



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE-CCBS  
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JESSICA MARIA FLORENCIO DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL DE PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A NO ESTADO DA PARAÍBA**

**Campina Grande-PB**

**2015**

**JESSICA MARIA FLORENCIO DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL DE PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A NO ESTADO DA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Simone Silva dos Santos Lopes

**Campina Grande – PB**

**2015**

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.

O48a Oliveira, Jessica Maria Florencio de.  
Análise do DNA mitocondrial de pacientes com  
Mucopolissacaridose tipo IV-A no Estado da Paraíba [manuscrito]  
/ Jessica Maria Florencio de Oliveira. - 2015.  
44 p. : il. color.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de  
Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.  
"Orientação: Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes,  
Departamento de Ciências Biológicas".

1. Síndrome de Morquio. 2. Ancestralidade materna. 3.  
Genética. 4. DNA. I. Título.

21. ed. CDD 616.042

**JESSICA MARIA FLORENCIO DE OLIVEIRA**

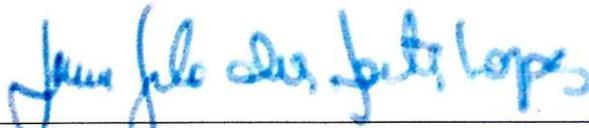
**ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL DE PACIENTES COM  
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A NO ESTADO DA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética Médica Populacional

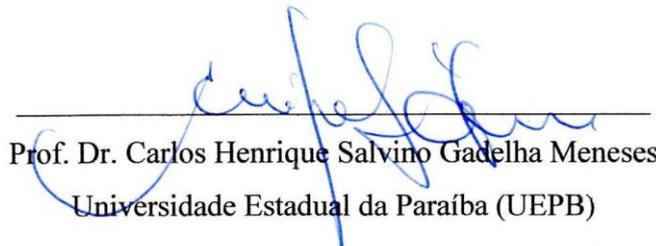
Aprovado em: 03/12/2015.

**BANCA EXAMINADORA**



Profª. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dra. Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

*A minha eterna amiga, admiradora e mãe Maria  
Aparecida (In memoriam). Meu anjo da guarda sei  
que há de estar muito orgulhosa pelo meu sucesso  
que também é seu*

*DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

*A Universidade Estadual da Paraíba, instituição que devo imensa gratidão por toda minha formação acadêmica e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro.*

*A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, pelas oportunidades oferecidas, pelo apoio, por todo conhecimento compartilhado e total confiança em mim.*

*A Dra. Paula Frassinetti pela colaboração.*

*Aos pacientes e familiares pela colaboração.*

*Ao Senhor, pela capacitação proporcionada ao longo da minha vida acadêmica. A Ti agradeço a sabedoria e paciência durante a realização desta pesquisa, mostrando que eu posso ir além.*

*A minha família (Florêncio), meu porto seguro e profundo alicerce, que sempre torceu pelo meu sucesso pessoal e profissional e fazem parte desta conquista. Aos meus pais Maria Aparecida e Manoel do Carmo pela educação ensinada, por sempre colocarem meus sonhos acima dos seus e pela indicação dos bons caminhos mostrando que o conhecimento é o bem mais valioso. E aos meus Irmãos Jefferson e Jonathan pela verdadeira amizade que cultivamos e por estarmos sempre juntos, somos um só coração. Ao meu avô João Morais.*

*A Rafael, pelo companheirismo, por sempre apoiar os meus ideais e por me fazer acreditar e lutar pelos meus objetivos; obrigada pelo incentivo, ao seu modo, sempre. Amo você.*

*Agradeço a todos que de alguma forma me auxiliaram a galgar mais um grande degrau em minha vida. As minhas tias (Socorro, Rosário, Margarida e Joelma), pelo amor maternal. A Luciana, Reninha, Sarah e Luana por serem minha segunda família e por me acolherem bem. As minhas amigas e companheiras de curso que constituem a turma mais linda da UEPB, por compartilhar momentos incríveis e inesquecíveis ao longo desta caminhada. Especialmente à Anna Brazilina, Andreza Cantalice e Geilza Carla, irmãs de coração que a Biologia me presenteou e nem mesmo a força do tempo irá destruir nossa amizade; amigas poderosas.*

*A todos do laboratório LGBM, sou orgulhosa de fazer parte da equipe BIOMOL. Agradeço a Anna por ter sido o meu guia e ter me envolvido ainda mais na área de genética ao me apresentar o estágio, amiga que carrego sempre no coração e que sou grata pelas inúmeras caronas! A Patrícia, pela interminável paciência, pelos ensinamentos que me proporcionaram experiência necessária para realização deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade. E as queridas Yanne e Denise, pelos bons momentos dentro do laboratório.*

*A banca examinadora pela gentileza e disponibilidade concedida a este trabalho.*

## RESUMO

A Mucopolissacaridose tipo IVA é uma doença rara de depósito lisossômico causada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase, levando ao acúmulo multissistêmico de glicosaminoglicanos nos lisossomos. As mitocôndrias são organelas semiautônomas que possuem o próprio material genético com características particulares, tais como uma alta taxa evolutiva, um alto número de cópias por célula e a ausência de recombinação, que permitem a aplicação do mesmo como marcador genético para identificar a ancestralidade materna e na reconstrução da origem e evolução populacional. Este trabalho teve como objetivo analisar a ancestralidade materna dos pacientes diagnosticados com MPS-IVA da Paraíba e verificar a origem da mutação compartilhada entre os pacientes do estado da Paraíba. Para isto as regiões hipervariáveis I e II do DNA mt de 20 pacientes foi amplificada e sequenciada utilizando dois pares de iniciadores (L15997/H17 e L16555/H599). Foi identificado um total de 73 *loci* polimórficos na região controle do DNA mt e 17 haplótipos distintos, sendo 3 compartilhados. Os haplogrupos foram classificados de acordo com o conjunto de polimorfismos através do software HaploGrep. Os resultados demonstraram diferentes linhagens maternas nos pacientes com MPA IVA, com a distribuição de 70%, 15% e 15% de ancestralidades maternas europeia, africana e ameríndia, respectivamente. Observa-se uma frequência elevada de linhagens ancestrais maternas europeias nos pacientes, em comparação com dados para o Brasil e a região Nordeste. As linhagens europeias foram representadas pelos haplogrupos HV0 (45%), U (15%), o H (5%) e o T (5%). A contribuição europeia encontrada corrobora com os dados históricos da ocupação populacional da Paraíba, onde se consta que famílias de origem portuguesa com forte tradição de uniões consanguíneas foram as principais colonizadoras da região. A mutação compartilhada entre 63% dos pacientes com MPS IVA da Paraíba tem origem europeia. A prevalência elevada da MPS IVA no estado da Paraíba sugere uma forte evidência para o efeito fundador, visto que os haplótipos que caracterizam as linhagens maternas europeias nos pacientes podem ter sido introduzidos na região através de processos migratórios anteriores.

**Palavras-Chave:** Ancestralidade materna, mutação GALNS, síndrome de Morquio A.

## ABSTRACT

### ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA OF PATIENTES WITH MUCOPOLYSACCHARIDOSIS IV-A TYPE IN THE STATE OF PARAÍBA

The type IVA Mucopolysaccharidosis is a rare lysosomal storage disease caused by deficiency of N-acetylgalactosamine-6-sulfatase enzyme, leading to multi-systemic accumulation of glycosaminoglycans in the lysosomes. Mitochondria are semi-autonomous organelles that have their own genetic material with particular characteristics such as a high rate of evolution, a high number of copies per cell, and the absence of recombination, allowing their application as a genetic marker to identify maternal ancestry and the reconstruction of the origin and evolution population. This study aimed to analyze the maternal ancestry of diagnosed patients with MPS-IVA of Paraíba and verify the origin of the shared mutation among patients the state of Paraíba. For this, the hypervariable regions I and II of mtDNA from 20 patients was amplified and sequenced using two pairs of primers (L15997 / L16555 and H17 / H599). It was identified a total of 73 polymorphic loci in the control region of mtDNA and 17 different haplotypes, which three are shared. The haplogroups were ranked according to the set of polymorphisms through HaploGrep software. The results showed different maternal lineages in patients with MPS IVA, with a distribution of 70%, 15% and 15% of European, African and Amerindian maternal ancestralities, respectively. We observed a high frequency of European maternal ancestral lineages in the patients compared to data for Brazil and the Northeast region. European lineages were represented by haplogroups HV0 (45%), U (15%), H (5%) and T (5%). The European contribution is congruent with the historical data of the population occupation of Paraíba, where families of Portuguese origin with a strong tradition of consanguineous unions were the main colonizing the region. The shared mutation among 63% of patients with MPS IVA of Paraíba has European origin. The high prevalence of MPS IVA in the state of Paraíba suggests a strong evidence for the founder effect, since the haplotypes that characterize the European maternal lineages in patients may have been introduced in the region through earlier immigration processes.

**Keywords:** Maternal ancestry, mutation GALNS, Morquio A syndrome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Mapa do genoma mitocondrial humano com destaque para região controle.....	17
<b>Figura 2</b> –Migrações Humanas a partir de estudos do DNA mitocondrial e respectiva distribuição geográfica mundial de haplogrupos.....	20
<b>Figura 3</b> – Proporção de distintas ancestralidades maternas do DNAMt nos pacientes com MPS-IVA da Paraíba. ....	26
<b>Figura 4</b> – Ocorrência das ancestralidades maternas europeias, africanas e ameríndias nas Mesorregiões da Paraíba.....	27
<b>Figura 5</b> – Distribuição geográfica dos haplogrupos de DNAMt no mundo e nos pacientes com MPS IVA da Paraíba. ....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASPAMPS	Associação dos Portadores de Mucopolissacaridoses
CRS	<i>CambridgeReferenceSequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge)
D-loop	<i>displacement loop</i> (Laço de deslocamento)
DLN	Doença Lisossômica de Depósito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Desoxinucleotídeotri-fosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIM	Erros inatos do metabolismo
EXO I	Exonuclease I
GAG	Glicosaminoglicanos
GALNS	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase
HVRI	Região hipervariável I
HVRII	Região hipervariável II
HVRIII	Região hipervariável III
HUAC	Hospital Universitário Alcides Carneiro
MPS	Mucopolissacaridoses
MPS IVA	Mucopolissacaridose tipo IVA
MPS IVB	Mucopolissacaridose tipo IVB
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
rCRS	<i>Revised Cambridge ReferenceSequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge revista)
RNA	Ácido ribonucleico
SAP	<i>ShrimpAlkalinePhosphatase</i>
TRE	Terapia de reposição enzimática

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	12
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	25
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	377
<b>APÊNDICE A – Haplótipos do DNAmT identificados nos pacientes com MPS IVA da Paraíba.</b> .....	44

## 1. INTRODUÇÃO

A Mucopolissacaridose tipo IVA ou Síndrome de Morquio A é uma doença hereditária autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (GALNS), levando ao acúmulo multissistêmico e progressivo deglicosaminoglicanos sulfato de queratan e condroitina-6-sulfato nos lisossomos, que comprometem a estrutura e função celular (VIEIRA et al., 2008). Os dados epidemiológicos exatos da Síndrome de Morquio são escassos e a distribuição mundial desse distúrbio é bastante variável, com a incidência oscilando para a MPS IVA de 1: 76.000 nascidos vivos na Irlanda do Norte (NELSON, 1997) até 1: 450.000 em Portugal (PINTO et al., 2004).

