



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

DENISE DE QUEIROGA NASCIMENTO

**ANCESTRALIDADE PATERNA DE PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A NO ESTADO DA PARAÍBA**

CAMPINA GRANDE – PB
2016

DENISE DE QUEIROGA NASCIMENTO

**ANCESTRALIDADE PATERNA DE PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A NO ESTADO DA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura), da Universidade Estadual da Paraíba como requisito à obtenção do título de graduada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Simone Silva dos Santos Lopes

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.

N244a Nascimento, Denise de Queiroga.
Ancestralidade paterna de pacientes com Mucopolissacaridose tipo IV-A no Estado da Paraíba [manuscrito] / Denise de Queiroga Nascimento. - 2016.
49 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. Ancestralidade Européia. 2. Marcadores genéticos. 3. Haplogrupos. 4. Mucopolissacaridose. I. Título.

21. ed. CDD 616.042

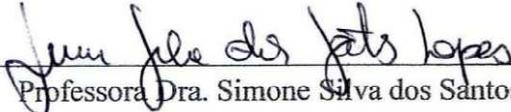
DENISE DE QUEIROGA NASCIMENTO

**ANCESTRALIDADE PATERNA DE PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A NO ESTADO DA PARAÍBA**

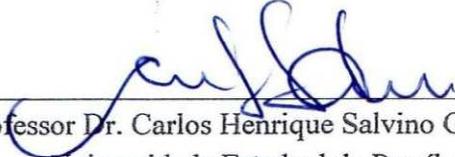
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura), da Universidade Estadual da Paraíba como requisito à obtenção do título de graduada em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 12 / 04 / 16

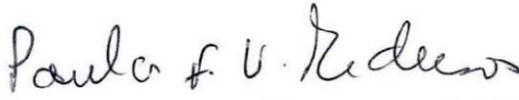
BANCA EXAMINADORA



Professora Dra. Simone Silva dos Santos Lopes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Orientadora



Professor Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Examinador(a)



Professora Dra. Paula Franssinetti Vasconcelos de Medeiros
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
Examinador(a)

A minha família é muito mais do que um agrupamento de pessoas que compartilham heranças genéticas, elas são pessoas escolhidas por Deus para me servir de alicerce nas boas e más horas. A ela eu dedico esse solene trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por toda vitalidade e força me dada para perseverar e não desistir dos meus sonhos.

À professora e orientadora Dr^a Simone Lopes, por ter me dado a oportunidade de descobrir esse universo genético pelo qual me apaixonei, além da confiança em mim depositada. Estendo o agradecimento também a Dr^a Paula do HUAC da UFCG por me ceder às amostras e as informações necessárias para a realização desse trabalho.

À minha querida família, meus pais Neide e Argemiro, meus irmãos Danielle e Danilo por todo o apoio me dado, incentivo e compreensão nas horas estendidas de estudo. Agradeço também a meu querido cunhado Rostand Célio, por ter me concedido um pouco dos seus conhecimentos e me auxiliado grandemente na estruturação desse trabalho, além dos conselhos dados para melhorar o presente trabalho. Sem eles tudo teria sido mais difícil.

Aos meus companheiros de laboratórios e a técnica Patrícia que puderam acompanhar os grandes desafios enfrentados para concretização desse trabalho, como também pelo laço de amizade e companheirismo, em especial Eliene, Mayla, Micaela, Nathalya, Álisson e Jessica na qual sentirei saudades.

Às minhas grandes companheiras de curso, Andreza Cantalice, Jéssica, Anna, Geilza, Sonally, Mayara, em especial Andreza Dellys, Kelly e Monalisa por terem participado dos meus momentos mais marcantes dentro da graduação, além da enorme amizade gerada dentro e fora da sala de aula.

À todos os meus amigos mais chegados que irmãos que não detalharei, mas sabem que mesmo não compreendendo o assunto abordado chegaram perto com cada palavra de incentivo, com cada ombro amigo e torceram pelo meu sucesso.

À todos que não citei, mas que de certa forma contribuíram direta e indiretamente para esse trabalho, seja com o patrocínio financeiro, apoio pessoal, profissional que para mim foi de extrema importância.

Enfim... A todos minha eterna e imensa gratidão.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender o desconhecido”

Albert Einstein

RESUMO

As MPS são um grupo de doenças genéticas herdadas de maneira autossômica recessiva. Elas são ocasionadas por um erro enzimático na qual compromete a degradação dos glicosaminoglicanos que são conseqüentemente acumulados nos lisossomos. No caso da MPS tipo IV-A a enzima deficiente é a n-acetil-galactosamina-6-sulfatase (GALNS) que leva ao acúmulo de queratan-sulfato no interior da célula. Essa doença pode ter sofrido uma contribuição genética migratória, visto que o Brasil descende de ancestrais europeus, africanos, e ameríndios. Essa miscigenação determinou um novo cenário na composição genética da população brasileira atual. Para entender as questões de origem e formação de populações modernas, a genética utiliza marcadores genéticos moleculares capazes de reconstruir a história de um povo. Os seguintes marcadores genéticos foram escolhidos por apresentar maiores freqüências nas regiões dos principais colonizadores, sendo o M343, SRY-1532, YAP e DYS199. Cada um deles demarca uma região geográfica na qual chamamos de haplogrupo e ao definir quais deles os pacientes derivam foi realizado uma comparação com os da população brasileira. O haplogrupo R* representa a região européia e dele se subdividem os haplogrupos R1a*, presente na Europa Oriental e o R1b* encontrado principalmente na região portuguesa. O marcador M343 (A/C) é definido pelo R1b* e o marcador SRY-1532 (A/G) determina o R1a*. O haplogrupo DE* encontrado na região Sub-Sahariana estendendo-se ao Norte da África é definido pelo marcador YAP (+/-) e o Q3, haplogrupo das regiões das Américas, é caracterizado pelo DYS 199(C/T). Por meio da utilização destes marcadores, aplicados ao cromossomo Y, considerado uma importante ferramenta para estudos ancestrais por conter em sua região não recombinante informações pré-históricas, o presente estudo teve por objetivo identificar a ancestralidade paterna de pacientes diagnosticados com MPS tipo IV-A no estado da Paraíba, a fim de encontrar a natureza e origem da doença. Foram analisados 14 pacientes sendo 9 homens e 5 mulheres, estas representadas por seus parentes do sexo masculino diretos. A partir das análises foi observada uma freqüência de 64,29% do haplogrupo R1b*, 21,43% do haplogrupo R* amplamente distribuído na Europa, 7,14% de ancestralidade africana e 7,14% da Europa oriental (R1a), além da ausência de contribuição ameríndia. De acordo com os dados históricos e genéticos obtidos neste estudo é possível inferir uma origem ancestral paterna européia para a MPSIV-A na Paraíba, tendo os alelos chegando a região com as famílias portuguesas que povoaram a região da Paraíba na época da colonização. Enquanto, que o elevado número de pacientes para MPSIVA encontrados no estado da Paraíba pode ser explicado pela presença dos fatores evolutivos observados na população como: consaguinidade e efeito fundador.

Palavras Chaves: Ancestralidade Européia, Marcadores genéticos, Haplogrupos.

ABSTRACT

Paternal ancestry of patients with mucopolysaccharidosis type IV-A in the state of Paraíba

The MPS are a group of inherited genetic diseases of autosomal recessive manner. They are caused by an enzymatic error in which compromises the degradation of glycosaminoglycans that are consequently accumulated in the lysosomes. In the case of MPS type IV-A case the deficient enzyme is n-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) which leads to accumulation of keratan sulfate inside the cell. This disease may have been a migratory genetic contribution, as Brazil descended from European, African and Amerindian ancestry. This miscegenation set a new scenario in the genetic composition of the current Brazilian population. To understand the origin issues and formation of modern populations, genetics uses a genomics variability known as molecular genetic markers to reconstruct the history of a people. The following genetic markers were chosen because they present the higher frequencies in the regions of the main colonizers, being the M343, SRY-1532, YAP and DYS199. Each staked a geographic region in which we call haplogroup and define their patients derive was carried out a comparison with the Brazilian population. The R * haplogroup is the European region and it subdivide the haplogroups R1a *, present in Eastern Europe and the R1b * found mainly in the Portuguese region. The marker M343 (A / C) is defined by R1b * and SRY-1532 marker (A / G) * determines 1a. The haplogroup DE * found in Sub-Saharan region extending to North Africa is defined by the label YAP (+/-) and Q3, haplogroup regions of the Americas, is characterized by the DYS 199 (C / T). Through the use of these markers, applied to the Y chromosome, which is considered an important tool for studies ancestors to contain in its non-recombinant region prehistoric information, the current study aimed to identify the paternal ancestry of patients diagnosed with MPS type IV-A in the state of Paraíba, in order to identify the nature and origin of the disease. 14 patients were analyzed, 9 males and 5 females, represented by their direct male relatives. From the analysis it was possible to observed a frequency of 64.29% haplogroup R1b *, 21.43% of the haplogroup R * widely distributed in Europe, 7.14% of African ancestry and 7.14% from Eastern Europe (R1a) besides the absence of Amerindian. According to the historical and genetic data obtained in this study it is possible to infer a European paternal ancestral origin for MPSIV -A Paraíba, and alleles reaching the region with the Portuguese families who settled the region Cariri at the time of colonization. While the large number of patients to MPSIVA found in the state of Paraíba can be explained by the presence of evolutionary factors observed in the population as inbreeding and founder effect.

