO, FM. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciência Cultura**. v. 51, p. 166-174. 1999.

CAMELIER, M.V de **Diagnóstico de Mucopolissacaridose tipo IVA em Amostras de Sangue Impregnado em Papel Filtro**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, p. 20-30, 2011.

CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M.; PENA, S.D.J. Divergent human Y-chromosome microsatellite evolution rates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, p. 204-214, 1999.

CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **The American Journal of Human Genetics**. v. 68, p. 281-286. 2001.

CHAKRAVARTI, R. Population Genetics – Making Sense Out of Sequence. **Nature Genetics**. v. 21, p. 56-60. 1999.

CHIARONI, J.; UNDERHILL, Peter A.; CAVALLI-SFORZA, Luca L. Y chromosome diversity, human expansion, drift, and cultural evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20174-20179, 2009.

CLARKE, L. A. The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v.10. e.1, 2008.

COUTINHO *et. al.* Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. **Biochemistry Research International**, 2011.

CORACH *et. al.*, Relevant genetic contribution of Amerindian to the extant population of Argentina. **Elsevier B. V.** p. 397-399, 2006.

CRAIG, I. W. *et.al.* The Genetic Basis for Sex Differences in Human Behaviour: Role of the Sex Chromosomes. **Annals of Human Genetics**. v. 68, p. 269-284, 2004.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

CURTIN, P.D. **The Atlantic slave trade: a census**. University of Wisconsin Press, Madison, 1969.

DORNELLES, A. D. *et al.* Enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis Type I among patients followed within the MPS Brazil network. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 23-29, 2014.

FAN, X. *et. al.*, Identification of the Gene Encoding the Enzyme Deficient in Mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo Disease Type C). **The American Journal of Human Genetics**. v. 79, 2006.

FELINTO, M. **Calvinistas no Recife**. Brasil 500 – Folha de S.Paulo Online, 2000.

FELDHAMMER M. *et al.*, Sanfilippo Syndrome Type C: Mutation Spectrum in the Heparan Sulfate Acetyl-CoA:  $\alpha$ -Glucosaminide N-Acetyltransferase (HGSNAT) Gene. **Official Journal Human Genome Variation Society – HGVS**. v. 30, n. 6, p. 918-925, 2009.

FERRÁS, C. *et. al.*, Importância do Estudo das Microdeleções do Cromossoma Y na Infertilidade Masculina. **Acta Urológica**. v. 21, n. 4, p. 17-26, 2004.

FRANCALACCI, P. *et al.*, History and geography of human Y-chromosome in Europe: a SNP perspective. **Journal of Anthropological Sciences**. v. 86, p. 59-89, 2008.

FREYRE, G. **Casa-grande & senzala: formação da família brasileira sob o regime da economia patriarcal**. 481 ed. rev. São Paulo: Global, 2003.

FUTUYMA, D.J. **Evolutionary Biology**. Sinauer, Sunderland, MA. p. 751, 1998.

GUARANY, N. R. *et. al.* Mucopolysaccharidosis: Caregiver Quality of Life. **Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening**, p. 1-7, 2015.

HAMMER, M. F. A recent insertion of an alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 749-761, 1994.

HAMMER, M.F.; HORAI, S. Y chromosomal DNA variation and the peopling of Japan. **The American Journal of Human Genetics**. v. 56, p. 951-962, 1995.

HOLANDA, S.B. **Raizes do Brasil**, Livraria José Olympo Editora, São Paula.

HREBICEK, M. *et. al.*, Mutations in *TMEM76*\* Cause Mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C Syndrome). **The American Journal of Human Genetics**. v. 79, p. 807–819, 2006.

HUNEMEIER, T.; CARVALHO, C.; MARRERO, A.R.; SALZANO, F.M.; PENA, S.D.J.; BORTOLINI, M.C.; Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. **American Journal of Physical Anthropology**, v, 133, p. 854-867, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA - **IBGE**. Rio de Janeiro, 2000. Available at: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)

ISOGG. Disponível em: <Fonte: [http://isogg.org/tree/ISOGG\\_HapgrpR.html](http://isogg.org/tree/ISOGG_HapgrpR.html)>, Acesso em: Junho de 2016.