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e semiautônomas. O caráter haploide do genoma mitocondrial é devido ao seu modo de herança uniparental materna, de modo que os diferentes tipos de DNAmtocondrial são resultantes da ocorrência de mutações. Estas mutações genéticas detectados no DNAmto ao longo da evolução geram as variações ('polimorfismos') que servem como marcadores de linhagens para identificar a ancestralidade materna e na reconstrução da origem e evolução populacional.

O acúmulo de mutações na sequência de DNAmto de indivíduos de uma mesma linhagem materna ao longo de gerações contínuas reflete a sua alta taxa evolutiva. E as diferenças observadas entre as sequências de DNAmto devido à presença de mutações levou à constituição dos haplótipos ao longo da evolução humana, que se refere ao conjunto de polimorfismos presentes na sequência de DNAmto, e quando agrupados definem haplogrupos específicos derivados da mesma molécula ancestral (MAGALHÃES; SILVA, 2006).

Segundo a Associação dos Portadores de Mucopolissacaridoses do Estado da Paraíba (ASPAMPS/PB) (2010) e a Rede de MPS do Brasil (2015), o estado brasileiro que tem a maior quantidade de casos diagnosticados para MPS IVA é a Paraíba. Logo, a realização deste estudo teve como objetivo investigar se os pacientes com MPSIVA da PB possuem a mesma ancestralidade materna, uma vez que a maioria destes indivíduos é proveniente da mesma mesorregião-Borborema, e identificar a origem populacional da mutação.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS) constituem um grupo heterogêneo de doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pelo funcionamento inadequado e/ou ausência de enzimas lisossomais que são necessárias para hidrólise de moléculas denominadas de glicosaminoglicanos (GAGs), anteriormente chamadas de mucopolissacarídeos. Uma vez não degradados, os GAGs são estocados em compartimentos lisossômicos celulares e, portanto, são referidas como doenças lisossômicas de depósito (DLD), que promovem o comprometimento da estrutura e função celular e orgânica, resultando em um amplo espectro de manifestações clínicas que são progressivas e multissistêmicas (VIEIRA et al., 2008).

O primeiro caso de MPS foi descrito em 1917 pelo médico Dr. Charles Hunter em Manitoba no Canadá, porém as bases bioquímicas só foram elucidadas entre as décadas de 50 e 60, e apenas posteriormente as bases moleculares e os subtipos foram identificados (WRAITH, 1955).

As MPS são classificadas a partir de onze defeitos enzimáticos lisossomais que causam sete diferentes tipos e subtipos de MPS, levando ao acúmulo de GAG como heparan sulfato, dermatan sulfato, sulfato de queratan, condroitina sulfato e ácido hialurônico, no qual estes variam de acordo com as atividades deficientes de cada uma das enzimas específicas. Tal fato ocorre devido a mutações presentes em genes que codificam as enzimas envolvidas no processo de degradação dos GAGs, que pode ser interrompida de forma isolada ou combinada dependendo da enzima deficiente e, conseqüentemente o acúmulo dos mesmos nos lisossomos acarreta a excreção desses substratos de forma elevada na urina (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Todos os tipos de MPS são doenças de herança autossômica recessiva, com exceção da MPS II que apresenta uma herança ligada ao cromossomo X. As MPS são doenças hereditárias caracterizadas por apresentação clínica multissistêmica, incluindo macroglossia, dentição anormal, opacificação das córneas, retinopatia, disostose ósseas, déficit auditivo, cardiopatia, infecções respiratórias recorrentes, hepatoesplenomegalia, hérnias inguinais e abdominais, mão de garra e face grosseira que compõem uma ampla heterogeneidade clínica, inclusive para uma mesma deficiência enzimática (NEUFELD; MUENZER, 2001).

As MPS são doenças genéticas com incidência mundial diversificada entre 1,9 a 4,5: 100.000 nascidos vivos (APPLEGARTH et al., 2000; BAEHNER et al., 2005; MEIKLE

et al.,1999; NELSON et al., 2003; POORTHUIS et al., 1999). A rede MPS Brasil, com centro coordenador localizado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, apresenta em seus registros 1001 pacientes brasileiros diagnosticados com algum tipo de MPS até dezembro de 2012, sendo 195 com MPS I, 300 com MPS II, 137 com MPS III (38 com MPS IIIA, 70 com MPS IIIB, 29 com MPS IIID), 124 com MPS IV (116 com MPS IVA e 8 com MPS IVB), 233 com MPS VI e 12 com MPS VII (BOCHERNITSAN, 2013).

## **2.2 Mucopolissacaridose tipo IV**

A Mucopolissacaridose tipo IV ou Síndrome de Morquio é uma doença de herança autossômica recessiva descrita em 1929 por Luis Morquio o Uruguais e simultaneamente pelo radiologista James Brailsford na Inglaterra, por isso também é conhecida como síndrome de Morquio-Brailsford (LANKESTER et al., 2006).

A síndrome de Morquio, assim como as demais MPS, é definida como uma doença lisossômica, inclusa no grupo de erros inatos do metabolismo (EIM), cuja etiologia é devido a deficiência hereditária de enzimas específicas que estão envolvidas no processo de degradação dos GAGs e, por consequente, promove o bloqueio da via metabólica envolvida de modo que tais macromoléculas não são removidas. Isto é, acumulam-se no lisossomo resultando em disfunção da célula, tecido e do órgão, levando à apoptose e liberação de tais substratos nos conteúdos extracelulares que podem, por sua vez, serem detectados na urina (PLATT et al., 2012).

Os glicosaminoglicanos são polímeros lineares não ramificados constituídos por unidades repetitivas de dissacarídeos, um dos quais tem sempre um radical açúcar aminado e o outro um açúcar ácido. Estes estão presentes nas superfícies das membranas plasmáticas, bem como compõem a matriz extracelular e estão associados, com exceção do ácido hialurônico, covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanos, permitindo assim a estabilidade da estrutura celular. Além disso, os GAGs participam de outros processos biológicos, tais como a rápida difusão de nutrientes e metabólitos entre o sangue e as células do tecido, lubrificação de espaços intercelulares, adesão celular, crescimento e diferenciação celular. E de acordo com o resíduo de açúcar, o tipo de ligação entre os resíduos de açúcar e o número e localização dos grupamentos sulfatos, são classificados quatro principais grupos de GAGs: ácido hialurônico, condroitin sulfato e dermatan sulfato, heparan sulfato e sulfato de queratan (ALBERTS et al., 2010; GANDHI; MANCERA, 2008).

A degradação dos GAGs ocorre primeiramente pelo processo de fagocitose e posteriormente por clivagens intralisossomais, sendo estas iniciadas pela atividade das endoglicosidases e em seguida os oligossacarídeos são degradados sequencialmente, a partir da extremidade não-redutora da cadeia, através de hidrolases ácidas específicas para obtenção de uma completa digestão. Logo, a ausência da enzima responsável neste último processo de degradação promove o acúmulo de GAGs incompletamente degradados nos lisossomos (CHAMPE et al., 2006).

Neste caso, a MPS do tipo IV é caracterizada pela degradação deficiente do glicosaminoglicano denominado de sulfato de queratan e condroitina-6-sulfato, e isto é resultante de mutações que ocorrem no gene que codifica duas diferentes enzimas que permitem a classificação dessa síndrome em dois subtipos: a deficiência da N-acetilgalactosamina-6-sulfatase (MPS IVA) e a  $\beta$ -galactosidase (MPS IVB) (COUTINHO et al., 2012). Dentre estes dois subtipos o alvo deste estudo é a MPS IVA.

Os dados epidemiológicos da Síndrome de Morquio A são escassos e a distribuição mundial desse distúrbio é bastante variável, com a incidência oscilando para a MPS IVA de 1:76.000 nascidos vivos na Irlanda do Norte (NELSON, 1997) enquanto que na Columbia Britânica é estimada em 1:216.000 nascimentos vivos (LOWRY et al., 1990), na Tunísia estima-se 2.8:100.000 nascidos vivos (KHEDHIRI et al., 2009) e em Portugal 1:450.000 recém-nascidos vivos (PINTO et al., 2004). Desse modo, a discrepância da incidência em populações de diferentes etnias é compreendida através do efeito fundador da Síndrome de Morquio A (HENDRIKSZ et al., 2013; MORRONE et al., 2014).

Segundo a Associação dos Portadores de Mucopolissacaridoses do Estado da Paraíba (2010), este é o estado brasileiro que tem a maior quantidade de casos diagnosticados para MPS. Além disso, estudos prévios reportaram uma prevalência de 1: 171.205 habitantes para a MPS IVA na Paraíba (MEDEIROS et al., 2014).

Dados epidemiológicos descrevem que esta síndrome acomete da mesma maneira tanto o sexo masculino quanto o sexo feminino e ocorre com maior frequência em populações com tradição de casamentos consanguíneos, como por exemplo, na Paraíba. Nos quais, estudos apontaram a existência de elevadas taxas de uniões consanguíneas na Paraíba, cuja taxa de endogamia varia de 6,0% a 41,14% (TANIERI et al., 2011). As pessoas acometidas com a MPS IV são aparentemente normais ao nascimento, mas complicações clínicas posteriores manifestam-se conforme aumenta o acúmulo de sulfato de queratane condroitina-6-sulfato nas células e tecidos. Além disso, os pacientes diagnosticados com a Síndrome de Morquio apresentam desenvolvimento neuro-

psicomotor normal com o intelecto preservado durante a vida toda (CHAVES et al., 2003).