Key words: European ancestry, genetic markers, haplogroups.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa do Estreito de Bering.....	19
Figura 2 Regiões do cromossomo Y.....	22
Figura 3 Árvore filogenética dos haplogrupos do cromossomo Y.....	24
Figura 4 Haplogrupo R1b*.....	26
Figura 5 Amplificação do marcador YAP.....	36
Figura 6 Resultados do marcador SRY 1532.....	37
Figura 7 Sequenciamento do cromossomo Y.....	38
Figura 8 Cromatograma do paciente M1.....	38
Figura 9 Cromatograma do paciente M8.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das MPS	29
Tabela 2 - Distribuição das amostras sanguíneas coletadas	31
Tabela 3 - Marcadores utilizados no cromossomo Y.	32
Tabela 4 - Enzimas de restrição utilizadas nas análises.	34
Tabela 5 Resultado final da ancestralidade paterna.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Resultado total dos haplogrupos do cromossomo Y encontrados em parentes diretos e pacientes diagnosticados com MPS IV-A na Paraíba	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	Desoxinucleotídeo tri-fostato
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EXO I	Exonuclease I
GAG	Glicosaminoglicanos
GALNS	Gene Galactosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
HUAC	Hospital Universitário Alcides Carneiro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MPS	Mucopolissacaridose
Mb	Mega pares de bases
NCBI	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
NRV	<i>Non-recombining Region of Y-chromosome</i> (Região não recombinante do cromossomo Y)
PAR	Região autossômica

pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia de Polimerase
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> - Polimorfismo de Ponto
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
UEP	<i>Unique event polymorphisms</i> - Polimorfismo de Evento Único
YAPY-Alu	<i>insertion polymorphism</i> (Polimorfismo de inserção Alu no cromossomo Y)
YCC	Consórcio do cromossomo

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

μl Microlitro

μM Micromol

mM Milimolar

°C Graus Cs

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Povoamento das Américas.....	18
2.2	Povoamento do Brasil.....	19
2.3	História da Paraíba.....	20
2.4	Cromossomo Y.....	21
2.5	Marcadores e haplogrupos do cromossomo Y.....	25
2.5.1	Haplogrupo R.....	25
2.5.2	Haplogrupo Q3.....	26
2.5.3	Haplogrupo DE*.....	27
2.6	Doenças genéticas.....	27
2.6.1	Mucopolissacaridoses.....	28
2.6.1.1	MPS tipo IV-A.....	28
3.	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	31
3.1	Sujeito da Pesquisa.....	31
3.2	Etapas da Pesquisa.....	31
3.3	Extração de DNA.....	31
3.2.2	Reação em cadeia de Polimerase (PCR).....	31
3.3	Digestão enzimática.....	33
3.3.1	Sequenciamento das amostras.....	34
3.3.1.1	Análise dos dados sequenciados	34
4.	RESULTADOS	35
4.1	Determinação ancestral pelo iniciador YAP e DYS199.....	35
4.2	Análise do SRY 1532.....	36
4.3	Sequenciamento M343.....	36
4.4	Haplogrupos encontrados	38
5.	DISCUSSÃO	40
6.	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	APÊNDICE- Extração orgânica de DNA do sangue	49

1 INTRODUÇÃO

A origem da espécie humana, *Homo sapiens*, sucedida a cerca de 100-150 mil anos atrás tem instigado diversas pesquisas científicas em áreas distintas, por exemplo, a arqueologia, linguística e genética para entender como se deu o surgimento dessa linhagem. Os conhecimentos genéticos tem se destacado entre essas pesquisas por contribuírem significativamente para o estudo da evolução do homem moderno, buscando reconstruir a história evolutiva a partir do DNA (LEITE, 2012).

A genética desenvolvida por meio de marcadores de ancestralidade e aplicada ao cromossomo Y e ao DNA mitocondrial proporciona informações complementares que podem reconstruir a história genética de um povo e o grau de parentesco filogenético entre populações (PENA, 2000). Esses marcadores são capazes de detectar polimorfismos genéticos diretamente no DNA. O cromossomo Y, em específico, por ter uma única parte que exibe a herança paterna clássica, é uma grande ferramenta para essa reconstrução histórica e de grande interesse em estudos de linhagem patrilinear (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003), visto que sua distribuição geográfica contém informações sobre a colonização subsequente, diferenciações e também migrações pré-históricas (UNDERHILL et al. 2001).

O Brasil descende de ancestrais africanos, europeus e ameríndios (PENA, 2000). Uma das circunstâncias que levam a miscigenação são os processos migratórios, na qual são capazes de dispersar a diversidade genética e inserir novas características tanto genóticas como fenotípicas naquela população. Em uma dessas inserções podem ocasionar mutações genéticas que por sua vez influenciam nos fatores evolutivos de um povo (MACHADO, 2012). As doenças genéticas são um exemplo, na qual as que foram registradas no Brasil possivelmente podem ter sua ancestralidade ligada aos imigrantes que formaram a população no passado, dentre elas a MPS: Mucopolissacaridose (MACHADO, 2012). Esta é considerada uma doença rara por ocorrerem com pouca frequência ou raramente na população em geral. Para os indivíduos com doenças raras, esta raridade tem muitas consequências desfavoráveis, tanto médicas como sociais. A MPS tipo IV-A ou síndrome de Mórquio tipo A, é uma doença rara de herança autossômica recessiva causada pela deficiência de uma enzima responsável por degradar os GAG's: Glicosaminoglicanos (BORGES, et al., 2003). A Rede MPS Brasil em parceria com diversos centros médicos brasileiros auxilia no atendimento e no diagnóstico de

pacientes com MPS (FEDERHEN, et al., 2010). De acordo com essa rede, até dezembro de 2012 foram diagnosticados no país 1001 pacientes com vários tipos dessa doença genética. Na Paraíba, o HUAC- Hospital Universitário Alcides Carneiro é referência no tratamento desses pacientes diagnosticados com essa síndrome na região.

Visto que há uma elevada frequência de MPS tipo IV-A na Paraíba, o intuito desse trabalho é descobrir a origem paterna dos pacientes com MPS tipo IV-A na região paraibana e verificar se há uma ligação da ocorrência dessa doença na região com a chegada dos imigrantes no processo de colonização. Os resultados obtidos irão contribuir no aconselhamento genético da população da região.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar a ancestralidade paterna de pacientes com MPS tipo IV-A diagnosticados e acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro- HUAC da Universidade Federal de Campina Grande- UFCG no Estado da Paraíba.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Obter informações dos pacientes do sexo masculino e parentes diretos das pacientes do sexo feminino que se encontram em tratamento no HUAC;
- b) Padronizar os marcadores genéticos (DYS199, M343, YAP, SRY1532) nas amostras;
- c) Definir a ancestralidade paterna dos pacientes por meio de marcadores do cromossomo Y;
- d) Analisar a frequência dos haplogrupos (Q3, R1b*, R1a e DE*) encontrados nos pacientes e nos parentes diretos das pacientes do sexo feminino;
- e) Comparar as frequências dos haplogrupos encontrados com as populações matrizes da população brasileira.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Povoamento das Américas

A história do povoamento das Américas continua em discussão, sendo a teoria que mais aceita é que grupos humanos dispersando-se pelo continente asiático avançaram em direção ao leste siberiano, alcançando o atual Estreito de Bering e penetrando na América (Figura 1). Essa entrada no território americano se deu ao longo da última glaciação, quando a retenção das águas nas grandes geleiras continentais causou o abaixamento do nível global dos oceanos em aproximadamente 120 metros abaixo do nível atual, permitindo que superfícies amplas que antes estavam submersas emergissem (LIMA, 2006).

Devido o surgimento da ponte entre 40.000 e 13.000 anos atrás, que conectou a Ásia a América no Estreito de Bering, muitas migrações foram realizadas em longos espaços de tempo. Segundo Santos e Bonatto (2004) essas migrações ocasionadas pela ponte, explicam a formação dos nativos americanos. Porém, ainda há muitas controvérsias sobre esse povoamento, tanto no que diz respeito ao número de ondas migratórias, a data da primeira migração e a localização geográfica das populações que deram origem a esses povos. O único consenso que há sobre o povoamento da América, segundo dados arqueológicos, lingüísticos, antropológicos e genéticos os grupos progenitores dos nativos americanos eram caçadores coletores vindos da Ásia pelo Estreito de Bering no final do Pleistoceno e se dispersaram rapidamente por todo o continente (SANTOS; TARAZONA-SANTOS, 2002).



Figura 1. Mapa do Estreito de Bering, a rota mais aceita para explicar o povoamento das Américas. (Fonte: http://prof15nho.blogspot.com.br/2013_11_01_archive.html).

2.2 Povoamento do Brasil:

Há cerca de 500 anos, o continente americano começou a ser colonizado pelos europeus, determinando um novo cenário na composição genética da região continental e mais precisamente o Brasil (LEITE, 2012). Historicamente, devido o processo de colonização, a população brasileira é descendente de europeus, ameríndios e africanos. Portanto, a nação brasileira é considerada uma das populações mais heterogêneas do mundo (CARVALHO-SILVA et. al., 2001).

Entre 1820-1975 cerca de seis milhões de europeus entraram no Brasil, na qual 70% destes eram portugueses e italianos (MACHADO, 2012). Outros imigrantes também vieram entre eles espanhóis, alemães, sírios, libaneses e japoneses (IBGE, 2000) que se espalharam de forma heterogênea entre as diversas regiões do Brasil. Para Callegari-Jacques e Salzano (1999) os imigrantes que chegaram ao território brasileiro entre 1500 e 1972 eram divididos em 58% de europeus, 40% os africanos e apenas 2% eram asiáticos.

O processo de miscigenação iniciou com os primeiros colonizadores e intensificou ainda mais pela necessidade de povoar a colônia e garantir o domínio português, já que estes colonos enfrentavam constantes ameaças de outros países a fim de invadir o território brasileiro (LOPES, 2007). Desde o início, a migração europeia foi marcada por quase exclusivamente homens e até 1808, segundo Ribeiro (1995), estima-se que cerca de 500.000 portugueses chegaram à nação brasileira. Os africanos vieram no século XVI a fim de servirem de mão-de-obra escrava nos canaviais e mais a frente

nas minerações e plantações de café. Posteriormente, outros imigrantes chegaram ao Brasil no século XIX quando houve a abertura dos portos do Brasil para nações amigas (PENA, 2000).

Entre os anos de 1880 e 1920, os portugueses foram cada vez mais estimulados a vir ao Brasil, tornando a população predominantemente branca européia. Sabe-se também que havia uma grande população judaica concentrada em Portugal em 1509 até serem expulsos pela Inquisição, na qual muitos se tornaram “cristãos-novos” e imigraram em grande quantidade para o Brasil trazendo o cromossomo Y europeu (PENA, 2002).

A constituição genética atual dos indivíduos considerados de cor branca obteve consideradas contribuições portuguesas pelo fato dos senhores de terra terem tido filhos com índias ao chegarem a território nacional e formarem os primeiros ramos da família brasileira, dando vez aos processos de miscigenação (MONTEIRO, 1996), em contrapartida, a baixa frequência de africanos e ameríndios pode ser explicada pela pouca reprodução destes com mulheres brancas (WAIZBORT, 2003).