JIN, H. J. *et. al.*, Y-chromosomal DNA haplogroups and their implications for the dual origins of the Koreans. **Journal of Human Genetics**. v. 114, p. 27–35, 2003.

JOBLING, M. A.; TYLER-SMITH, C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 598-612, 2003.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F.; OTONI, W. C. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 403 - 409, 2009.

KAMP, C.; HIRSCHMANN, P.; VOSS, H.; HUELLEN, K.; VOGT, P.H. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. **Human Molecular Genetics**. v, 12, n. 9, p. 2563-2572, 2000.

KARAFET T, Zegura SL, Vuturo-Brady J, Posukh O, Osipova L, Wiebe V, Romero F, et al. Y chromosome markers and trans-Bering Strait dispersals. **American Journal of Physical Anthropology**. v. 102, p. 301–314, 1997.

KARAFET *et. al.*, New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. **Genome Research**, 2008.

KLEIN U, Kresse H, von Figura K. Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA: a-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. **Proceeding of the National Academy of Sciences**. v. 75, p. 5185–5189, 1978.

KLYOSOV, A. A. et. al. Haplogroup R1a as the Proto Indo-Europeans and the legendary Aryans as witnessed by the DNA of their current descendants. **Advances in Anthropology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2012.

KOK, F. Erros Inatos no Metabolismo. In: Marcondes, Eduardo *et.al.*, **Pediatria básica: pediatria clínica geral**. 9 ed. São Paulo: SAVIER, p. 392-401, 2003

KRAUSZ, C. Y chromosome and male infertility. **Proceedings of the 4th International Workshop 'Molecular Andrology'**. v. 37, p. 219–223, 2005.

KRESS H, Von Figura K, Bartsocas C. Clinical and biochemical findings in a family with Sanfilippo disease, type C. **Clinical Genetics**. v. 10, p. 364, 1976.

KRIEGER, H *et. al.*, Racial Admixture in Northeastern Brazil. **The American Journal of Human Genetics**. v. 29, p. 113-125, 1965.

LAHN, B. T. *et. al.*, Functional Coherence of the Human Y Chromosome. **SCIENCE**. v. 278, 1997.

LARDONE, M.C.; MARENGO, A.; PARADA-BUSTAMANTE, A.; CIFUENTES, L.; PIOTTANTE, A.; EBENSPERGER, M.; VALDEVENITO, R.; CASTRO, A. Greater prevalence of Y chromosome Q1a3a haplogroup in Y-microdeleted Chilean men: a case-control study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 531-538, 2013.

LAU A. A. *et. al.*, Open Field Locomotor Activity and Anxiety-related Behaviors in Mucopolysaccharidosis type IIIA mice. **Behavioural Brain Research** **191**, p. 130-136, 2008.

LELL, J.T.; BROWN, M.D.; SCHURR, T.G.; SUKERNIK, R.I.; STARIKOVSKAYA, Y.B.; TORRONI, A.; MOORE, L.G.; TROUP, G.M.; WALLACE, D.C. Y chromosome polymorphisms in Native American and Siberian populations: identification of Native American Y chromosome haplotypes. **Human Genetics**, v. 100, p. 536-543, 1997.

LEHMAN, T.J.A *et. al.* Diagnosis of the mucopolysaccharidoses, **Rheumatology**, v. 50 p. 41–48, 2011.

LIMA, N. O. **Monitoramento da Excreção de Glicosaminoglicanos em Pacientes com Mucopolissacaridoses Submetidos a Terapia de Reposição Enzimática**. Dissertação. Universidade Federal do Pará, 2009.

MACHADO, T. M. B. et. al. **Migração, estrutura populacional, tipos de casamentos e doenças genéticas em Monte Santo-Ba**. Tese de Doutorado, 2012.