A Mucopolissacaridose do tipo IV caracteriza-se pelo predomínio de baixa estatura, afecções ósseas graves e opacidade da córnea, no qual ambos os subtipos dessa síndrome possui um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo estas extremamente variáveis em seus efeitos, que incluem: retardo no crescimento com tronco e pescoço curtos, com alterações de face apresentando uma boca grande, mandíbula quadrada e dentes espaçados, bem como joelhos valgus, platispondilia e escoliose, além de um jeito característico do “andar de galope” com tendência à queda. Outras manifestações incluem o comprometimento da audição, hepatomegalia, obstrução das vias aéreas superiores e lesões valvulares cardíacas (COUTINHO, 2012; MCLAUGHLIN et al., 2010).

O tratamento dos indivíduos diagnosticados com a Síndrome de Morquio A é recente, iniciado a partir do ano de 2015, e é realizado através da Terapia de Reposição Enzimática (TRE), que consiste na administração intravenosa de elosulfasa alfa, uma forma recombinante da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase humana, sintetizada através de engenharia genética. As infusões periódicas de elosulfasa alfa atuam a nível celular repondo a ação da enzima GALNS deficiente na MPS IVA, promovendo assim o restabelecimento da função celular. Além do tratamento com TRE, destaca-se a importância do manejo adequado das manifestações clínicas multissistêmicas da MPS IVA.

### **2.2.1 Gene GALNS**

A etiologia da MPS tipo IVA ocorre devido a mutações no gene que codifica a enzima lisossomal N-acetilgalactosamina-6-sulfatase. A atividade deficiente da enzima GALNS, uma das várias sulfatases, conduz a acumulação dos glicosaminoglicanos sulfato de queratana e condroitina-6-sulfato nos lisossomos, tendo em vista que não ocorre a hidrólise de ligações ésteres dos grupamentos sulfato da porção terminal desses GAGs específicos. Conseqüentemente, o acúmulo desses substratos não degradados ou parcialmente degradados gera disfunção celular e as manifestações clínicas surgem gradativamente (CHINEN et al., 2014; RIVERA-COLÓN et al., 2012).

O gene GALNS (N-acetilgalactosamina-6-sulfatase), localizado no cromossomo 16q24.3, contém 14 éxons e 13 íntrons abrangendo 50kb (GDB acesso ID: 129085) e é transcrito em um cDNA de 1566pb, que codifica uma proteína precursora de 522

aminoácidos. E a enzima GALNS torna-se ativa quando apresenta as subunidades polipeptídicas de 40kDa e 15kDa ligadas por pontes dissulfetos (CATARZI et al.,2012).

As mutações no gene GALNS que causam a Síndrome de Morquio são muito heterogêneas e estão distribuídas ao longo de todo o gene. No entanto, a partir do mapeamento de mutações causadoras da patologia MPS IVA, determinado com base na estrutura tridimensional da enzima GALNS, estas são classificadas em três categorias: disrupção do sítio ativo, enovelamento anormal da proteína e exposição da superfície (RIVERA-COLÓN et al., 2012).

Cerca de 200 mutações distintas associadas com MPS IVA foram identificadas, incluindo mutações pontuais, deleções e inserções, cuja heterogeneidade conduz a uma ampla variabilidade clínica (KUBASKI, 2013). Além disso, existe uma correlação genótipo/fenótipo para algumas destas mutações, de modo que a maioria das deleções conduz à forma mais grave da MPS IVA, enquanto mutações pontuais produzem uma ampla variedade de fenótipos (FRANCESCHI et al.,2007).

## **2.3 Ancestralidade Materna**

### **2.3.1 As mitocôndrias e o DNA mitocondrial**

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e pleiomórficas, com um diâmetro de 0,5 a 1 $\mu$ , presentes em grandes quantidades no citoplasma das células eucarióticas. São constituídas por duas membranas fosfolipídicas, uma externa, mais densa e uma interna, mais fina, que forma uma série de invaginações denominadas de cristas, que lhe conferem um aumento da área de superfície. A matriz mitocondrial, o grande espaço interno dessa organela, é limitada pela membrana interna e contém as cópias de DNA mitocondrial, RNAs transportadores, ribossomos mitocondriais e várias enzimas (ALBERTS et al., 2010).

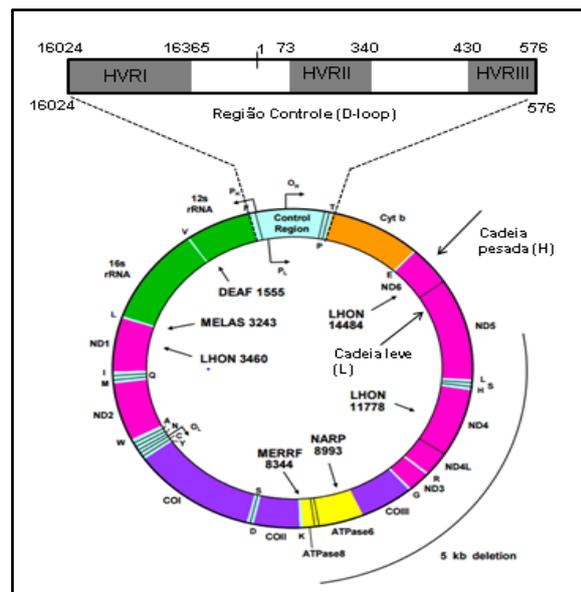
A principal função atribuída às mitocôndrias é a de promover energia celular, através da síntese de ATP durante o metabolismo aeróbio. Além disso, tais organelas participam de outras atividades biológicas fundamentais, tais como a produção de hormônios esteroides, no processo de desencadeamento da apoptose, na biossíntese de pirimidinas e do grupo heme da hemoglobina, assim como no metabolismo de neurotransmissores (NASSEH et al., 2001).

Destaca-se então que as mitocôndrias são organelas semiautônomas, uma vez que apresentam seu próprio DNA mitocondrial, este é distinto do genoma nuclear, além da própria maquinaria necessária para síntese de determinadas proteínas. Porém, o sistema

genético nuclear e o mitocondrial não são entidades isoladas uma vez que a maioria das proteínas mitocondriais é codificada por genes no DNA nuclear da célula, sintetizadas por ribossomos citosólicos e posteriormente importadas para a mitocôndria. E uma peculiaridade do genoma mitocondrial é apresentar origem exclusivamente materna (ALBERTS et al., 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

O DNA mitocondrial, um genoma extranuclear, é uma molécula circular dupla, com uma cadeia pesada (H-heavy) rica em purinas e uma cadeia leve (L-light) rica em pirimidinas, e é constituído por 16.569 pares de base, sem a presença de íntrons (Figura 1). A sequência completa desse genoma foi determinada por Anderson e colaboradores (1981), de modo que esta sequência denominada de *CambridgeReferenceSequence* (CRS) foi utilizada por muito tempo como referência. No entanto, a CRS foi revista e reanalisada por Andrews e colaboradores em 1999, que corrigiram 11 nucleotídeos, sendo atualmente denominada de *Revised Cambridge ReferenceSequence*(rCRS), com o número de acesso no *GenBank*:J01415.2. (ANDERSON et al., 1981; ANDREWS, 1999; BUTLER, 2011).

**Figura 1**–Mapa do genoma mitocondrial humano com destaque para região controle. A figura mostra a localização das regiões HVRI, HVRII e HVRIII. Na figura também pode ser visualizada a região codificante.



Fonte: LOTT et al., 2013 (adaptado)

O genoma mitocondrial contém 37 genes, 13 genes estruturais codificam proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa, 22 genes codificam RNAs transportadores e 2 genes codificam RNAs ribossomais (DIMAURO; DAVIDZON, 2005). Além dessa região codificadora, o DNA mitocondrial apresenta uma região controle altamente polimórfica,

também conhecida como região D-loop ou *displacement loop*, que contém três segmentos hipervariáveis: HVRI, HVRII e HVRIII. Esta região não codificante (D-loop), corresponde a uma porção de 1122 pb e é o principal local de controle para a expressão do DNAm, uma vez que contém a origem de replicação, que inicia-se na cadeia pesada e é bidirecional e assíncrona. A região controle é assim chamada porque participa da regulação tanto da replicação quanto do processo transcricional, pois possui os promotores da transcrição de ambas as cadeias, a leve e pesada. (DAUD et al., 2014; DOOSTI; DEHKORDI, 2011).

Segundo Anderson e colaboradores (1981) a numeração das cadeias do genoma mitocondrial inicia-se na região controle próxima da origem de replicação. A região controle vai da posição 16024 à 16569 e da posição 1 à 576 e nesta região estão presentes 3 segmentos hipervariáveis, a região HVRI estende-se da posição 16024 à 16365, a HVRII da posição 73 à 340 e a HVRIII da posição 430 à 576.

Diante disso, o DNA mitocondrial apresenta características peculiares, tais como um elevado número de cópias por célula, herança estritamente materna, elevada taxa de mutação e ausência de recombinação, que conferem a aplicação do mesmo como marcador genético para identificar a ancestralidade materna e reconstrução da origem e evolução populacional.

A existência de várias cópias do DNA mitocondrial por célula pode gerar um fenômeno denominado de heteroplasmia, caracterizado pela presença de dois ou mais genomas mitocondriais em uma mesma célula ou tecido. Tal fato ocorre porque as moléculas de DNAm se replicam de maneira independente uma das outras e, conseqüentemente, podem ocasionar mutações em apenas algumas linhagens. Este fenômeno também pode ocorrer pela presença de mitocôndrias paternas no organismo, isto é permitindo devido a falhas no mecanismo normal de reconhecimento e destruição das mitocôndrias espermáticas durante a embriogênese (SCHWART; VISSING, 2002). A heteroplasmia pode apresentar-se de duas maneiras: a de sequência e a de comprimento. A heteroplasmia de sequência ocorre quando os diferentes tipos de DNA diferem em apenas um nucleotídeo, sendo esta uma forma mais rara. Enquanto a heteroplasmia de comprimento caracteriza-se pela inserção ou deleção de citosinas em regiões contendo repetições mononucleotídicas, e é observada com maior frequência nas regiões de policitosinas nos segmentos HVRI e HVRII da região controle (BUTLER, 2011; MORAIS, 2013).