2.3 História da Paraíba:

Segundo os dados estatísticos do IBGE (2010) a Paraíba possui uma população equivalente a 3.766.528 pessoas. No mesmo ano, o Censo realizou uma pesquisa e 52,7% das pessoas se declaram parda, 39,8% branca, 5,7% negra e 1,8% amarela ou indígena.

Ao buscar a história do estado, verifica-se que esta também é fruto de miscigenação. A miscigenação ocorreu principalmente entre as mulheres nativas e os portugueses, já que a imigração das mulheres européias era insignificante (CARVALHO SILVA et. al., 2001).

Os colonizadores portugueses ao chegarem nesse território se depararam primeiramente com a resistência dos nativos americanos que se incomodavam com a tentativa de invasão. Antes dos portugueses pisarem na Paraíba, os franceses já estavam estabelecidos aqui. Interessados no pau-brasil, os franceses tinham uma relação de amizade, estes criaram laços com os potiguaras, índios nativos, e se uniam matrimonialmente com as índias (RIBEIRO, 1995). Para que os portugueses ganhassem força nessa batalha, eles conseguiram conquistar os índios tabajaras e jogá-los contra os índios potiguaras, ambos eram primitivos ocupantes da terra, mas que se divergiam.

Em 5 de agosto de 1585 foi oficializada a fundação da Paraíba. Os tabajaras aceitaram o domínio português e concordaram com o estabelecimento desses no território, mesmo indo contra os seus irmãos potiguaras. Toda a estratégia política administrativa dos portugueses objetivava a subordinação da Paraíba a Portugal. Daí por diante estes se expandiram e colocavam os escravos para trabalhar nos engenhos de açúcar a fim de lucrar com esse grande negócio. Os tabajaras, unidos aos novos moradores do território, marcharam contra os potiguaras e o resultado disso foi à emigração dos potiguaras para o Rio Grande do Norte e a diminuição dos franceses no litoral do estado (MELLO, 2013)

O império português crescia na região por meio dos grandes engenhos de açúcar feitos pela mão escrava dos africanos e essa riqueza atraiu os holandeses. O controle holandês sobre a Paraíba durou apenas vinte anos, de 1634 a 1654 e mesmo assim, nunca foi um domínio total e a miscigenação não foi estimulada (FELINTO, 2000). Entretanto os portugueses atraídos pela beleza feminina do território conquistado iniciaram os primeiros ramos de família. Sérgio Pena (2000) diz em seus trabalhos voltados a ancestralidade do cromossomo Y: o Brasil é um refúgio da masculinidade portuguesa.

2.4 Cromossomo Y:

O cromossomo Y representa aproximadamente 2% do genoma humano e tem aproximadamente 24 Mb (Mega¹ pares de bases) de comprimento (JOBLING; TYLER-SMITH, 2003). Estudos realizados em 1950-1960 afirmam que esse cromossomo contém poucos genes, existindo apenas 76 genes que codificam 27 proteínas (SKALETSKY et. al., 2003). Composto por três porções distintas: duas regiões nas extremidades dos braços curtos e longos do cromossomo, que possuem mesma sequência, mesmo gene, com o cromossomo X na qual sofrem recombinação, sendo conhecidas como regiões pseudo-autossômicas (PAR 1 e PAR 2) e a terceira é a porção Y- específica, que constitui mais de 90% do cromossomo sendo esta a região que não sofre recombinação, ou seja, não trocam genes com outro segmento genômico (Figura 2)

¹Mega equivale a 10⁶ unidades (um milhão de partes)

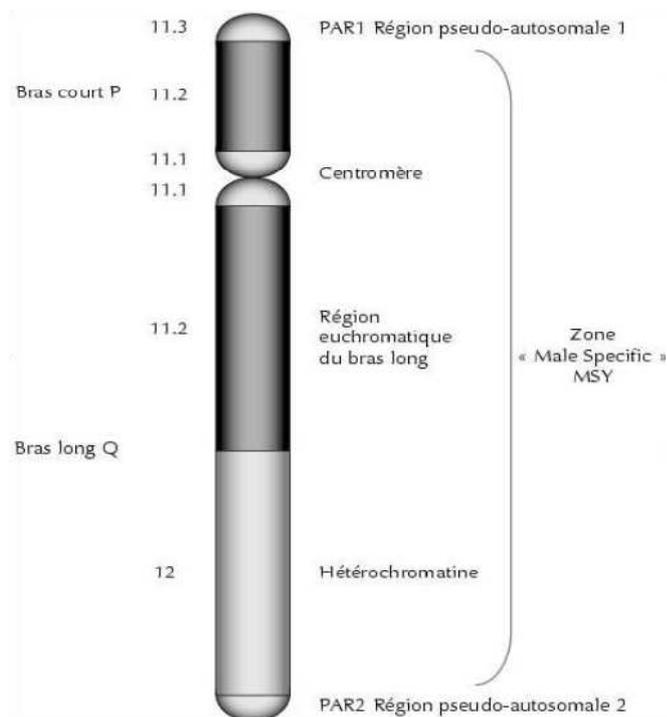


Figura 2. Regiões do cromossomo Y, incluindo as regiões pseudo-autossômicas e a região específica do cromossomo Y. (Fonte: http://www.jle.com/fr/revues/mte/e-docs/chromosomes_et_infertilite_masculine_263878/article.phtml?tab=images, 2004).

A região não recombinante do cromossomo Y (NRY) possui polimorfismos que podem sofrer alterações com relativa frequência, na qual esse tipo é chamado de microsatelites ou STRs, mas também há os polimorfismos que apresentam mutações raras, que ocorrem apenas uma única vez, este chama-se de polimorfismo de base única ou SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que normalmente são bialélicos e são um tipo de UEP (*Unique event polymorphism*) (THOMAS et al., 2000).

Os SNPs geralmente são ocasionados por uma substituição de nucleotídeos que não foram reparados durante a replicação de DNA e assim a maioria destas mutações é mais comum serem herdadas no decorrer das gerações do que ser uma mutação nova (SERRE e HUDSON, 2006). Esses polimorfismos vêm sendo identificados na região não recombinante do cromossomo Y e por esse motivo, os marcadores bialélicos aplicados a essa região são considerados excelentes marcadores de linhagem. Com a base desses dados é possível indicar com precisão a origem de um determinado cromossomo Y (HUNEMEIER, 2006). Sua importância foi atribuída também a estudos associados à identificação de variantes associadas a doenças e drogas (PENA, 2007).

Esse polimorfismo possui baixa taxa de mutação e podem ser facilmente reconhecidos em estudos ancestrais e derivados. Além disso, são facilmente

genotipados em técnicas rápidas e simples como a reação em cadeia de polimerase (PCR). Dessa forma, novas informações geradas descobriram a história evolutiva das populações humanas tanto nativas (BORTOLLINI et al., 2003) como miscigenadas (BORTOLLINI et al., 2004).

A combinação de alelos para uma série de UEPs do cromossomo Y, na qual possui uma distribuição geográfica conhecida, chamamos de haplogrupo (SANTOS, 2004) (Figura 3). Formar esses haplótipos a partir de marcadores com velocidade mutacionais diferentes proporciona importantes informações para a genética populacional (SANTOS, 2004), pois além de englobar estudos evolutivos com o cromossomo Y englobam também estudos de interesse histórico. Graças a esse aumento de informações e organização genética, nos últimos anos ocorreram grandes pesquisas a partir da porção não recombinante do cromossomo Y. Hoje a filogênese humana do cromossomo Y está padronizada em um sistema de nomenclatura (YCC, 2002), na qual auxilia as linhas de pesquisa do cromossomo Y por permitir uma classificação sistemática e não ambígua de novos haplogrupos que fossem descobertos (FIGUEIREDO, 2012).

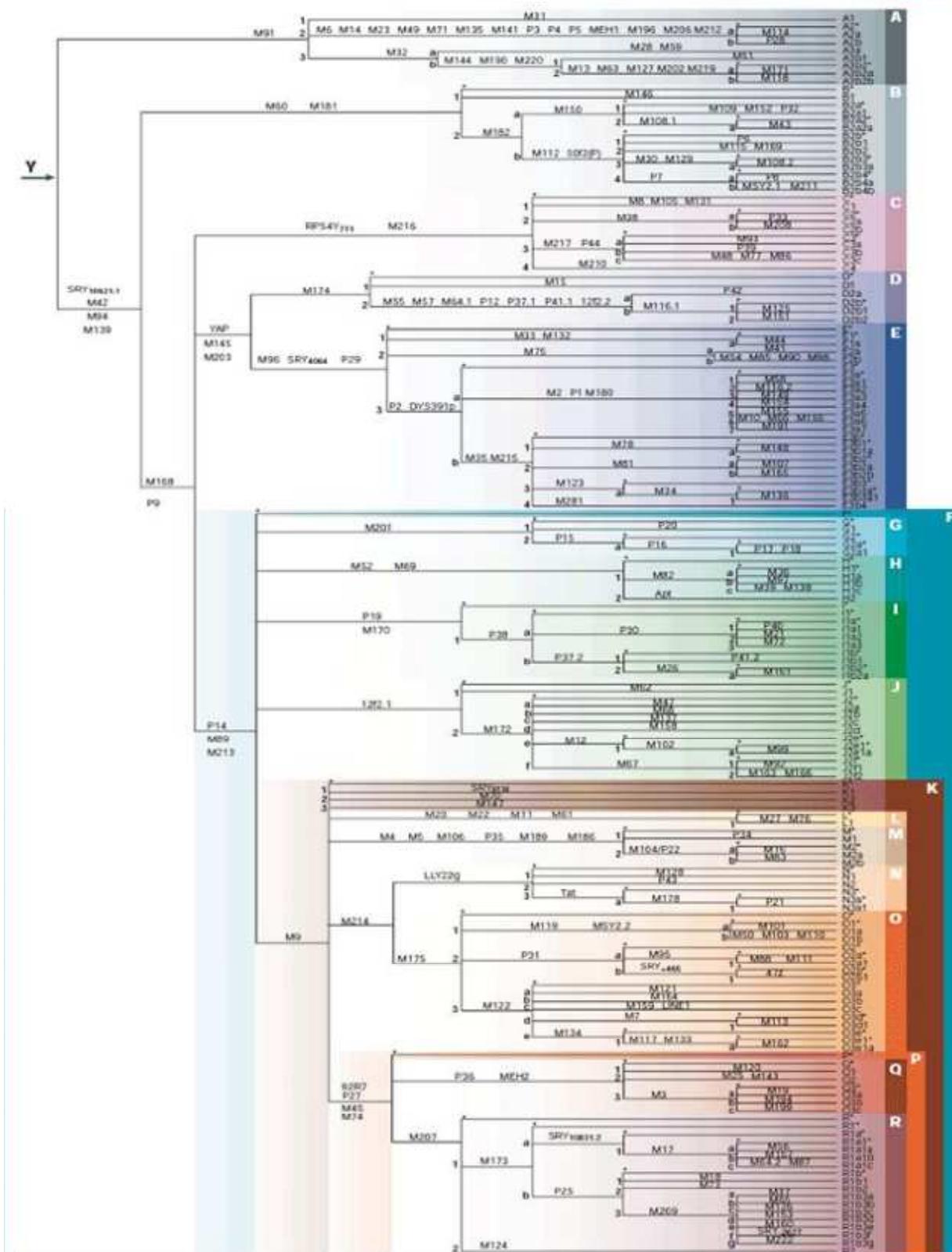


Figura 3. Árvore filogenética dos haplogrupos do cromossomo Y. (Fonte: The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age, 2003).