MARTINS, C. *et. al.*, Neuroinflammation, mitochondrial defects and neurodegeneration in mucopolysaccharidosis III type C mouse model. **Brain a Journal of Neurology**. v. 138, p. 336-355, 2015.

MARTINS, T.M.V. **Y-miniSTR: alternativa para a análise de amostras “complicadas” – Estudo da população do Norte de Portugal.** Universidade do Porto: Portugal, 2008.

MARTINS, A. M. **Análise Genético-Histórica de Haplótipos e Haplogrupos do Cromossomo Y Humano no Nordeste Brasileiro.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

MATTE U.S **Caracterização Molecular de Pacientes com Muropolissacaridose tipo I: um estudo no Brasil.** Dissertação (Mestrado). Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998

MELLO, J.O.A. **História da Paraíba: Lutas e resistência.** João Pessoa, 2013.

MELO, José Octávio de Arruda. **História da Paraíba – Lutas e Resistência.** A UNIÃO, ed. 7ª, 2002

MONTEIRO, J.M. As “Raças” Indígenas no Pensamento Brasileiro do Império. In: MAIO, MC & SANTOS, RV (orgs.), **Raça Ciência e Sociedade**, FIOCRUZ/CCBB, p.15-21, 1996.

MORAIS, P.J.S. **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de Cabo Verde residentes em Lisboa.** Eganias Moniz: Portugal, 2013.

MOREIRA *et. al.* Estruturação do Território Municipal Paraibano: na busca das origens. **Cadernos do Lagepa.** v. 2, p. 81-93, 2003.

MUENZER, J. Overview of the mucopolysaccharidoses. **Rheumatology.** v.50, p. 4-12, 2011.

MYRES, N. M. *et. al.*, A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe. **European Journal of Human Genetics.** v. 19, p. 95–101, 2011.

NASCIMENTO, D. Q. **Ancestralidade Paterna de Pacientes com muropolissacaridose Tipo IV-A no Estado da Paraíba.** Dissertação (Graduação). Universidade Estadual da Paraíba, 2016.

NEUFELD, E.F., MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases**, p. 3412-3452, 2001.

OLIVEIRA, R.C. **GENEALOGIA GENÉTICA E CIÊNCIAS SOCIAIS. UM ESTUDO DE CASO DA ILHA TERCEIRA, AÇORES, PORTUGAL.** Universidade do Pará, 2011.

PAGE *et. al.*, Single-copy sequence hybridizes to polymorphic and homologous loci on human X and Y chromosomes. **Proceeding of the National Academic of Sciences.** v. 79, p. 5352-5356, 1982.

PEDROSA, M. A. F. **Composição Genética de Quatro Populações Remanescentes de Quilombos do Brasil com Base em Microsatélites e Marcadores de Ancestralidade.** Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, 2006.

PENA, S. D. J. *et. al.* Retrato molecular do Brasil. **Ciência hoje**, v. 27, n. 159, p. 16-25, 2000.

PENA, S. D. J. **Homo Brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro**. FUNPEC-RP, 2002.

PENA SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More. **Uniform Than Expected**. v. 6, n. 2, p. 1706, 2011.

PINTO R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. **European Journal of Human Genetics**; v. 12, p. 87–92, 2004

POORTHUIS BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. **Journal of Human Genetics**; v. 105, p. 151–6, 1999.

PSHEZHETSKY, A. Crosstalk between 2 organelles: Lysosomal storage of heparin sulfate causes mitochondrial defects and neuronal death in mucopolysaccharidosis III type C. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v.3, n. 1, p. 1049793-1-1049793-7, 2015.

QUINTANA-MURCI, L.; KRAUSZ, C.; ZERJAL, T.; SAYAR, S.H.; HAMMER, M.F.; MEHDI, S.Q.; AYUB, Q.; QAMAR, R.; MOHYUDDIN, A.; RADHAKRISHNA, U.; JOBLING, M.A.; TYLER-SMITH, C.; MCELREAVEY, K. Y-chromosome lineages trace diffusion of people and languages in southwestern Asia. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 537-542, 2001.