### **2.3.2 Haplogrupos mitocondriais**

O DNA mitocondrial possui algumas propriedades significativas que o tornam uma ferramenta útil para o estudo de genética populacional, tais como o modo de herança materna, a rápida taxa de evolução e a ausência de recombinação (genoma haplóide). Essas características permitem a transmissão do DNA mitocondrial às gerações seguintes através de haplótipos caracterizados pelo conjunto de polimorfismos existentes na sequência de DNAm, que resultam da acumulação de mutações nas matrinhagens herdadas ao longo da evolução, servindo então como marcador haplotípico de linhagem. E um grupo de haplótipos de DNAm derivados por descendência da mesma molécula ancestral, com o mesmo padrão basal de mutações define haplogrupo (TORRONI et al., 1993a).

O genoma mitocondrial caracteriza-se como haplóide devido ao seu modo de herança uniparental materna, de modo que os diferentes tipos de DNAm são resultantes da ocorrência de mutações. Estas mutações genéticas detectadas pelo DNAm são mais suscetíveis aos efeitos do acaso (Deriva Genética) em diferentes populações, especialmente as pequenas, que levam à aceleração do agrupamento geográfico e a diferenciação entre linhagens maternas. A taxa mutacional do DNA mitocondrial é de dez a cem vezes maior que a taxa de mutação do DNA nuclear. Além disso, destaca-se que a taxa de mutação observada no genoma mitocondrial é mais elevada na região controle, por isso também é conhecida como região hipervariável, do que na região codificante. Isto é resultante da baixa atividade do sistema de reparo no processo de replicação do DNAm, assim como a ausência de histonas (MAGALHÃES; SILVA, 2006).

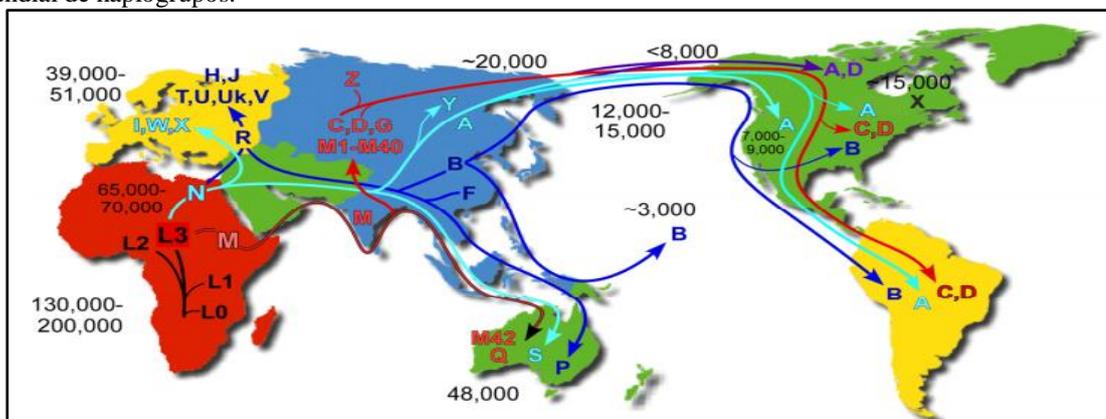
As mutações ocorridas no DNA mitocondrial ao longo da evolução geram, portanto, as variações ('polimorfismos') que servem como marcadores de linhagens, isto é, as moléculas de DNAm são transmitidas da mãe para os filhos ao longo das gerações e o caráter haplóide do genoma mitocondrial permite a descendência de um ancestral comum entre os indivíduos. E as características únicas do DNAm permitem afirmar que todas as linhagens maternas possuem um ancestral comum de uma mulher, conhecida como "Eva Mitocondrial", que viveu na África há mais de 150 mil anos e representa origem de todas as matrinhagens atuais (CANN et al 1987; SANTOS; SANTOS, 2012).

Os haplótipos, conjunto de alterações presentes na região controle da sequência de DNAm (Figura 1), são representados pelos respectivos haplogrupos a que pertencem recorrendo à versão da árvore filogenética desenhada por van Oven e Kayser (2009). Estudos evolutivos têm identificado os *loci* polimórficos característicos de cada haplogrupo, como exemplo e recorrendo apenas a polimorfismos da região controle, o

haplogrupo HV0 é caracterizado pela presença da substituição por transição T-C na posição 72 e 16298 do mtDNA.

A taxa evolutiva ao longo do tempo promove à constituição de linhagens independentes, os haplótipos, que ao serem agrupados definem haplogrupos. Desta maneira, os haplogrupos atualmente são representados com letras maiúsculas de A a Z. As linhagens mitocondriais mundialmente são distribuídas em três grandes conjuntos, os super haplogrupos L1, L2 e L3. Os dois primeiros são especificamente africanos e o último ocorre em todos os continentes, no entanto pode ser subdividido em haplogrupos típicos de populações africanas, europeias, asiáticas e ameríndias. De modo que as linhagens mitocondriais mais diversificadas e mais antigas são as africanas, estas são classificadas nos seguintes haplogrupos: L0, L1, L2, L3, L4, L5 e L6. Estes são agrupados no macrohaplogrupo L, no qual as linhagens maternas M e N, presentes na Ásia e Europa respectivamente, divergiram a partir do haplogrupo L3. Na Europa, o haplogrupo N originou os haplogrupos H, I, J, K, U, V, W, T e X, estes constituem 98% da população europeia. Enquanto na Ásia e Oceania, os haplogrupos específicos são A, B, F e Y, que divergiram do macrohaplogrupo N e os haplogrupos C, D, E, G e Z, que divergiram a partir do haplogrupo M. Em grande maioria, a constituição do continente americano é de haplogrupos asiáticos A, B, C, D e X, sugerindo que populações asiáticas entraram no continente americano antes da colonização europeia. (PENA,2000; VAN OVEN; KAYSER, 2009). A figura 2 ilustra a distribuição geográfica dos haplogrupos mitocondriais eo padrão das migrações humanas.

**Figura 2**–Migrações Humanas a partir de estudos do DNA mitocondrial e respectiva distribuição geográfica mundial de haplogrupos.



Fonte: LOTT et al., 2013 (adaptado)

A região controle do DNA mitocondrial permite que estudos de evolução identifiquem os polimorfismos característicos de cada haplogrupo, permitindo assim a

classificação específica, e conseqüentemente, a determinação da composição genética matrilinear de uma população.

Até a presente data não se encontram disponíveis quaisquer publicações referente à aplicabilidade da análise da região controle do DNA mitocondrial da população paraibana, tornando este trabalho pioneiro na análise da ancestralidade materna desta população. Além disso, no Brasil, a Paraíba é o estado que apresenta um elevado número de casos diagnosticados com MPS IVA, provenientes da mesorregião da Borborema. Por essa razão, este trabalho teve como objetivo analisar a ancestralidade materna dos pacientes diagnosticados com MPS-IVA da Paraíba.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Local de estudo e amostragem**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual da Paraíba-Campus I, Campina Grande.

O estudo foi realizado com uma amostra de 20 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para Mucopolissacaridose tipo IVA. A triagem dos pacientes e coleta de sangue foi realizada pelo serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC), obtidas com a colaboração de Dra. Paula Frassinetti. Todos os pacientes apresentaram níveis elevados de GAGs dosados na urina, sendo estes identificados como sulfato de queratan e condroitina-6-sulfato, sugerindo MPS IVA. A confirmação diagnóstica foi feita por meio da dosagem da atividade da enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatase no sangue, que se mostrou diminuída ou mesmo indetectável em todos os pacientes. A presença deste diagnóstico aponta para a MPS IVA, tipo de MPS estudado nesta pesquisa. A população estudada é proveniente de diversos municípios do estado da Paraíba, no qual a maioria é originária da Mesorregião da Borborema, mais precisamente do Cariri paraibano. Todos os indivíduos incluídos neste estudo ou responsáveis legais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando a utilização das amostras de sangue, de forma não identificada, para realização da pesquisa científica e o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba.

#### **3.2 Extração de DNA**

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico dos indivíduos com Mucopolissacaridose IVA, utilizando o método fenol-clorofórmio descrito por Sambrook e Russell (2001). Também foi realizada a extração do DNA genômico com o Kit comercial da Promega (Genomic DNA Purification Kit) seguindo as recomendações do fabricante.

#### **3.3 Reação em Cadeia da polimerase (PCR)**

Foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-*Polymerase Chain Reaction*) nas amostras dos 20 pacientes para amplificar a região controle do DNA mitocondrial. Para isso, utilizou-se os dois seguintes pares de primers propostos por Cerezo et al., (2009): L15997 (Forward) e H17 (Reverse) que amplifica o fragmento entre as posições

16024 e 16599, enquanto que o par de primers L16555 (Forward) e H599 (Reverse) permitiu a amplificação dos fragmentos entre a posições 1 e 576 (tabela 1).

**Tabela 1**—Primers utilizados na amplificação da região controle total do DNAm humano.

Primers	Sequência	Tamanho do produto amplificado
<b>L15997</b>	5' CACCATTAGCACCCAAAGCT 3'	588pb
<b>H17</b>	5' CCCGTGAGTGGTTAATAGGGT 3'	
<b>L16555</b>	5' CCCACACGTTCCCCTTAAAT 3'	590pb
<b>H599</b>	5' TTGAGGAGGTAAGCTACATA 3'	

Fonte: CERESO et al., 2009;MORAIS, 2013 (adaptado).

Para amplificação foi preparada uma solução com volume final de 15µl,contendo: 1µl de DNA genômico(20-30ng/µl de DNA),8,43µl de H<sub>2</sub>O, 1,95µl de tampão (1,5X), 1,04µl de dNTPs (200mM), primersforward 1,04µl (0,8 pmol), primers reverse 1,04µl (0,8 pmol) e *Taq* polimerase 0,5µl (1U). As amplificações foram realizadas em um termocicladorVeriti™ 96-Well (AppliedBiosystems) com o respectivo programa: desnaturação inicial por 10 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 15s a 95°C, 30s a 52°C e 90s a 72° C, com extensão final de 72° C por 10 min (DAUD et al., 2014).

### 3.4 Eletroforese

Os produtos de PCR foram aplicados na eletroforese em uma cuba horizontal de agarose a 1%, cujo tampão utilizado para a corrida eletroforética é do tipo TAE 0,5x (Tris-Ácido Acético- EDTA), corados em solução com 5µl de brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta em um transluminador. Ao DNA da amostra foi adicionado 2µl de tampão de amostra (Tampão Tris 10mM, pH 7.5; EDTA 10mM; Azul de Bromofenol) a 3µl do produto de PCR e, em seguida, aplicado no gel. A corrida eletroforética teve duração de 40 min com voltagem de 100 Volts. O tamanho dos fragmentos foi caracterizado por um marcador molecular de 100pb.