2.5 Marcadores e haplogrupos do cromossomo Y:

Para esclarecer questões de origem e evolução do homem, a genética busca utilizar uma variabilidade genômica como ferramenta para compreender o cenário evolutivo. Essa variabilidade nos estudos genéticos é denominada de marcadores genéticos moleculares (CAVALLI-SFORZA, 1998). Grandes induções históricas geográficas a respeito de eventos relacionados a processos migratórios e de colonização têm sido obtidas por meio destes marcadores (LEITE, 2006).

Os marcadores genéticos escolhidos nesse estudo levaram em conta a história da miscigenação brasileira, visto que os europeus, ameríndios e africanos exploraram essa o território brasileiro. Dessa forma, os haplótipos dessas populações são definidos pelos marcadores M343 (haplogrupo R1b*), SRY 1532 (haplogrupo R1a), YAP (haplogrupo DE*) e DYS199 (haplogrupo Q3*).

2.5.1 Haplogrupo R

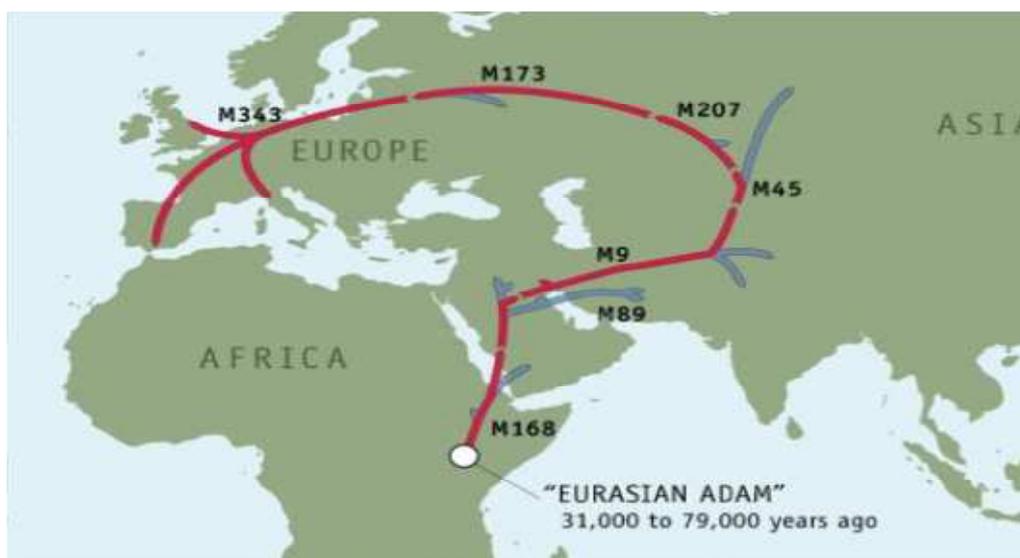
O haplogrupo europeu geral do cromossomo Y é representado como R*. A partir dele ramificam-se os outros haplogrupos europeus, que tem uma grande contribuição na formação da genética na população brasileira. Ela consiste em dois subgrupos: R1a e R1b. O R1a encontra-se frequentemente na parte leste da Europa, concentrado na Europa Oriental e o R1b é freqüente na parte oeste do continente europeu, compreendendo a Europa Ocidental e Central (CHIARONI, 2009).

O R1a surgiu na Ásia Central, aparentemente no Sul da Sibéria e a aproximadamente 8.000 a 9.000 anos atrás se espalharam pela parte leste da Europa e Ilhas Britânicas. É encontrado em 62% da população da Rússia, e 55% da população da Bielorrússia, Polônia e Ucrânia (KLYOSOV et al., 2012). O haplogrupo R1a pode ser analisado por meio do marcador SRY 1532, caracterizada pela substituição do nucleotídeo A para G, sendo A o alelo ancestral e G o alelo derivado, na posição 1532 do gene SRY no braço curto do cromossomo Y (RAMANA et al, 2001).

A origem e a história do sub-haplogrupo R1b preenche quase 60% da Europa Ocidental e Central, além disso, este pode estar presente na Ásia Menor, Oriente Médio, muitos locais da Ásia Central, Noroeste da China entre outras regiões (KLYOSOV, 2012). O R1b é caracterizado pela transversão de C para A, sendo o A o alelo derivado e o C alelo ancestral. Segundo afirmações históricas a população era relativamente

homogênea geneticamente, caracterizadas pela mutação M173 no Cromossoma Y, e posteriormente viriam a desenvolver a mutação M343, originando o Haplogrupo R1b (

Figura 4). Esse polimorfismo, por sua vez, é mais freqüente principalmente na população portuguesa, holandesa e francesa. Todas essas populações européias estiveram no Brasil e fizeram parte da história paraibana também. Mas segundo pesquisas de Sérgio Pena e seus colaboradores (2000) voltadas para a ancestralidade



brasileira, a população portuguesa prevalece, na qual 98% dos haplogrupos do cromossomo Y encontrados são atribuíveis à fonte européia e principalmente direcionados aos portugueses.

Figura 4. Haplogrupo R1b. Marcador M343. (Fonte: Haplogroup R1b (M343): Cro-Magnon blueollie, 2011).

2.5.2 Haplogrupo Q3

O principal marcador dos nativos americanos, o DYS199 na qual define o haplogrupo Q3, pode também influenciar nas investigações genealógicas. Esse marcador originou-se provavelmente na Beringia, depois que imigrantes asiáticos deixaram a Sibéria (SANTOS et. al., 1999). A baixa frequência na Sibéria, muito provavelmente foi devido à migração reversa da América para a região (UNDERHILL et. al., 1996).

A grande maioria dos cromossomos Y analisados dos nativos americanos apresenta como ancestral um cromossomo colonizador que contém a mutação (transição de C para T) que define o DYS199, indicando dessa forma, que as migrações deste vieram da Ásia, pelo menos do cromossomo Y, e foram direcionadas a terras virgens americanas. Mas uma pequena parcela dos nativos americanos não possui essa mutação que os fazem participar do DYS199 e que estão presentes em outras populações na Ásia, Europa e África. Se analisarmos em detalhes é provável que esses nativos americanos sejam provenientes das populações européias ou africanas por esses povos terem chegado à América depois de 1492 (PENA, 2002).

2.5.3 Haplogrupo DE*

Em se tratando da África, como se sabe, o Brasil recebeu uma grande porção de escravos provenientes dessa região. Estes fazem parte do haplogrupo DE* que surgiu a cerca de 50.000 anos no Noroeste da África ou no Oriente Médio, podendo ser definido pelo marcador de ancestralidade o YAP(+/-) (OLIVEIRA, 2011).

O cromossomo Y contendo o YAP é conhecido também por apresentar a inserção Alu. Esta é definida pela presença ou ausência de aproximadamente 300 pb no genoma. A maioria dessas inserções é recente, muitas vezes polimórfico e podem ter diferentes frequências em diversas populações humanas. Além disso, é pouco improvável encontrar a mesma inserção Alu no mesmo lugar e por esse motivo são importantíssimos nos estudos para entender a evolução humana (PEREIRA, 2010). Uma inserção Alu pode determinar alterações no gene e as formações dessas mutações podem permitir a definição de um grupo.

O YAP é particularmente útil em estudos voltados para genética de populações, pois é uma inserção Alu e dessa forma a sua não recombinação oferece resultados rápidos e precisos por meio de PCR e técnicas de eletroforese. Os estudos feitos por Batzer e Deininger (2002), revelaram que o elemento Alu no cromossomo Y é inserido na mesma posição em diferentes indivíduos de amostras populacionais diferentes, considerando que a inserção YAP+ destes indivíduos tem um ancestral comum. Esse marcador genético, YAP, é mais encontrado na África Sub-Sahariana e estendendo-se ao Norte da África (HAMMER; HORAI, 1995). Raramente pode ser encontrado na Europa, assim como na Oceania e Ásia (HAMMER, 1994), com exceção apenas do Japão, na qual possui alta frequência.

2.6 Doenças genéticas:

Após várias décadas ainda é possível encontrar populações com características ancestrais conservadas. Um dos fatores que podem manter essa conservação genética são os casamentos endogâmicos que além de diminuir a variabilidade genética da população, favorece também ao aparecimento de características recessivas que podem ocasionar doenças genéticas (MACHADO, 2012). Essas uniões sofrem a ação evolutiva e interfere de certa forma nas frequências genéticas. Estudos revelam que a associação entre a ancestralidade e a ocorrência de determinadas doenças genéticas existe e dependendo do grupo ou região geográfica pode haver um risco diferencial (PENA, 2005; HABER et. al., 2011).