RAMANA, G., SINGH, L.; CHAKRABORTY, R.; The SRY of human Y chromosome is subject to recurrent single nucleotide mutation. **Human Biology**, v. 73, n. 1, p. 71-80, 2001.

REBELO, M.L.P. **Aplicação do estudo de polimorfismos do cromossomo Y em genética forense Y-STRs e marcadores bialélicos**. Universidade do Porto: ICBAS, 2003.

REDE MPS Brasil, 2012. Rede de Mucopolissacaridose Brasil. Em <[www.ufrgs.br/redempsbrasil](http://www.ufrgs.br/redempsbrasil)>. Acesso: 20 Março 2016.

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil**. São Paulo: Companhia das Letras. p 476, 1995.

RIBEIRO, P. C, **O Sujeito na Mucopolissacaridose: Uma Análise Discursiva**. Dissertação (Mestrado) Universidade Católica de Pernambuco, 2013.

ROTHER, J. **Establishment of a Y-chromosome specific extraction method for the separation of Y-chromosomal haplotypes from male DNA mixtures**. Tese de Doutorado. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, 2014.

SANCHEZ et al., Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. **Ergon, C/ Arboleda**, v. 1, n. 28220, p. 621-629, 2006.

SANTANA, P.M, Lesmucopolissacaridosis The mucopolysaccharidosis. **Children Nutrition**. v. 31, n. 1, p. 8-15, 2004.



SANTOS, R.V.; BORTOLINI, M.C.; MAIO, M.C. No fio da navalha: raça, genética e identidades. **Revista USP**. São Paulo, n. 86, p. 22-35, 2006.

SANTOS, F. R.; BONATTO, S. L. Genética de populações humanas. Mir L, organizador editorial. **Genômica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

SANTOS, F.R.; PANDYA, A.; TYLER-SMITH, C.; PENA, S.D.J.; SCHANFIELD, M.; LEONARD, W.R.; OSIPOVA, L.; CRAWFORD, M.H.; MITCHELL, R.J. The central Siberian origin for native american Y chromosomes. **The American Journal of Human Genetics**, v.64, p. 619-628. Fevereiro, 1999.

SEMINO, O.; MAGRI, C.; BENUZZI, G.; LIN, A.A.; AL-ZAHERY, N.; BATTAGLIA, V.; MACCIONI, L.; TRIANTAPHYLLIDIS, C.; SHEN, P.; OEFNER, P.J.; ZHIVOTOVSKY, L.A.; KING, R.; TORRONI, A.; CAVALLI-SFORZA, L.L.; UNDERHILL, P.A.; SANTACHIARA-ROSSER, Z. H. *et. al.*, Y-Chromosomal Diversity in Europe Is Clinal and Influenced Primarily by Geography, Rather than by Language. **The American Journal of Human Genetics**. v. 67, p. 1526–1543, 2000.

SEYFERTH, G. Construindo a Nação: Hierarquias Raciais e o Papel do Racismo na Política de Imigração e Colonização. In: MAIO, M.C. & SANTOS, R.V. (orgs.), **Raça Ciência e Sociedade**. Rio de Janeiro, FIOCRUZ/CCBB. p. 41-58, 1996.

SILVA, W.A. JR.; BONATTO, S.L.; HOLANDA, A.J.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; PAIXAO, B.M.; GOLDMAN, G.H.; ABE-SANDES, K.; RODRIGUEZ-DELFIN L; BARBOSA, M.; PACO-LARSON, M.L.; PETZL-ERLER, M.L.; VALENTE, V.; SANTOS, S.E.; ZAGO, M.A. Mitochondrial genome diversity of native americans supports a single early entry of founder populations into America. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 1, p.187-92, 2002.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TILFORD, C. A. *et. al.*, A physical map of the human Y Chromosome. **Nature**. v. 409, 2001.

TURRA G. S. *et. al.*, Evaluation of orofacial motricity in patients with mucopolysaccharidosis: a cross-sectional study. **Jornal de Pediatria**. v. 85, n. 3, p. 254-260, 2009.