### 3.5 Purificação e sequenciamento

A purificação dos produtos de PCR para o sequenciamento consistiu na adição de 0,33µl (3,3U) de EXO I (Exonuclease I), 0,33µl (0,66U) de SAP (ShrimpAlkalinePhosphatase), 0,34µl de H<sub>2</sub>O e 6µl do produto de PCR. Esta solução foi ao termociclador a 37°C por 30 min e 80°C por 15 mim.

As amostras dos 20 pacientes foram sequenciadas utilizando o Analisador Genético 3500XL (AppliedBiosystems). Para cada amostra foram realizadas dois sequenciamentos, um utilizando o iniciador direto (Forward) e o outro utilizando o iniciador reverso (Reverse).

Para a reação de sequenciamento foram utilizados: 2µl do amplicon purificado (3-10ng/µl), 1µl de primer (a 5 pMol/µl), 1,75µl do Tampão de Sequenciamento, 0,5µl de BigDye e 4,75µl de H<sub>2</sub>O Mili-Q, para uma solução com volume final de 10µl. As reações foram realizadas em placas de 96 poços e submetidas a uma nova PCR seguindo as condições térmicas de: desnaturação inicial de 96° por 1'; e 40 ciclos de desnaturação a 96° por 15'', anelamento de 50° por 15'', extensão de 60° por 4'.

As amostras foram purificadas e precipitadas utilizando 1µl de Acetato de Sódio 3M pH 5,2, 1µl de EDTA 125mM pH 8,0 e 25µl de etanol absoluto, que seguiram para centrifugação a 4°, a 3.700 rpm por 40min. A solução foi removida e adicionado aos poços 35µl de etanol a 70% e centrifugada novamente a 4°, a 3.700 rpm por 10 min. Após a secagem da placa, foi adicionado 10µl de formamida em cada poço e imediatamente submetidas a eletroforese capilar.

### **3.6 Análises das sequências**

Para a análise das sequências geradas foram utilizados o programa GeneticAnalyzer 3.0 (AppliedBiosystems) e o pacote de programas Staden (STADEN et al., 2000), ambos para análise dos cromatogramas resultantes do sequenciador automático ABI PRISM 3500XL. E o *contig* gerado foi analisado utilizando os programas pregap4 e gap4, funcionalidades contidas no Staden. O *contig* obtido corresponde às sequências de cada amostra, sendo uma Forward e outra Reverse. Foi utilizado o programa MUSCLE, incorporado no Mega v.6 (TAMURA et al., 2013), para fazer o alinhamento das sequências utilizando como sequência de referência a rCRS e as variantes nucleotídicas foram confirmadas através da ferramenta MITOMASTER (LOTT et al., 2013). A determinação dos haplogrupos mitocondriais a que cada haplótipo pertence, recorrendo aos polimorfismos detectados em relação à rCRS, foi realizada através do programa HaploGrep (KLOSS-BRANDSTATTER et al., 2011).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificação dos haplogrupos

Foi analisada a região controle do DNA mitocondrial dos 20 indivíduos analisados, cuja sequência para cada par de primer (L15997/H17 e L16555/H599) obteve um total médio de 1.034pb. Dentre os 1.034 nucleotídeos que compõem a região D-loop do DNAm, 73 posições nucleotídicas apresentam-se polimórficas em relação a rCRS. Destes os que definem os haplogrupos estão descritos na tabela 2.

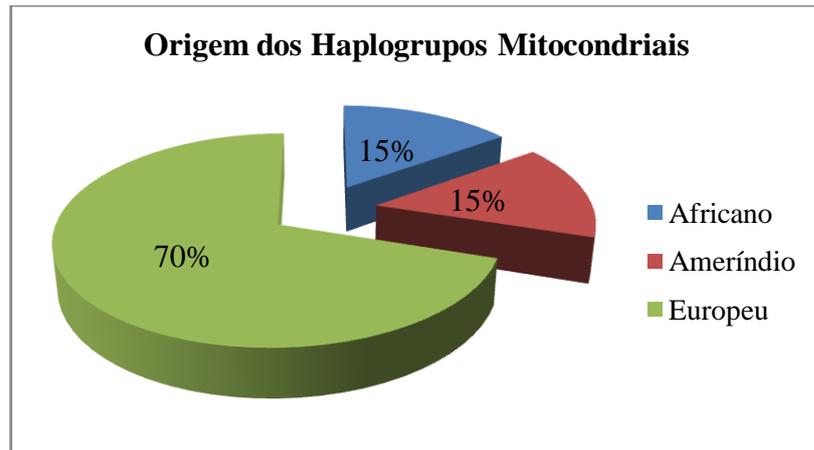
**Tabela2**–Polimorfismos da região controle do DNAm que definem os haplogrupos.

Haplogrupo	Polimorfismos da região controle	Matrilinhagens
<b>HV0</b>	16298C 72C	Europeia
<b>H4a1a1a3</b>	16287T 73G	Europeia
<b>U6a1b1a</b>	16172C 16278T 16355T 146C	Europeia
<b>U5b2a2</b>	16192T 16270T 16398A 150T	Europeia
<b>T2j</b>	16260T 16294T 16296T	Europeia
<b>A6b</b>	16290T 16319A 146C 235G	Ameríndia
<b>B4b</b>	16217C 499 <sup>a</sup>	Ameríndia
<b>L3e1d</b>	16176T 16327T 152C	Africana
<b>L3e1a</b>	16185T 16327T	Africana
<b>L3f1b1a1</b>	16209C 16292T 16295T 16311C 189G 200G 272G	Africana

Fonte: VAN OVEN; KAYSER, 2009(adaptado).

As proporções das diferentes ancestralidades maternas foram determinadas por contagem direta sendo tal distribuição apresentada na Figura 3. Na população estudada verificou-se, então, a classificação das matrilinhagens em 70% de origem europeia, 15% de origem africana e 15% de origem ameríndia.

**Figura 3**– Proporção de distintas ancestralidades maternas do DNAmT nos pacientes com MPS-IVA da Paraíba.



Fonte: dados da pesquisa.

Na população em estudo verificou-se que 14 indivíduos (70%) apresentam origem europeia. Dentre as diferentes linhagens mitocondriais europeias, o haplogrupo mais comumente encontrado foi HV0 (45%) definindo-se pela presença dos polimorfismos 72C e 16298C. Seguindo do sub-haplogrupo U6 que está representado em 2 das amostras estudadas (10%) e classifica-se devido a existência dos polimorfismos 16172C, 16278T, 16355T e 146C. Outros distintos haplogrupos europeus identificados na população amostral foi o H4 e T2, assim como o sub-haplogrupo U5 (5% cada).

O haplogrupo africano divide-se em três super-haplogrupos L1, L2 e L3, no qual os dois primeiros são especificamente de africanos, enquanto o último ocorre em todos os continentes, podendo ser subdividido em haplogrupos típicos de populações africanas, europeias, asiáticas e ameríndias (PENA, 2000). Dentre as amostras analisadas, o único haplogrupo africano encontrado foi o L3 (15%). Em relação aos sub-haplogrupos de origem africana, foi identificado o sub-haplogrupo L3e1 em duas sequências (10%) e o sub-haplogrupo L3f em apenas uma sequência (5%).

Os haplogrupos nativos-americanos (ameríndios) foram verificados em 3 indivíduos das sequências analisadas. No qual, o haplogrupo A6 foi encontrado em duas amostras (10%) e caracteriza-se pela presença dos polimorfismos 16290T, 16319A, 235G e 146C. E uma única sequência foi classificada no haplogrupo B4 (5%), definido pela alteração polimórfica 16217C e 499A.

A análise da origem matrilinear da população em estudo, proveniente do estado da Paraíba, permitiu verificar que a ocorrência das ancestralidades maternas africanas, ameríndias e europeias difere entre as mesorregiões paraibanas (Figura 4). Os dados

permitiu observar que as sequências analisadas com origem europeia distribuem-se entre as mesorregiões da Borborema, do Agreste e do Sertão. As sequências com ancestralidade materna africana ocorrem nas mesorregiões do Agreste e Sertão. Enquanto todas as sequências analisadas de origem materna ameríndia ocorrem na mesorregião da Borborema.

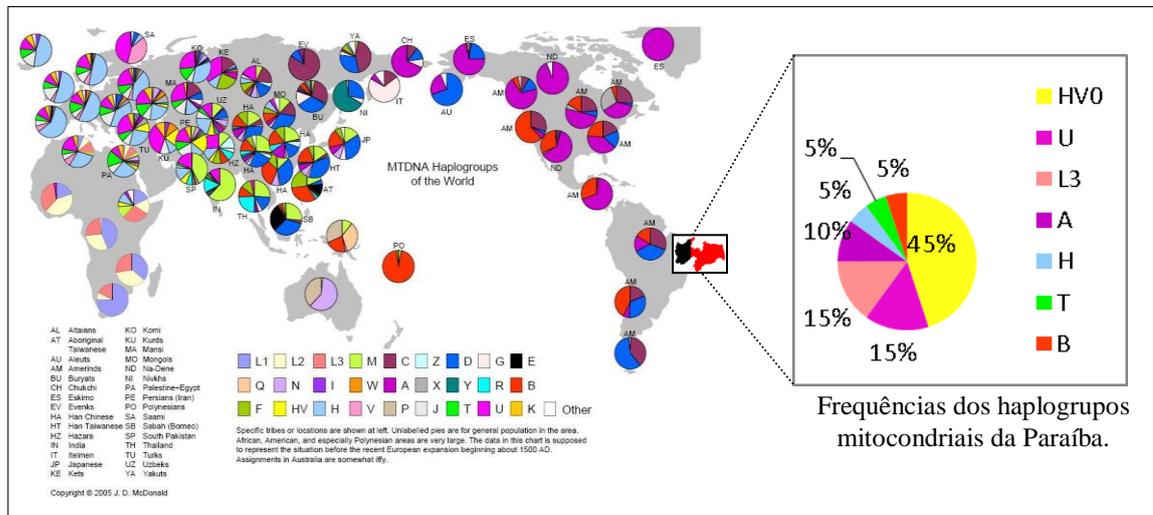
**Figura 4**– Ocorrência das ancestralidades maternas europeias, africanas e ameríndias nas Mesorregiões da Paraíba.



Fonte: [www.baixarmapas.com.br](http://www.baixarmapas.com.br) (adaptado).