Quando se trata de doenças genéticas, elas podem ser monogênicas, quando a mutação ocorre em um único gene, podem ser cromossômicas, quando a mutação afeta a estrutura ou numeração dos cromossomos, ou multifatoriais, quando ocorre uma combinação dos fatores ambientais com a mutação em genes múltiplos e mitocondriais (MACHADO, 2012). Além disso, elas podem ser classificadas como dominantes, quando apenas um alelo que sofreu mutação é o responsável pela doença e recessivo quando há a necessidade de dois alelos mutados para que a doença genética seja expressa. Geralmente, as doenças genéticas denominadas recessivas possuem uma incidência populacional baixa, na qual o acontecimento frequente de casamentos endogâmicos é que pode elevar essa frequência. Estudos revelam que aborto, esterilidade, ocorrência de malformações entre filhos gerados em casamentos consanguíneos é maior do que os filhos nascidos de pais não aparentados (ALRIFAI, WOODY, 2007).

Uma das doenças consideradas raras, que podem ter sofrido contribuição genética migratória são as MPS. Desde abril de 2004 a setembro de 2006 foram diagnosticados 161 casos de MPS, além de 88 novos casos previamente diagnosticados. A incidência no Brasil é de 1:1.298.469 nascidos vivos (MABE et. al., 2004).

2.6.1 Mucopolissacaridoses:

As MPS são um grupo de doenças genéticas herdadas de maneira autossômica recessiva, com exceção apenas da MPS tipo II, na qual é uma herança ligada ao X (VIEIRA, 2007). Elas são ocasionadas pelo erro na atividade de uma das onze enzimas lisossômicas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos (GAGs). A degradação

prejudicada leva conseqüentemente, ao acúmulo intralisossômico dessa substância, que além de serem acumulados na célula também são secretados em grande quantidade na urina dos pacientes diagnosticados com MPS. O resultado é um comprometimento na função celular e orgânica, além de levar a um grande número de manifestações clínicas que afeta progressivamente múltiplos órgãos (VIEIRA, 2007).

As MPS foram divididas em sete principais tipos (Tabela 1) dependendo da enzima que está deficiente e quanto ao substrato que se acumula (NEUFELD, MUENZER, 2001). Essa doença compromete principalmente o sistema esquelético e cardiopulmonar, córnea, pele, fígado, baço, cérebro e meninges (SCHWARTZ et. al., 2001).

Tabela 1 - Classificação das MPS

Tipo de MPS	Nome	Enzima Deficiente	Sigla	GAGs na urina
I	Hurler, Huler-Scheie, Scheie	α - iduronidase	IDUA	Dermatan e Heparan Sulfato
II	Hunter	Iduronato-2-sulfatase	IDS	Dermatan e Heparan Sulfato
IIIA	Sanfilippo A	Heparan-N-sulfatase	SGSH	Heparan Sulfato
IIIB	Sanfilippo B	α -N-acetilglicosaminidase	NAGLU	Heparan Sulfato
IIIC	Sanfilippo C	AcetilCoA: α -glicosaminaacetiltransferase	GNAT	Heparan Sulfato
IIID	Sanfilippo D	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	G6S	Heparan Sulfato
IVA	Morquio A	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	GALNS	Queratan Sulfato
IVB	Morquio B	β - galactosidase	GLBI	Queratan Sulfato
VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina-4-sulfatase	ARSB	Dermatan Sulfato
VII	Sly	β -glicuronidase	GUSB	Dermatan e Heparan Sulfato
IX	Natowicz	Hialuronidase	HYALI	Ácido Hialurônico

Fonte: Adaptado de NEUFELD; MUENZER, 2001

O desenvolvimento da doença é progressivo e o envolvimento é multissistêmico. A maioria das crianças diagnosticadas nasce normalmente e apenas mais a frente no decorrer dos primeiros anos de vida irá apresentar os primeiros sinais e sintomas da doença (VIEIRA, 2007). O diagnóstico é feito primeiramente a partir de suspeita

clínica. O médico encaminha para o exame laboratorial e identifica a quantidade de GAGs na urina (GIUGLIANI et. al., 2010; WOOD et. al., 2012). Posteriormente realiza-se um teste qualitativo para identificar o tipo de GAGs que está em alta concentração na urina. Para essa doença não há cura, mas os efeitos podem ser minimizados por meio da terapia de reposição enzimática (TRE) que é um tipo de tratamento já disponível para os tipos I, II, IV e VI.

2.6.1.1 MPS tipo IV-A:

A MPS tipo IV-A é uma doença autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima n-acetil-galactosamina-6-sulfatase (GALNS) levando ao acúmulo de queratan-sulfato no interior da célula. Esse GAGs é um componente da N-acetilgalactosamina formando um componente presente nas cartilagens e córneas. O gene para o GALNS está localizado no cromossomo 16q24.3 e possui 14 exons. Alterações silenciosas e polimorfismos já têm sido descritos. Cerca de 140 mutações já foram estudadas e aproximadamente 70% dessas mutações são do tipo missense ou também chamada de mutação sem sentido (TOMATSU et. al., 2005).

As manifestações mais evidentes e precoces é o comprometimento das articulações e do sistema esquelético (CAMELIER, 2011). Essa síndrome também é caracterizada por baixa estatura, doença óssea grave e inteligência mental normal, deformação nas mãos, pescoço curto, entre outros sinais. Ela foi descrita pela primeira vez em 1929 por um médico pediatra uruguaio, Luis Morquio, na qual este descreveu uma família com quatro crianças afetadas que apresentaram os sintomas da doença cujos pais eram primos de primeiro grau (NEUFELD; MUENZER, 2001).

Segundo Santos et al (2013), a endogamia e os casamentos consanguíneos são frequentes nos estados do nordeste brasileiro. Recentemente com o desenvolvimento dessas análises de consaguinidade na população, Santos e seus colaboradores puderam descobrir uma doença genética, na qual denominaram de Síndrome de Spooan e segundo eles há uma ligação com os casos de consaguinidade. Nessa pesquisa, os municípios do Rio Grande do Norte e da Paraíba mostraram que de 9% a 41% dos casamentos são entre membros da mesma família e isso ocasiona o aumento de recessividade nos indivíduos, levando a formação de doenças genéticas.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Sujeitos da Pesquisa

Foram analisados 14 pacientes, sendo 9 do sexo masculino, e 5 parentes diretos do sexo feminino. As amostras sanguíneas coletadas, no caso de pacientes no sexo feminino, foram oriundas de parentes diretos, tais como: pais ou tios(

Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das amostras sanguíneas coletadas

	AMOSTRAS	
	ORIGEM	QUANTIDADE
Homens	Próprio paciente	9
Mulheres	Pais ou Tios	5

Fonte: Próprio autor a partir dos resultados da pesquisa, 2016.

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

3.2 Etapas da Pesquisa

3.2.1 Extração de DNA:

A extração do DNA foi realizada a partir do sangue das amostras coletadas no HUAC. Esse procedimento foi realizado seguindo um protocolo modificado de extração orgânica com o fenol-clorofórmio (SAMBROOK et. al., 1989).

3.2.2 Reação em cadeia de Polimerase (PCR):

Para a amplificação do DNA, foram utilizados os marcadores descritos na Tabela 3 que foram padronizados e aplicados nas amostras sanguíneas.

Todos os marcadores foram analisados separadamente em reações de PCR com condições diferentes. No marcador M343 foi utilizado de 1-2 μ L de DNA, dependendo da amostra. Foram aplicados 0,25 mM: milimolar de dNTP: desoxinucleotídeo trifostato, 1,15 mM de tampão IB (KAPA) 10x, 0,8 μ M de iniciadores diretos e 0,8 μ M de iniciador reverso, 1U de Taq polimerase (KAPA). Ao término da reação, seguiu ao termociclador (Veriti 96 Thermo Fisher) com o programa que possui 35 ciclos distribuídos a 95°C para 5 minutos para a desnaturação inicial, 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. O resultado foi visualizado em uma cuba horizontal de eletroforese contendo gel de agarose a 1% com brometo de etílio e tampão TAE 0,5X.

Tabela 3 - Marcadores utilizados no cromossomo Y para a análise de ancestralidade dos pacientes de MPS tipo IV-A do HUAC.

Marcador	Seqüências ^{5'} – 3'	pb:Pares de Base	Modo de Detecção	Haplogrupo	Região	Referência
SRY-1532	TCCTTAGCAACCATTAAATCTGG AAATAGCAAAAAAATGACACACAAGGC	167pb ou 112pb e 55pb	Em gel ¹ (Dra III)	R1a*	Europa	(RAMANA; SINGH; CHAKRABORTY, 2001)
M343²	TCTGATTCCGACAAAGGCTC CACCTTTGTCCTCTTGCTC	194pb	Seqüenciamento	R1b*	Europa	(ROTHE, 2014)
DYS199	TAATCAGTCTCCTCCAGCA AGGTACCAGCTCTCCCAATT	202pb	Em gel ¹ (Mfe I)	Q3	Ameríndia	(UNDERHILL <i>et. al.</i> , 1996)
YAP	CAGGGGAAGATAAAGAATA ACTGCTAAAAAGGGATGGAT	150pb ou 455pb	Em gel	DE*	África	(HAMMER; HORAI, 1995)

¹ Gel de poliacrilamida a 8% com enzima de restrição; ² rs9786184

Fonte: Própria autora a partir dos dados da pesquisa, 2016.

Para a reação de PCR do marcador YAP foram 12,5 µL de volume final, 1,0 µL de DNA, 0,18 mM de dNTP, 1,15 mM de tampão 10x, 0,14µM de iniciador direto e 0,14µM de reverso, 1U de Taq polimerase (KAPA). As condições de amplificação com 30 ciclos divididos em 94 °C para 2 minutos, 94 °C para 1 minuto, 51°C para 1 minuto e 72 °C para 1 minuto. O produto de PCR foi visualizado em gel de poliacrilamida a 8% após 2 horas de corrida em TBE 0,5X e corado com nitrato de prata.

No SRY 1532 foram preparados um volume final de 12,5 µL, 1,0 µL de DNA, 0,18 mM de dNTP, 1,15 mM de tampão 10x, 0,58µM de iniciador direto e 0,58µM de reverso, 1U de Taq polimerase. Seguiu para o termociclador com 32 ciclos e desnaturação inicial de 95°C para 10 minutos, 94°C para 30 segundos, 56°C para 20 segundos, 72°C para 1 minuto e 72°C para 10 minutos. O resultado da PCR foi visto em gel de poliacrilamida a 8% após 2 horas de corrida em TBE 0,5X. Após confirmação do funcionamento da PCR em gel, esta seguiu para a digestão enzimática a 37 °C por overnight e foi submetida posteriormente ao gel de poliacrilamida 8% e nitrato de prata para verificação dos resultados.