UNDERHILL, P. A. *et. al.* A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. **Proceedings of the national Academy of sciences**, v. 93, n. 1, p. 196-200, 1996.

UFPB. **Atlas Geográfico da Paraíba**. João Pessoa: Imprensa Universitária, 1965.

VIEIRA, T; SCHWARTZ, I; MUÑOZ, V. Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From Birth to Biochemical Diagnosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 146, p. 1741–1747, 2008.

WATKINS, W.S.; RICKER, C.E.; BAMSHAD, M.J.; CARROLL, M.L.; NGUYEN, S.V.; BATZER, M.A.; HARPENDING, H.C.; ROGERS, A.R.; JORDE, L.B. Patterns of ancestral human diversity: an analysis of Alu-insertion and restriction-site polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 3, p.738-52, 2000.

WHITFIELD, L.S.; SULSTON, J.E.; GOODFELLOW, P.N. Sequence variation of the human Y chromosome. **Nature**, n. 378, p. 379-380, 1995.

WRAITH, JE. The Mucopolysaccharidoses: a Clinicalreviewandguideto Management. **Archives of Disease in Childhood**. v. 72, p. 263-267, 1995.

YCC. Y CHROMOSOME CONSORTIUM et al. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. **Genome research**, v. 12, n. 2, p. 339-348, 2008.

## ANEXO A – Reagentes e Temperaturas Padronizadas

**YAP:** desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 51°C por 1 min, e elongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 5 min. Foi utilizado: Tampão IB (KAPA) 10x; 0,2 mM de dNTPs; 0,12 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase (KAPA) e 20-50 η g de DNA genômico.

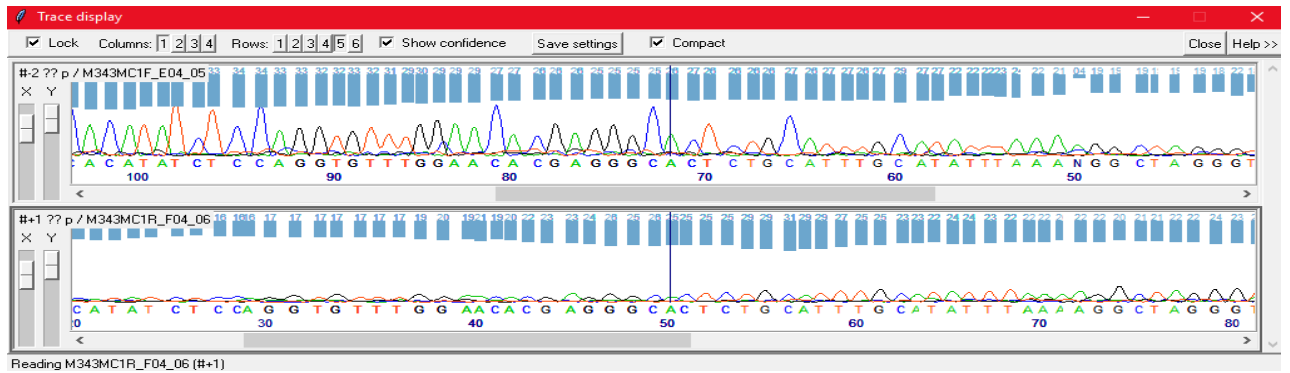
**SRY1532:** desnaturação inicial a 95°C por 10 min; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 56°C por 20s, e elongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 1 min. Foi utilizado: Tampão IIC (KAPA); 0,2 mM de dNTPs; 0,5 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase (KAPA) e 20-50 η g de DNA genômico.

**DYS199 e 12F2:** desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 61°C por 1 min, e elongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi utilizado: Tampão IB; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase (KAPA) e 20-50 η g de DNA genômico.