Foram observadas diferentes frequências nos haplogrupos mitocondriais dos pacientes de MPS IVA da Paraíba. A ancestralidade materna destes pacientes é melhor compreendida ao estabelecer a comparação entre a árvore filogenética da distribuição do DNAm<sub>t</sub> mundial e a representação gráfica em destaque dos haplogrupos identificados nesta pesquisa, correlacionando com as cores específicas de cada haplogrupo. Como exemplo, podemos observar que o haplogrupo L3 representa uma linhagem materna que distribuiu-se pelo continente africano, ramificando após mobilização de populações para fora dessa área, e representa 15% da linhagem materna africana da população em estudo (Figura 5). Este paralelo é possível devido ao caráter haploide do genoma mitocondrial, uma vez que as moléculas de DNAm<sub>t</sub> são transmitidas da mãe para os filhos ao longo das gerações, refletindo assim a partilha de um ancestral comum entre os indivíduos.

**Figura 5**—Distribuição geográfica dos haplogrupos de DNAm<sub>t</sub> no mundo e nos pacientes com MPS IVA da Paraíba.



Fonte: www.worldfamilies.net (adaptado) e dados da pesquisa.

### 4.2 Frequências haplotípicas

Foi observado um total de 17 haplótipos distintos (vide apêndice), no qual apenas 3 foram compartilhados, com as seguintes frequências Hp310%, Hp610% e Hp11 10% (tabela 3).Dentre as alterações polimórficas em relação à rCRS, os polimorfismos por substituição foram os mais frequentes, totalizando 54 transições e 6 transversões.

**Tabela3**—Haplótipos compartilhados na população em estudo.

Haplótipo	Polimorfismos
<b>Hp3</b>	16124C 16298C 16319A 72C 263G 309.1C 309.2T 310C
<b>Hp6</b>	16126C 16223T 16278T 16290T 16319A 16362C 73G 146C 152C 153G 235G 263G 297G 310.1C 515d 516d
<b>Hp11</b>	16172C 16219G 16278T 16355T 16519C 73G 146C 263G 309.1C 309.2T 310C

Fonte: dados da pesquisa.

A identificação dos diversos polimorfismos obtidos em cada sequência, devido à análise da região D-loop do DNA mitocondrial, permitiu a classificação de todos os haplótipos de cada uma das amostras analisadas nos haplogrupos específicos, apresentados no Apêndice A.

Em todas as sequências verificou-se que existe uma transição de uma adenina (A) para uma guanina (G) na posição 263. Apesar de Andrews e colaboradores (1999)considerarem

na rCRS a presença de uma Adenina (A) na posição 263 um polimorfismo raro detectado na CRS obtida por Anderson e colaboradores em 1981, não estando presente na maioria dos seres humanos. E algumas posições polimórficas apresentam elevada taxa de substituição em relação à rCRS (tabela 4).

**Tabela4**—Taxa de substituição de algumas posições polimórficas.

Posição do polimorfismo	Alteração polimórfica	Amostras
310	T→C	14
72	T→C	12
16319	G→A	11
16298	T→C	10
73	A→G	10

Fonte: dados da pesquisa.

Na região HVRIII da região D-loop do DNAm<sub>t</sub> há uma repetição de dinucleotídeos AC com 5 repetições entre a posição 515 e a posição 524 na maioria dos indivíduos (BUTLER, 2011). Em duas sequências verificou-se uma deleção de dinucleotídeos AC, sendo este polimorfismo indicado como 515d e 516d. Em 3 das amostras analisadas verificou-se a deleção de uma adenina (A) na posição 16252, e 2 sequências apresentaram a deleção de uma adenina (A) na posição 24. Outras duas deleções foram verificadas em uma amostra, a deleção de uma adenina (A) na posição 175 e uma deleção na posição 184 de uma guanina (G).

A maioria das inserções foi identificada no interior da região HVRII na zona poli-C, (sequência de citosinas que estende-se da posição 303 à 315 interrompida por uma timina na posição 310) com inserções de citosinas e timinas na posição 309 e também da inserção de citosinas na posição 310. Foi também observada em uma sequência a inserção de uma adenina na posição 246 e em nenhuma amostra analisada observou-se inserções na zona poli-C da região HVRI.

A zona poli-C da região HVRI é composta por uma sequência de citosinas entre as posições 16184 a 16193, com uma timina na posição 16189. Frequentemente esta timina pode ser observada em outra posição no interior dessa região de poli-citosinas. Detectou-se a presença de uma timina (T) nas posições 16184, 16185 e 16192.

Analisando a região controle do DNAm dos pacientes deste estudo observou-se a presença de heteroplasmia de comprimento em 2 das sequências analisadas, uma sequência associada à zona poli-C da região HVRI entre a posição 16184 e 16193 e a outra sequência associada a zona poli-C da região HVRII entre a posição 303 e 315. Em nenhuma das sequências de DNAm analisadas do presente estudo foi identificada heteroplasmia de posição.

## 5. DISCUSSÃO

A heterogeneidade da população brasileira tem sido investigada por diversos pesquisadores de diferentes áreas como arqueologia, antropologia, genética, história e geografia, com objetivo de fornecer informações sobre o processo de formação da população e sua evolução ao longo dos anos, assim como determinar a diversidade genética do povo brasileiro. Nesta pesquisa, a aplicabilidade da análise da região controle do DNA mitocondrial permitiu recolher dados genéticos importantes sobre a origem materna dos pacientes com MPS IVA da Paraíba, estado brasileiro que tem alta incidência da síndrome de Morquio.

Até a presente data não se encontram disponíveis quaisquer publicações referente à região controle do DNA mitocondrial da população paraibana, tornando este trabalho pioneiro na análise da ancestralidade materna desta população. As publicações que abrangem a região Nordeste do Brasil quando relacionadas ao uso do DNAm como marcador genético em estudos de evolução humana são escassas.

A heterogeneidade populacional da população brasileira é resultante de cinco séculos de intensa miscigenação entre os povos de três continentes: ameríndios autóctones, os europeus (os colonizadores) e os africanos (os escravos). Alves-Silva e colaboradores (2000), desenvolveu um estudo pioneiro que analisou a região controle do DNAm de 247 indivíduos brancos de diferentes regiões geográficas do Brasil, identificando as diferentes proporções de ancestralidades maternas nessas regiões. Os pesquisadores observaram que a frequência relativa das origens matrilineares variava de acordo com a região. Na região nordeste, numa amostra de 50 indivíduos de Pernambuco, foi verificada uma frequência maior de linhagens mitocondriais africanas (44%), seguida por linhagens maternas europeias (34%) e linhagens mitocondriais com origem ameríndia (22%).

Quanto à origem geográfica dos haplogrupos mitocondriais determinados no presente estudo com os 20 pacientes com MPS IVA, observou-se que 70% dos indivíduos apresentaram ancestralidade europeia, 15% de origem africana e 15% de origem ameríndia (figura 3). Enquanto em Alagoas (nordeste brasileiro), o DNAm de 167 indivíduos foi analisado e as frequências associadas às ancestralidades maternas europeias, africanas e ameríndias foi de 21%, 44% e 33%, respectivamente (BARBOSA et al., 2008). Estas diferenças podem ser explicadas devido à variabilidade das linhagens maternas apresentarem uma tendência menor em populações humanas tradicionalmente isoladas, por causa dos elevados níveis de endogamia durante longos períodos e fluxo gênico restrito.

Entre as diferentes linhagens mitocondriais europeias, na amostra do presente estudo, o haplogrupo mais frequente foi o HV0 em 45% dos indivíduos analisados. Também verificamos a presença dos seguintes haplogrupos europeus: U (15%), o H (5%) e o T (5%). Ao analisar os haplótipos pertencentes à haplogrupos característicos do continente europeu, verificamos que o menor número de alterações polimórficas observadas nessas sequências em relação à rCRS foi de 4 alterações polimórficas, enquanto o maior número de alterações polimórficas foi de 12. A média de variações nucleotídicas foi de 8, o que está de acordo com os números de Budowle e colaboradores (1999) que determinam a média característica de variações em populações de descendência europeia entre 6 e 9.

Neste estudo o haplogrupo mais frequente foi o HV0, verificado em 45% dos indivíduos. O haplogrupo HV0 (Pre-V), linhagem descendente de HV, é predominantemente disperso por toda a Europa (TORRONI et al., 2001). Segundo García et al. (2011), a distribuição da linhagem materna HV0 no continente europeu apresenta maiores frequências no Norte da Península Ibérica e na França. Mairal e colaboradores (2013) realizou um estudo no município de Miranda do Ouro (Norte de Portugal) com 121 indivíduos e verificou que as matrilineagens representadas pelo haplogrupo HV0 apresentam uma frequência de 8,3%, no qual valores semelhantes foram observados na província espanhola de Zamora cuja frequência foi de 8,4% (ALVAREZ et al., 2010). No Brasil, o haplogrupo HV0 é encontrado com uma frequência de 3.75% em uma amostra de 80 indivíduos residentes em Santa Catarina (PALENCIA et al., 2010).

Neste estudo foi observado a presença do haplogrupo U6 (sub-haplogrupo U6a1b1a) em 2 sequências das amostras analisadas e também do haplogrupo U5 (U5b2a2) em 1 amostra analisada. O haplogrupo U6 é característico de populações do norte da África (PEREIRA et al., 2003), enquanto o haplogrupo U5 é tipicamente europeu e o sub-haplogrupo U5b2a2 caracteriza-se por uma frequente distribuição na Europa Central (MALYARCHUK et al., 2010). A análise de 100 amostras provenientes do Norte de Portugal (Europa Ocidental) permitiu verificar uma frequência de 7% para o haplogrupo U6, sendo considerada relativamente alta devido à ocorrência esporádica deste haplogrupo em outras populações europeias. O haplogrupo U5 apresentou uma frequência de 8% no Norte de Portugal (PEREIRA et al., 2000). O haplogrupo U tem sido encontrado no Sul do Brasil com uma frequência de 5% em Santa Catarina (PALENCIA et al., 2010) e 10% em Veranópolis (MARRERO et al., 2005).

Em relação ao haplogrupo H, este representa a linhagem materna mitocondrial mais frequente (40%) e diversificada da Europa, difundindo-se também na Ásia Ocidental. No

presente estudo foi verificada a presença dosub-haplogrupo H4a1a1a3. O sub-haplogrupo H4 é frequentemente encontrado na Península Ibérica (ÁLVAREZ-IGLESIAS et al., 2009). O haplogrupo H apresenta-se como o mais comum em países europeus, tais como no Portugal (PEREIRA et al., 2000), na Itália (TURCHI et al., 2008) e Alemanha (TETZLAFF et al., 2007), que possuem frequências de 40,66%, 38,99% e 37,29%, respectivamente. No Brasil, este haplogrupo também é encontrado como mais frequente nos estudos realizados nas cidades de Santa Catarina (VALVERDE et al., 2009; PALENCIA et al., 2010).