Para o marcador DYS199 cada amostra recebeu 1µL DNA, 1,15 mM de tampão 10X, 0,18 mM de dNTP, 0,23µL de iniciador direto e 0,23 µL de reverso, 1U de Taq polimerase. Foram 30 ciclos sendo distribuídos em 94°C para 2 minutos, 94°C para 1 minuto, 61°C para 1 minuto, 72°C para 1 minuto e 72°C para 5 minutos. Posteriormente submetidos à digestão enzimática em banho Maria com 37 °C em overnight. A análise foi realizada no gel de poliacrilamida a 8% e visualizada em nitrato de prata.

3.3 Digestão enzimática:

Os marcadores analisados por enzima de restrição, DYS199 e SRY 1532, tiveram o produto de PCR digeridos por uma enzima específica que permitia diferenciar os alelos alternativos. Na Tabela 4 encontram-se as condições da digestão de cada um. No SRY 1532 utilizou-se a enzima *DraIII* com 0,5µL de tampão 1X, 0,2 µL da enzima específica, 5 µL de PCR, 4,3 µL de água mili-q e 10 µL de óleo mineral. No DYS199 utilizando a enzima *Mfe I* foram aplicadas nas mesmas condições do SRY 1532. Após o término da digestão, encubados a 37 °C em overnight, as amostras foram analisadas por meio do gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata.

Tabela 4 - Enzimas de restrição utilizadas nas análises.

Enzima	Fabricante/tampão	Temperatura
<i>Dra III</i>	FERMENTAS	37 °C
<i>Mfe I</i>	FERMENTAS	37 °C

Fonte: Própria autora a partir dos dados da pesquisa, 2016.

3.3.1 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 foram purificadas utilizando as enzimas hidrolíticas EXO I (Exonuclease I), que tem por função digerir o excesso de primerse SAP (ShrimpAlkalinePhosphatase) que é utilizada para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Em seguida, a PCR foi submetida à reação com BigDyeTerminatorv3.1 CycleSequencing kit, usando 4,75µl de água ultra pura, 1,75µl de tampão de sequenciamento 5X, 0,5µl de DyeTerminator, 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 e então sequenciados bidirecionalmente em sequenciadores automáticos de DNA: ABI PRISM 3500XL GeneticAnalyzer, de 24 capilares.

3.3.1.1 Análise de dados sequenciados:

Para a verificação da qualidade da sequência foram utilizados o programa GeneticAnalyzer 3.0 (Applied Biosystems) e o SequencingAnalysis v.5.1. Em seguida, após verificação da qualidade da sequência, foi feita a junção da sequência forward com a sequência reverse de cada amostra utilizando o programa Bioedit. A fim de encontrar a ancestralidade das amostras submetidas ao sequenciamento estas foram submetidas ao alinhamento múltiplo realizado pelo programa Mega6.

4 RESULTADOS

Foram analisados os seguintes marcadores do cromossomo Y: SRY 1532, YAP, DYS199 e o M343. Sendo estes analisados a 14 amostras coletadas para estudo.

A submissão das amostras a cada marcador seguiu um padrão hierárquico, na qual não sendo definido por um marcador passava-se para o próximo. Cada um deles define um haplogrupoespecífico como descrito anteriormente na tabela 2. Com essa descrição e manuseio correto dos iniciadores foi possível verificar a contribuição de diferentes populações na variabilidade genética do cromossomo Y das amostras em estudo.

4.1 Determinação ancestral pelo iniciador YAP e DYS199.

Os pacientes apresentam ancestralidade não africana, marcada pela presença do fragmento de 150 pb resultando em YAP negativo. Apenas um paciente da amostra, M2, apresentou YAP positivo, sendo identificado pelo aparecimento da inserção de 450 pb, como mostrado na Figura 5 abaixo. O paciente M5 foi repetido e os demais que restam acrescentados posteriormente para confirmação do resultado e estes também foram negativos para ancestralidade africana.

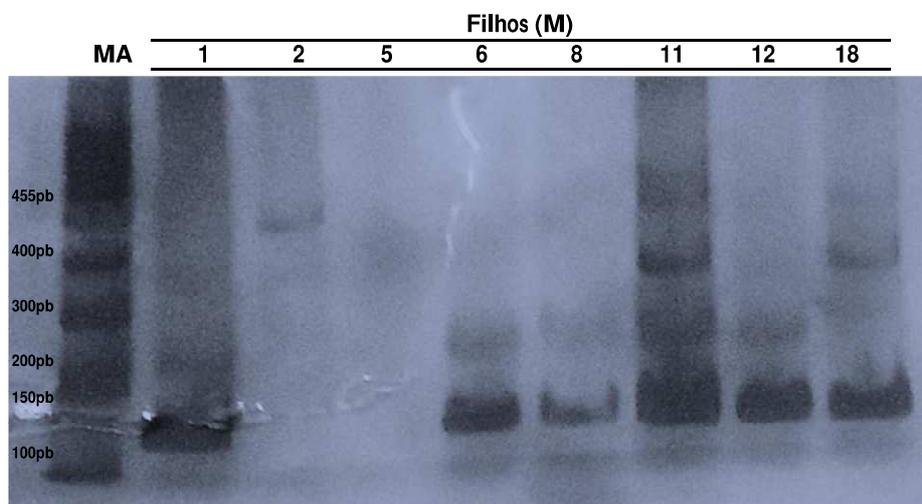


Figura 5 - Amplificação do marcador YAP. Ma (marcador) de 100pb; M (pacientes); YAP positivo inserção 450pb e YAP negativo 150pb. (Fonte: Própria autora a partir dos dados da pesquisa, 2016).

Quanto ao marcador DYS199, nenhuma amostra submetida apresentou contribuição ameríndia em seu cromossomo Y.

4.2 Análise do SRY 1532:

Definido pela transversão de A para G, sendo A o alelo ancestral e G o alelo derivado para o haplogrupo R1a, apenas uma amostra, como demonstrada na imagem a seguir, apresentou contribuição europeia oriental, região onde este haplogrupo prevalece.

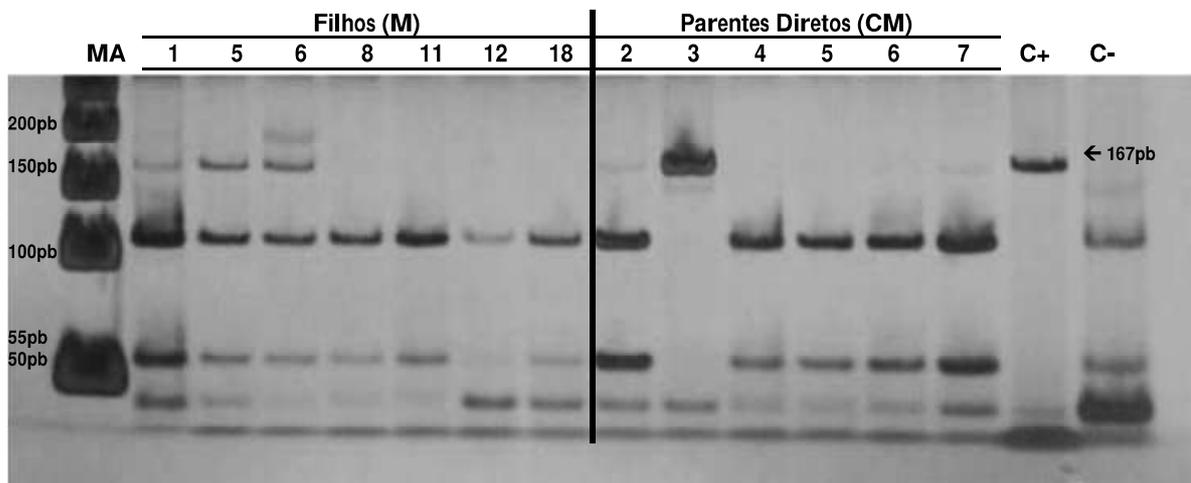


Figura 6—Resultados do marcador SRY 1532 em gel de agarose 1%. Ma (marcador) de 100 pb. 167pb – R1a; 112pb e 55pb – descendência europeia; M (filhos); CM (pais/tios das pacientes); C+ (controle positivo); C- (controle negativo).Fonte: Própria autora a partir dos dados da pesquisa,2016.

Os demais pacientes não mostrados na imagem foram sendo acrescentados ao gel no decorrer do trabalho. Apenas o CM3 apresentou o fragmento de 167 pb, confirmando a presença do alelo G, que define o haplogrupo R1a. Os demais pacientes obtiveram o fragmento de 112 pb e 55 pb, dando o alelo A que está presente em outras regiões européias como por exemplo a Europa Ocidental.

4.3 Sequenciamento M343:

A classificação ancestral dos pacientes quanto ao haplogrupo R1b* foi feita por meio de sequenciamento. O alinhamento da seqüência referência européia adquirida do banco de dados do NCBI com as seqüências das amostras da pesquisa foi feita no programa Mega6. Essa seqüência referência possui ao total 1001 pares de bases no seu gene e para que o alinhamento fosse otimizado (alinhamento local) a seqüência direta e a seqüência reversa do marcador M343 (rs9786184) retirada do trabalho do autor ROTHE (2014) foi encontrada e o fragmento desejado foi utilizado. A mutação se

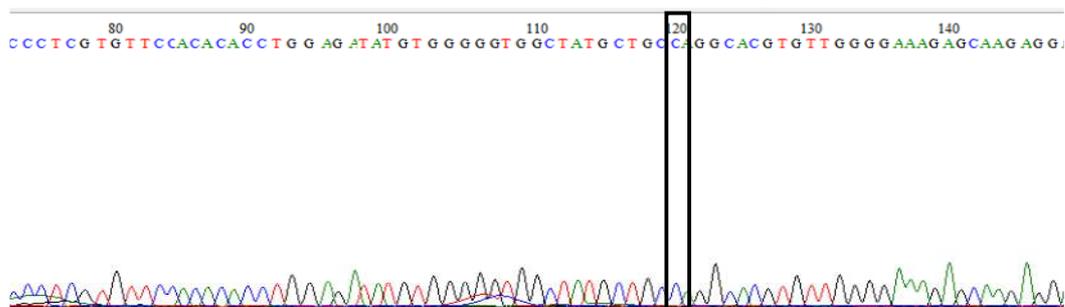


Figura 9 Cromatograma do paciente M8

A paciente M15 não foi seqüenciada por ser da família paterna direta do paciente M14, dessa forma o resultado apresentado pelo M15 também representa a ancestralidade desta por serem da mesma família.