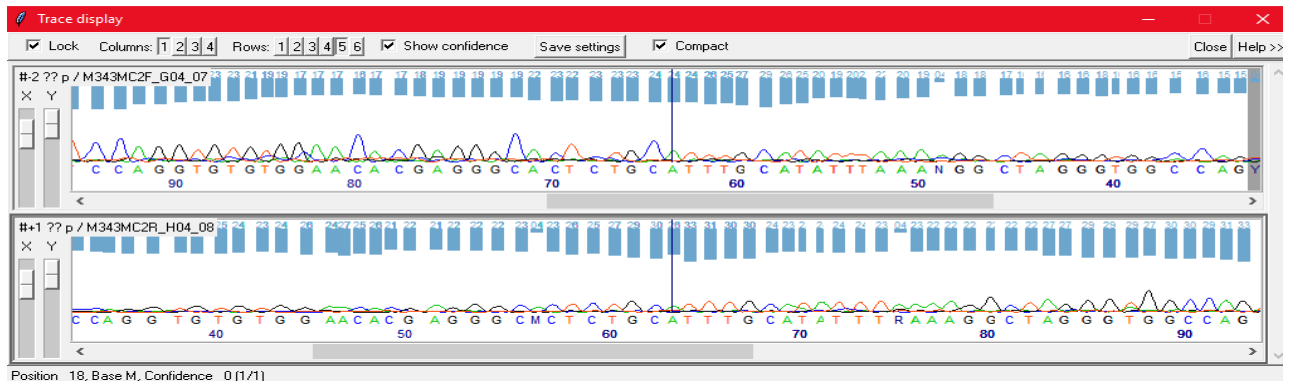
**M343:** desnaturação inicial a 95°C para 5 minutos; seguida por 35 ciclos de: 94°C para 30 segundos, 50°C para 30 segundos, 72°C para 1 minuto de anelamento e uma extensão final de 72°C para 5 minutos. Foi utilizado de 1-2μL de DNA, dependendo da amostra, 0,25 mM de dNTP, 1,15 mM de Tampão IB (KAPA) 10x, 0,8μM de cada iniciador, 1U de Taq DNA Polimerase (KAPA).

**ANEXO B – Cromatogramas de todos os indivíduos analisados, bem como seus valores de confiança (Phred) respectivos.**

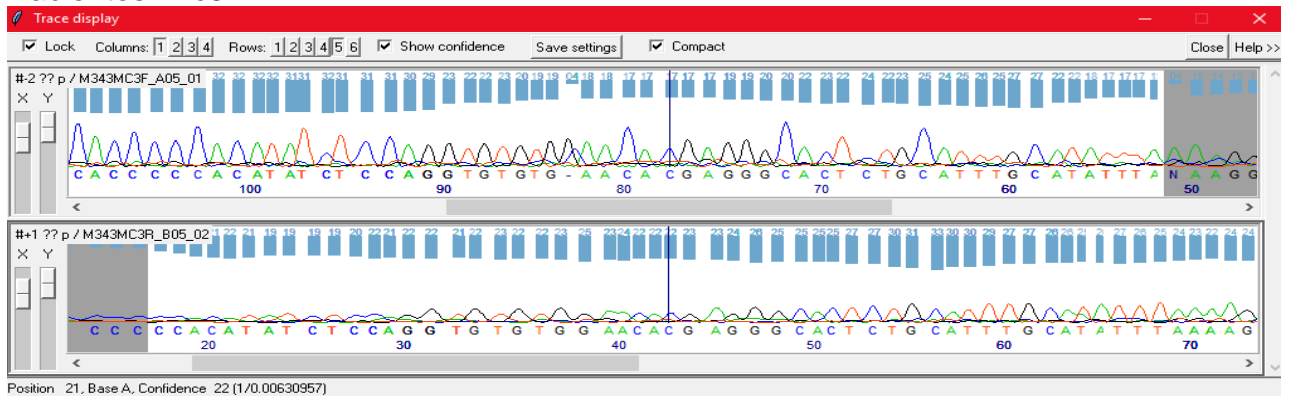
**Pacientes: Mc1**



**Pacientes: Mc2**



**Pacientes: Mc3**



### Pacientes: Mc4