O haplogrupo T constitui aproximadamente 10% dos DNAmT na Europa e 8% no Oriente Próximo, este apresenta dois sub-haplogrupos distintos: T1 e T2.No presente estudo foi verificada a ocorrência do sub-haplogrupo T2j. O sub-haplogrupo T2 representa 8% da variabilidade genética na Europa ocidental e 5% no Oriente Médio (PALA et al., 2012). O estudo realizado em uma comunidade judaica de Bragança (Portugal) com 56 indivíduos observou uma frequência de 12,5% para o haplogrupo T (TEXEIRA et al., 2011). Entre as linhagens europeias, o haplogrupo T (14%) representa um dos haplogrupos mais comum no Brasil (ALVES-SILVA et al., 2000).

Os haplogrupos africanos observados nos pacientes com MPS IVA foram classificados no haplogrupo L3, originado na África Oriental e encontra-se amplamente distribuído pelo continente africano. As linhagens obtidas nas sequências analisadas a partir do haplogrupo L3 foram as seguintes: L3f1 em uma das sequências analisadas e L3e1a em duas das sequências analisadas. O sub-haplogrupo L3f1 está presente na África Ocidental e o sub-haplogrupo L3e1a distribui-se por toda a África sub-Sariana, ambos são bem representados entre os afro-americanos (SALAS et al., 2002). A diversidade genética do DNAmT em Portugal foi verificada a partir de 292 indivíduos, provenientes das regiões Norte, Centro e Sul, e observou-se uma frequência de 2,73% do haplogrupo africano L3 (MARQUES et al., 2015). No estado de Alagoas, há a predominância de linhagens maternas africanas em uma proporção de 44%, no qual 16,7% são representadas pelo haplogrupo L3 (BARBOSA et al., 2008).

Em relação às matrilineagensameríndias, na amostra analisada do presente estudo foi verificada a presença do haplogrupo A6b e do haplogrupo B4b. Os haplogrupos A, B, C e D são reconhecidos como os progenitores de todo o DNAmT de nativos americanos, no qual os haplogrupos A, B, C e D derivam de populações Siberianas localizadas perto do Estreito de Bering (TORRONI et al., 1993a; 1993b). A análise dos haplótipos ameríndios no Brasil permitiu observar que a distribuição das linhagens ameríndias nas diferentes

regiões geográficas não era uniforme, no qual na região do Nordeste os haplogrupos mais frequentes são: A (37%) e B (27%) (PRADO; ALVES-SILVA, 2002).

O estudo da região controle do DNAmT dos pacientes com Mucopolissacaridose IVA permitiu a obtenção de 17 haplótipos distintos, entre os quais 3 foram compartilhados por 2 indivíduos (tabela 3). Foram detectadas 73 posições polimórficas em relação à rCRS neste estudo, com diferentes frequências de ocorrência na amostra. Em todas as sequências verificou-se a existência de uma transição (A-G) na posição 263. A elevada ocorrência da transição A-G na posição 263 foi encontrada também no estudo realizado com 100 indivíduos da população da Bahia (SANTOS et al., 2004). Quanto às mutações observadas, verificou-se um número superior de substituições por transição nas sequências analisadas, observado anteriormente por Barbosae colaboradores (2008).

Os resultados obtidos apontam uma elevada contribuição de linhagens ancestrais maternas europeias nos pacientes diagnosticados com Mucopolissacaridose IVA da Paraíba, estado brasileiro com alta prevalência e incidência desta síndrome. Os dados históricos da ocupação populacional da Paraíba constam que famílias de origem portuguesa com forte tradição de uniões consanguíneas foram as principais colonizadoras da região (MEDEIROS et al., 2014). No entanto, Portugal tem uma das mais baixas frequências de MPS IVA do continente europeu. Destaca-se ainda que a MPS IVA apresenta uma ocorrência, com maior frequência, em casamentos consanguíneos de pais saudáveis e heterozigotos. E elevadas taxas de uniões consanguíneas foram verificadas na Paraíba, cuja taxa de endogamia varia de 6,0% a 41,14% (TANIERI et al., 2011).

De acordo com os registros da rede MPS Brasil (2015), um estudo realizado anteriormente com os pacientes acometidos com MPS IVA da região paraibana, acerca da análise molecular do gene GALNS, reportou a existência de uma frequência alélica de 60% para uma mesma mutação específica (p.S341R) em 13 indivíduos. Ao correlacionar tais dados e a ancestralidade materna dos pacientes foi possível verificar que a mutação compartilhada entre 63% dos pacientes com MPS IVA da Paraíba tem origem europeia. Logo, a alta frequência da mesma mutação nos pacientes associada com a alta prevalência de MPS IVA na Paraíba e a alta taxa de endogamia sugere uma forte evidência do efeito fundador para a Síndrome de Morquio. Ou seja, sugere-se que a entrada das mutações características das linhagens maternas europeias na Paraíba tenham sido predominantes e, conseqüentemente, fixaram-se nessa região através dos processos imigratórios. O isolamento geográfico de pequenas regiões promove a possibilidade de um único

indivíduo provocar a predominância de uma ou mais mutações na população originária de tais isolados, processo este denominado de efeito fundador (BEIGUELMAN, 2008).

As ancestralidades maternas ameríndias e africanas identificadas no presente estudo refletem a uniformidade da distribuição geográfica dos DNA mitocondriais encontrados em todo Brasil, as quais foram 33% de linhagens ameríndias e 28% de linhagens africanas (PENA, 2000).

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que:

- O presente estudo apresenta uma elevada contribuição de linhagens ancestrais maternas europeias nos pacientes, que corrobora com os dados históricos da ocupação populacional da Paraíba, no qual se consta que famílias de origem portuguesa com forte tradição de uniões consanguíneas foram as principais colonizadoras da região.
- A mutação compartilhada entre os pacientes com MPS IVA da Paraíba tem origem europeia.
- A prevalência elevada da MPS IVA no estado da Paraíba sugere uma forte evidência para o efeito fundador, visto que os haplótipos que caracterizam as linhagens maternas europeias nos pacientes podem ter sido introduzidos na região através de processos imigratórios anteriores.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALVAREZ, L. et al. Mitochondrial DNA Patterns in the Iberian Northern Plateau: Population Dynamics and Substructure of the Zamora Province. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 142, p. 531-539, 2010.

ÁLVAREZ-IGLESIAS, V. et al. New Population and Phylogenetic Features of the Internal Variation within Mitochondrial DNA Macro-Haplogroup R0. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, e5112, apr. 2009.

ALVES-SILVA, J. et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 2, p. 444-461, 2000.

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457-465, Apr. 1981.

ANDREWS, R. M. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 147, 1999.

APPLEGARTH, D. A.; TOONE, J. R.; LOWRY, R. B. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. **Pediatrics**, v. 105, n.1, p. 1-5, jan. 2000.

Associação dos Portadores de Mucopolissacaridoses do Estado da Paraíba-ASPAMPS/PB, 2010. Disponível em: <<http://mpsparaiba2010.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

BAEHNER, F. et al. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 28, n. 6, p. 1011-1017, 2005.

Baixar Mapas- Mapas Geográficos. Disponível em: <<http://www.baixarmapas.com.br/>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

BARBOSA, A.G.B. et al. Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas state, north-eastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 53, n. 1, p.142-146, 2008.

BEIGUELMAN, B. **Genética de Populações**. Ribeirão Preto: SBG, 2008.

BOCHERNITSAN, A. N. **Distribuição geográfica da Mucopolissacaridose tipo IV no Brasil através de estudos moleculares para identificação de mutações patogênicas e polimorfismos no gene ARSB**. 2013. 34f. Trabalho de conclusão de

curso- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BUDOWLE, B. et al. Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. **Forensic Science International**, v. 103, n. 1, p. 23-35, 1999.

BUTLER, J. M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: methodology**. Academic Press, 2011. 405 p.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, v. 325, p. 31-36, 1987.

CATARZI, S. et al. Morquio A syndrome due to Maternal UniparentalIsodisomy of the telomeric end of chromosome 16. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 105, n. 3, p.438-442, 2012.

CEREZO, M. et al. High Mitochondrial DNA Stability in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, nov. 2009.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CHAVES, A. G. et al. Síndrome de Morquio: relato de caso e revisão da literatura. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 2, p. 267-271, mar./abr. 2003.

CHINEN, Y. et al. Long-term therapeutic efficacy of allogenic bone marrow transplantation in a patient with mucopolysaccharidosis IVA. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v.1, p. 31-41, 2014. 492 p.

COUTINHO, M. F.; LACERDA, L.; ALVES, S. Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. **BiochemistryResearchInternational**, 2012. 16 p.

DAUD, S. et al. Optimization and Validation of PCR protocol for three Hypervariable Regions (HVI, HVII and HVIII) in Human Mitochondrial DNA. **Advancements in Life Sciences**, v. 1, n.3, 2014.

DIMAURO, S.; DAVIDZON, G. Mitochondrial DNA and disease. **Annals of Medicine**, v. 37, n. 3, p. 222–232, 2005.

DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G. Genetic Polymorphisms of Mitochondrial Genome D-loop Region in Bakhtiarian Population by PCR-RFLP. **International Journal of Biology**, v. 3, n. 4, oct. 2011.

FRANCESCHI, L. et al. A molecular and histological characterization of cartilage from patients with Morquio syndrome. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 11, p. 1311-1317, 2007.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 72, n. 6, p. 455-482, 2008.

GARCIA, O. et al. Using mitochondrial DNA to test the hypothesis of a European post-glacial human recolonization from the Franco-Cantabrian refuge. **Heredity**, v.106, n. 1, p.37-45, 2011.

HENDRIKSZ, C. J. et al. Review of Clinical Presentation and Diagnosis of Mucopolysaccharidosis IVA. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.110, p. 54-64, 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KHEDHIRI, S. et al. Mucopolysaccharidose type I and IVA: Clinical features and consanguinity in Tunisia. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 5, p. 392-397, 2009.

KLOSS-BRANDSTATTER, A. et al. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. **Human Mutation**, v. 32, n.1, p. 25-32, 2011.