4.4 Haplogrupos encontrados:

Na Tabela 5 encontra-se os haplótipos, a ancestralidade e o respectivo haplogrupo encontrado nas amostras.

Tabela 5 Resultado final da ancestralidade paterna dos pacientes e parentes diretos

Paciente/ Parentes diretos	Alelo	Ancestralidade	Marcador	Haplogrupo
M1	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
M2	+	África	YAP	DE*
M5	C	Europeu	M343	R*
M6	C	Europeu	M343	R*
M8	C	Europeu	M343	R*
M11	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
M12	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
M14	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
M15	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
M18	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
CM2	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
CM3	G	Europeu Oriental	SRY 1532	R1a
CM7	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*
CM22	A	Europeu Ocidental	M343	R1b*

Fonte: Própria autora a partir dos dados da pesquisa, 2016.

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

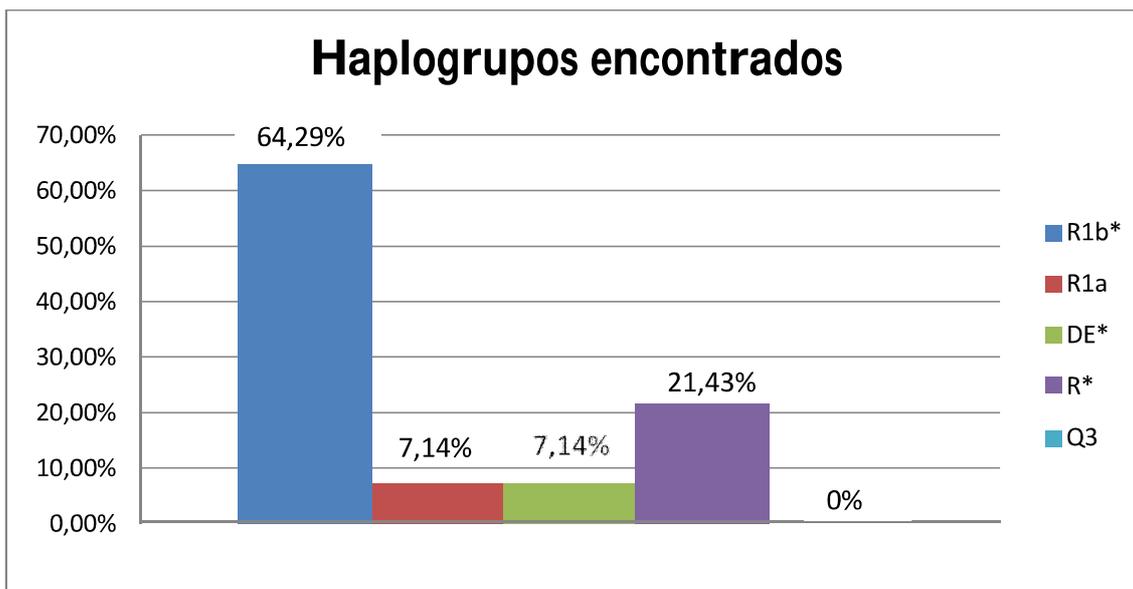


Gráfico 1 Resultado total dos haplogrupos do cromossomo Y encontrados em parentes diretos e pacientes diagnosticados com MPS IV-A na Paraíba. Fonte: Própria autora a partir dos dados da pesquisa, 2016.

O haplogrupo que prevaleceu foi o R1b*, visto que este é presente em sua maioria na Europa Ocidental, em evidência na região portuguesa. A segunda maior porcentagem foi dada ao R*, na qual sua presença caracteriza a região europeia e dele surgiram os subgrupos que podem definir mais precisamente outras regiões continentais. Os haplogrupos DE* e R1a foram encontrados em pequena quantidade, demonstrando que a contribuição dos Europeus orientais e os africanos não foram relevantes em comparação aos portugueses. Observa-se ainda que o haplogrupo Q3, característico dos ameríndios, está completamente ausente na população analisada, mostrando que estes derivaram em grande maioria das populações asiáticas. Outra parcela mínima desse haplogrupo pode ser encontrada em poucas populações europeias, africanas e asiáticas.

5 DISCUSSÃO

Os dados obtidos corroboram com os estudos anteriores relacionados à ancestralidade da população brasileira, na qual confirma o padrão de miscigenação que o Brasil obteve durante sua conquista e nessa mistura a contribuição européia, principalmente portuguesa do cromossomo Y.

Apesar de ser uma doença rara, na Paraíba os casos de MPS IV-A apresentam um número elevado em relação a outras regiões. Além disso, um fator comum encontrado no histórico dos pacientes é que a maioria destes apresenta casos de consanguinidade na família. Como se sabe a consanguinidade pode ser um fator para o aumento da doença. No heredograma dos pacientes dessa pesquisa encontram-se famílias com mais de uma pessoa afetada com essa patologia. Dentre as catorze pessoas submetidas à análise de ancestralidade paterna, apenas quatro não tinham vínculo familiar com outro participante. Os demais eram parentes próximos, como irmãos e tios ou tias paternos. Esses casos de consanguinidade no nordeste não são raros, visto que segundo a pesquisa desenvolvida por Santos e colaboradores (2013) em cinco municípios do Rio Grande do Norte e no Nordeste brasileiro, na qual entrevistou 7.639 casais (correspondente a cerca de 40% de toda a população dos distritos estudados) revelou alta frequência de casamentos entre parentes variando de 9% para 32%. Esses dados segundo esses pesquisadores, mostraram a presença de uma associação direta entre consanguinidade e uma doença genética que denominaram Síndrome de Spooan.

No norte de Portugal, a MPS é mais encontrada com incidência de 1:167000 (FULLER et al., 2006) enquanto que no Brasil a incidência de MPS tipo IV-A equivale a 1:1.298.469 nascidos vivos (MABE et. al., 2004).

A maior porcentagem atribuída ao haplogrupo R1b, freqüente na Europa Ocidental, confirma o domínio português ao chegarem no território paraibano. Os estudos realizados por Pena e colaboradores (2000) relacionados à patrinhagens brasileiras afirma que a contribuição genética européia predomina no Brasil, principalmente ligada aos portugueses.

A segunda maior porcentagem desse estudo foi atribuída ao haplogrupo R* com 21,43%. Este, por sua vez, define o continente europeu e a partir dele se sucede os sub-haplogrupos, R1a e R1b. A presença do R* nas amostras confirma mais uma vez a significativa contribuição genética que os europeus deixaram na região. Uma pesquisa de genotipagem feita com brasileiros por Callegari-Jacques e colaboradores (2003)

constata mais uma vez as contribuições ameríndias, africanas e européias que o Brasil recebeu, com predominância principal européia. Segundo Pereira (2010) a proibição do tráfico de escravos em 1850, a elevada mortalidade da população negra e o forte estímulo a imigração européia, além da intensa miscigenação gerou uma alteração na composição étnica da população brasileira. Os europeus foram os principais responsáveis por essa alteração. Segundo Soares-Vieira *et al.*, (2008), os vários estudos realizados (Costa et al., 2002; Domingues et al., 2007; Silva et al., 2006) desenvolvidos em diferentes populações brasileiras mostraram que a origem do cromossomo Y nacionalmente é quase exclusivamente européia.

Os africanos, representados pelo haplogrupo DE*, puderam deixar poucas contribuições genéticas no território paraibano. Os portugueses foram os únicos a efetivar uma colonização africana antes do século XIX e isso permitiu um alto fluxo de escravos. Uma das explicações plausíveis para a baixa presença de Y africano na genética dessa população é vista no processo de colonização, na qual 80% dos escravos comprados eram adultos e dois terços deles eram homens. Isso gerou um impacto negativo no crescimento da população do país na qual eles chegavam. Os escravos africanos apresentavam uma faixa etária muito distorcida e quando chegavam ao Brasil, à estrutura geral da população era incompatível para reproduzir-se. O preço alto desses também influenciou, onde a presença negra na Paraíba foi menor em comparação aos demais estados nordestinos (FREYRE, 2003). A união entre portugueses e mulheres escravas era um fator raro.

Além disso, no Brasil no século XIX, havia a liberdade voluntária de crianças e mulheres, enquanto que entre os homens predominava a compra (LIBBY; PAIVA, 2000). Com a emancipação dos escravos e contratação de lavradores europeus para trabalhar nos cafezais, que os afro-brasileiros se tornaram minoria na população (KLEIN, 1986).

A ausência de registros genéticos ameríndios também foi analisada. Apesar de estudos históricos afirmarem que os primeiros americanos vieram pelo estreito de Bering da Sibéria, a forma como estes se fixaram no território da América ainda é cercado por imensas discussões e incertezas (SILVA et al., 2002). Além disso, essas populações ameríndias em estudos de marcadores moleculares uniparentais e biparentais têm mostrado que a variabilidade genética entre os ameríndios no continente americano é resultado de um isolamento geográfico destes. Esta variabilidade pode estar associada à deriva genética e o efeito fundador que interfere em grupos pequenos

(MACHADO, 2012). Segundo os estudos de Alves-Silva e seus colaboradores (2000) em uma amostra de mais de 200 indivíduos, nenhum haplogrupo ameríndio foi encontrado na linhagem patrilinear brasileira, mostrando que os indígenas deixaram poucos descendentes.

No ano de 1500 essa população ameríndia foi reduzida, pois segundo o IBGE (2000), apenas 0,36% da população no nordeste se declararam nativos americanos. Os dados moleculares também confirmam a contribuição mais baixa desse grupo populacional em comparação com aos europeus e africanos (FELIX et al., 2010).

Outro motivo com embasamento histórico que também pode ter ocasionado a restrição dos nativos americanos na Paraíba é justificado pela forte influência que os europeus exerciam sobre estes. Os nativos americanos, os potiguaras, emigraram em sua maioria para o Rio Grande do Norte por questões de conflito com os colonizadores (MELLO, 2013) e o grupo nativo que permaneceu no estado paraibano, os tabajaras, mantiveram vínculo matrimonial com os portugueses. Foi a partir dessas relações entre portugueses e nativos americanos que os primeiros ramos da família foram sendo estabelecidos. Além disso, as mulheres brancas européias não eram frequentes entre estes colonizadores e dessa forma com o alvará de 4 de abril de 1755, a miscigenação foi ainda mais incentivada ao afirmar que os portugueses que se casassem com mulheres indígenas não ficariam infames (ALMEIDA, 1980).