KUBASKI, F. et al. Identification of a novel missense mutation in Brazilian patient with a severe form of mucopolysaccharidosis type IVA. **Gene**, v. 517, p. 112-115, 2013.

LANKESTER, B. J. A.; WHITEHOUSE, M.; GARGAN, M. F.; Morquio syndrome. **Current Orthopaedics**, v. 20, n. 2, p. 128-131, 2006.

LOTT, M. T. et al. mtDNA variation and analysis using MITOMAP and MITOMASTER. **Current Protocols in Bioinformatics**, 2013.

LOWRY, R. B. et al. An update on the frequency of mucopolysaccharidosis syndromes in British Columbia. **Human Genetics**, v. 85, n. 3, p. 389-390, 1990.

MAGALHÃES, I. M.; SILVA, D. M. Informações acerca de marcadores moleculares uniparentais: DNA mitocondrial e cromossomo Y. **Estudos de Biologia**, v.28, n.63, p. 81-88, abr./jun. 2006.

MAIRAL, Q. et al. Linguistic isolates in Portugal: Insights from the mitochondrial DNA pattern. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 6, p. 618-623, 2013.

MALYARCHUK, B. et al. The Peopling of Europe from the Mitochondrial Haplogroup U5 Perspective. **PLoS ONE**, v.5, n. 4, p. e10285, 2010.

MARQUES, S. L. et al. Portuguese mitochondrial DNA genetic diversity- Na update and a phylogenetic revision. **Forensic Science International: Genetics**, v.15, p. 27-32, 2015.

MARRERO, A. R. et al. Heterogeneity of the Genome Ancestry of Individuals Classified as White in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Human Biology**, v.17, n. 4, p. 496-506, 2005.

MCLAUGHLIN, A. M. et al. Anaesthetic considerations of adults with Morquio's syndrome - a case report. **BMC Anesthesiology**, v. 10, n. 2, 2010.

MEDEIROS, P. F. V. et al. Prevalência de mucopolissacaridose IVA na Paraíba: um Efeito Fundador? In: XX ENGENE-Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande-PB. **Resumos...**Campina Grande: UEPB, 2014. p. 41. Disponível em: <<http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/viewFile/2546/1359>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

MEIKLE, P. J. et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. **Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 3, p. 249-254, jan. 1999.

MORAIS, P. J. S. **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de Cabo Verde residentes em Lisboa**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular da Saúde)- Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Lisboa, 2013.

MORRONE, A. et al. Molecular testing of 163 patients with Morquio A (Mucopolysaccharidosis IVA) identifies 39 novel GALNS mutations, **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 112, n. 2, p. 160-170, 2014.

NASSEH, I. E. et al. Doenças Mitocondriais. **Revista Neurociências**, v. 9, n.2, p. 60-69, 2001.

NELSON, J. et al. Incidence of the Mucopolysaccharidoses in Western Australia. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 123A, n. 3, p. 310-313, dec. 2003.

NELSON, J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. **Human Genetics**, v. 101, n. 3, p. 355-358, 1997.

NEUFELD, E. F.; MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. In: **The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill Companies, 2001. p. 3421-3452.

PALA, M. et al. Mitochondrial DNA Signals of Late Glacial Recolonization of Europe from Near Eastern Refugia. **American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 5, p. 915–924, May. 2012.

PALENCIA, L. et al. Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 4, p.331-336, 2010.

PENA, S. D. J. et al. Retrato Molecular. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 159, abr. 2000.

PEREIRA, L. et al. Phylogeny of the mtDNA haplogroup U6. Analysis of the sequences observed in North Africa and Iberia. **International Congress Series**, v. 1239, p. 491-493, 2003.

PEREIRA, L.; PRATA, M. J.; AMORIM, A. Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. **Annals of Human Genetics**, v. 64, n. 6, p. 491-506, 2000.

PINTO, R. et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. **European Journal of Human Genetics**, v. 12, n. 2, p. 87-92, 2004.

PLATT, F. M.; BOLAND, B.; VAN DER SPOEL, A. C. Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. **The Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 5, p. 723-734, 2012.

POORTHUIS, B. J. H. M. et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. **Human Genetics**, v. 105, n. 1, p. 151-156, 1999.

PRADO, V. F.; ALVES-SILVA, J. Linhagens Mitocondriais em Populações Nativas das Américas. In: **Homo brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro**. Ribeirão Preto-SP: FUNPEC, 2002. p. 63-72.

Rede MPS Brasil. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/redempsbrasil/index.php>>. Acesso em: out. 2015.

RIVERA-COLÓN, Y. et al. The Structure of Human GALNS Reveals the Molecular Basis for Mucopolysaccharidosis IV A. **Journal of Molecular Biology**, v. 423, n. 5, p. 736-751, 2012.

SALAS, A. et al. The Making of the African mtDNA Landscape. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, n.5, p. 1082-1111, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL**. 3. ed. 2001.

SANTOS, L. G.; SANTOS, R. S. A utilização do DNA mitocondrial para elucidação dos processos de evolução e variabilidade genética humana. **Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 8, n. 15, p.1720-1729, 2012.

SANTOS, M. V. et al. Mitochondrial variation in the Bahia- Brazil population. **InternationalCongress Series**, v. 1261, p. 404-406, 2004.

SCHWARTZ, M.; VISSING, J. Paternal InheritanceofMitochondrial DNA. **The New EnglandJournalof Medicine**, v. 347, n. 8, p. 576-578, ago. 2002.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 115-130, 2000.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n.12, p. 2725-2729, oct. 2013.

TANIERI, M. et al. Levantamento da Consanguinidade e Deficiência em 39 Municípios da Paraíba Brasil **Revista Saúde & Ciência**, Editora UFCG - Campina Grande, p. 35 - 35, jun. 2011.

TETZLAFF, S. et al. Mitochondrial DNA population data of HVS-I and HVS-II sequencesfrom a northeastGermansample.**Forensic Science International**, v. 172, n. 2-3, p.218-224, 2007.

TEXEIRA, J. C. et al. Mitochondrial DNA-controlregionsequencevariation in the NE PortugueseJewishcommunity. **Forensic Science International: GeneticsSupplement**, v.3, n. 1, p.51-52, 2011.

TORRONI, A. et al. A Signal, from Human mtDNA, of Postglacial Recolonization in Europe.**American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 4, p. 844-852, 2001.

TORRONI, A. et al.Asianaffinitiesand continental radiationofthe four foundingNative American mtDNAs. **American Journal of Human Genetics**, v. 53, n.3, p. 563-590, 1993a.

TORRONI, A. et al. mtDNAvariationofaboriginalSiberiansrevealsdistinctgeneticaffinitieswithNativeAmericans.**American Journal of Human Genetics**, v. 53, n.3, p. 591-608, 1993b.

TURCHI, C. et al. Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing. **International Journal of Legal Medicine**, v.122, n. 3, p. 199-204, 2008.

VALVERDE, L. et al. Segments HVI-I and HVS-II of mitochondrial DNA in population from Santa Catarina (Brazil): Predominance of European lineages. **Forensic Science International: Genetics Supplement**, v. 2, p. 338-339, 2009.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA Variation. **Human Mutation**, v. 30, n. 2, p. 386-394, 2009.

VIEIRA, T. et al. Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From Birth to Biochemical Diagnosis? **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146A, n. 13, p. 1741-1747, 2008.

Worldfamilies.net- Where Genealogy Meets DNA Testing. Disponível em: <<http://www.worldfamilies.net/>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

WRAITH, J. E. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. **Archives of Disease in Childhood**, v. 72, n. 3, p. 263-267, 1995.

**APÊNDICE A**–Haplótipos da região controle do DNAm identificadas nos pacientes com MPS IVA da Paraíba.

Haplótipo	Haplogrupo	Polimorfismos																		
Hp1	HV0	<b>16298C</b>	16319A	<b>72C</b>	263G															
Hp2	HV0	16298C	16319A	72C	263G	309.1C	309.2T	310C	324G											
<b>Hp3</b>	HV0	16124C	16298C	16319A	72C	263G	309.1C	309.2T	310C											
Hp4	HV0	16124C	16298C	16319A	72C	175d	184d	263G	309.1C	309.2T	310C									
Hp5	H4a1a1a3	16051G	16184T	16233T	<b>16287T</b>	16298C	16311C	16325C	16327T	<b>73G</b>	263G	310.1C	499A							
<b>Hp6</b>	A6b	16126C	16223T	16278T	<b>16290T</b>	<b>16319A</b>	16362C	73G	<b>146C</b>	152C	153G	<b>235G</b>	263G	297G	310.1C	515d	516d			
Hp7	HV0	16252d	16298C	16319A	72C	263G	309.1C	309.2T	310C											
Hp8	HV0	16298C	16319A	72C	263G	309.1C	309.2T	310C	549d											
Hp9	HV0	16124C	16252d	16298C	16319A	24d	72C	263G	309.1C	309.2T	310C									
Hp10	HV0	16298C	16319A	24d	72C	263G	310C	311T	316C											
<b>Hp11</b>	U6a1b1a	<b>16172C</b>	16219G	<b>16278T</b>	<b>16355T</b>	16519C	73G	<b>146C</b>	263G	309.1C	309.2T	310C								
Hp12	T2j	16018C	16092C	16126C	<b>16260T</b>	<b>16294T</b>	<b>16296T</b>	16519C	73G	263G	309.1C	309.2T	310C							
Hp13	B4b	<b>16217C</b>	16519C	73G	263G	310.1C	<b>499A</b>													
Hp14	U5b2a2	16093C	16172C	16189C	<b>16192T</b>	<b>16270T</b>	<b>16398A</b>	73G	<b>150T</b>	263G	309.1C	309.2T	310C							
Hp15	L3e1d	<b>16176T</b>	16223T	<b>16327T</b>	73G	150T	<b>152C</b>	189G	200G	263G	310.1C									
Hp16	L3f1b1a1	16129A	<b>16209C</b>	16223T	<b>16292T</b>	<b>16295T</b>	<b>16311C</b>	16519C	73G	<b>189G</b>	<b>200G</b>	236C	263G	<b>272G</b>	309.1C	309.2T	310C			
Hp17	L3e1a	<b>16185T</b>	16223T	16252d	<b>16327T</b>	16519C	95G	108A	115A	146T	160A	185G	196G	246.1A	263G	309.1C	309.2C	309.3C	309.4T	310C

**Nota:** Os haplótipos em destaque e negrito foram compartilhados entre os indivíduos. Os polimorfismos em negrito definem os haplogrupos.