Os dados observados corroboram com os dados históricos do povoamento da Paraíba, principalmente da região do Cariri, início do povoamento no estado sendo descrita por serem iniciados por famílias de portugueses. (Em comunicação pessoal com o historiador Durval Lelys).

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que a MPS IV-A pode estar associada com a ancestralidade européia, visto que os pacientes apresentaram maior contribuição dessa região equivalente a 92,86% distribuídos entre os haplogrupos R*, R1a* e R1b*. A descendência portuguesa se sobressai entre os pacientes e esses dados encontrados confirmam os fatos históricos do povoamento da Paraíba, na qual foi iniciada por famílias portuguesas. Os ameríndios não se fizeram presente e os africanos mostraram-se em pequena quantidade sustentando os fatos genéticos das pesquisas anteriores relacionadas ao cromossomo Y.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. A. **A Paraíba e seus problemas**. A União Companhia Editora [S.l.] p.721, 1980.
- ALRIFAI, M. T.; WOODY, R. C. Marriage patterns and pediatric neurologic disease in Damascus, Syria. **Pakistan Journal of Neurology Science**, v. 2, p. 136-140, 2007.
- ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **The American Journal of Human Genetics**. V.67, p.444-461, 2000.
- BAIXAR MAPAS. (2015). Mapa da Paraíba - Mesorregiões. Acesso em 11 de outubro de 2015, disponível em Baixar Mapas: <http://www.baixarmapas.com.br/mapa-da-paraiba-mesorregioes/>
- BATZER, M.A.; DEININGER, P. L. Alu repeats and human genomic diversity. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 5, p. 370-379, 2002.
- BLUEOLLIE. (15 de Novembro de 2011). Haplogroup R1b (M 343): Cro-Magnon blueollie. Acesso em 20 de Outubro de 2015, disponível em Blueollie: <https://blueollie.wordpress.com/2011/11/15/haplogroup-r1b-m-343-cro-magnon/>
- BORGES, M. F. et al. Mucopolissacaridose tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy): avaliação endócrina de três casos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 1, p. 87-94, 2003..
- BORTOLINI, M. C. et al. The phylogeography of mitochondrial DNA haplogroup L3g in Africa and the Atlantic slave trade. **American journal of human genetics**, v. 75, n. 3, p. 523, 2004.
- BORTOLINI, M.C et al. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. **The American Journal of Human Genetics**, v. 73, n. 3, p. 524-539, 2003.
- CALLEGARI-JACQUES S.M e SALZANO F.M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciencia e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 51: 166-174, 1999.
- CAMELIER, M.V. **Diagnóstico de Mucopolissacaridose tipo IV-A em amostras de sangue impregnado em papel filtro**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, 2011.
- CARVALHO-SILVA, D. R. et. al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 1, p. 281-286, 2001.
- CAVALLI-SFORZA, L. L. The DNA revolution in population genetics. **Trends in Genetics**, v. 14, n. 2, p. 60-65, 1998.
- 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.
- COSTA, N.A. et al. Y-chromosome variation in a Rio de Janeiro, Brazil, population sample. **Forensic Sci Int** 126:254-257, 2002.

DOMINGUES, P.M, et al. Sub SaharanAfricadescendents in Rio de Janeiro (Brazil): Populationandmutational data for 12 Y-STR loci. **Int J Legal Med** 121:238-241, 2007.

FEDERHEN, A. et al. **Diagnóstico diferencial das Mucopolissacaridoses: a experiência da Rede MPS Brasil**. VI Congresso Brasileiro de Triagem Neonatal. XXII Congresso Brasileiro de Genética Médica. Salvador, 2010.

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

FELIX, Gabriela ES et al. Ancestry informative markers and complete blood count parameters in Brazilian blood donors. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 4, p. 282-285, 2010.

FIGUEIREDO, R. F. **Estudo de SNPs do cromossomo Y na população do Estado do Espírito Santo**, Brasil. 2012.

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

FULLER, M.; MEIKLE, P. J.; HOPWOOD, J. J. **Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview**.2006.

GIUGLIANI, R. et. al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. **Genetics and molecular biology**, v. 33, n. 4, p. 589-604, 2010.

HABER, M.; et. al. mtDNA Lineages Reveal Coronary Artery Disease-Associated Structures in the Lebanese Population. **Ann Hum Genet**.Oct 20. 2011.

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. **American journalofhumangenetics**, v. 56, n. 4, p. 951, 1995.

HUNEMEIER, T. **Filogeografia dos cromossomos Y e das linhagens mitocondriais de origem africana em populações negras brasileiras**.Porto Alegre. Tese de mestrado. 2006.

IBGE. **Brasil: 500 Anos de Povoamento**. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Rio de Janeiro. p 219, 2000

IBGE. **Censo Demográfico 2010**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro. 2010.

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.

KLEIN, H. S. **African slavery in Latin America and the Caribbean**. Oxford University Press, 1986.

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. 01, p. 1, 2012.

LEITE, F.P.N. **Análiseda estrutura genética da população do Rio Grande do Sul através de microssatélites autossômicos e de cromossomos sexuais**. Tese de doutorado. Porto Alegre, 2006.

LEITE, T.K.M. **Variabilidade genética na população brasileira: ancestralidade genômica e fenótipos de capacidade cardiovascular**. Tese de doutorado. Brasília, 2012.

LIBBY, D. C.; PAIVA, C. A. Manumission practices in a late eighteenth-century Brazilian Slave Parish: São José d'El Rey in 1795. **Slavery and abolition**, v. 21, n. 1, p. 96-127, 2000.

LIMA, Tania Andrade. O povoamento inicial do continente americano: migrações, contextos, datações. **SILVA, HP; CARVALHO, CR Nossa Origem, Rio de Janeiro: Ed. Vieira & Lent**, 2006.

LOPES, S.S.S. et al. A worldwide phylogeography for the human X chromosome. **PLoS One**, v. 2, n. 6, p. e557, 2007.

MABE, P. et. al. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. **Clinica chimica acta**, v. 345, n. 1, p. 135-140, 2004.

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

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

MONTEIRO, J. M. As' raças' indígenas no pensamento brasileiro do Império. **Raça, ciência e sociedade**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 15-22, 1996.

NEUFELD, E.; MUENZER, J. "The mucopolysaccharidoses" In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. **New York: McGraw Hill**. p.3421-3452, 2001.

OLIVEIRA, R. C. **Genealogia Genética e Ciências Sociais. Um estudo de caso da Ilha Terceira, Açores, Portugal**. Universidade Federal do Paraná. 457-465, 2011

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

PENA, S. D. J. Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. **Hist. ciênc. saúde-Manguinhos**, v. 12, n. 2, p. 321-346, 2005.

PENA, S. D. J. The evolution and structure of human genetic diversity. **Pharmacogenomics in Admixed Populations**. Austin: Landes Bioscience, Available: <http://www.eurekah.com>, 2007.

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

PEREIRA, J.F. **Análise de polimorfismo de inserção Alu como marcadores de ancestralidade em estudo caso-controle de coronariopatas do Estado da Bahia.** Tese de mestrado. 2010.

RAMANA, G.; SINGH, L.; CHAKRABORTY, R. The SRY-1532 site of the human Y chromosome is subject to recurrent single nucleotide mutations. **Humanbiology**, v. 73, n. 1, p. 71-80, 2001.

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

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.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning.** New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SANTOS, F. R. et al. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. **The American Journal of Human Genetics**, v. 64, n. 2, p. 619-628, 1999.

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

SANTOS, F. R.; TARAZONA-SANTOS, E. A história do povoamento pré-colombiano das Américas e o cromossomo Y humano. **Homo brasilis: Aspectos Genéticos, Linguísticos, Históricos e Culturais da Formação do Povo Brasileiro**, 2002.

SANTOS, S. S. **Análise de variabilidade genética de populações dos Andes.** Tese de mestrado Belo Horizonte, 2004.

SANTOS, S. et al. As causas da deficiência física em municípios do Nordeste brasileiro e estimativa de custos de serviços especializados. **CienSaude Colet**, v. 19, n. 1, p. 1-2, 2013.

SCHWARTZ, I. et al. Mucopolissacarídeos. In: Carakushanski G. Doenças Genéticas em Pediatria. 1ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 180-184, 2001.

SERRE, D.; HUDSON, T.J. Resources for genetic variation studies. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 7:443-457. 2006.

SILVA D.A, et al. Y-chromosome genetic variation in Rio de Janeiro population. **Am J Hum Biol**. n. 18. p. 829-837, 2006.

SILVA, Wilson A. et al. Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 1, p. 187-192, 2002.

SKALETZKY, Helen et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 825-837, 2003.

SOARES-VIEIRA, J. A. et al. Population and mutation analysis of Y-STR loci in a sample from the city of São Paulo (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 651-656, 2008.

THOMAS, Mark G. et al. Y chromosomes traveling south: the cohen modal haplotype and the origins of the Lemba—the “Black Jews of Southern Africa”. **The American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 2, p. 674-686, 2000.

TOMATSU, S. et. al. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). **Human mutation**, v. 26, n. 6, p. 500-512, 2005.

UNDERHILL, P. A. et al. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. **Annals of human genetics**, v. 65, n. 01, p. 43-62, 2001.

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.

VIEIRA, T. A. **História natural das mucopolissacaridoses: uma investigação da trajetória dos pacientes desde o nascimento até o diagnóstico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

WAIZBORT, R. **A busca de inteligibilidade na cultura brasileira: fragmentos de um retrato evolutivo**. Programa de Pós-graduação em História das Ciências da Saúde. História, Ciências, Saúde- Manguinhos, Rio de Janeiro. Vol 10. n 3. p 1105-113, 2003.

WOOD, T. et al. Expert recommendations for the laboratory diagnosis of MPS VI. **Molecular genetics and metabolism**, v. 106, n. 1, p. 73-82, 2012.

YCC.Y CHROMOSOME CONSORTIUM et al. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. **Genomeresearch**, v. 12, n. 2, p. 339-348, 2002.

APÊNDICE:**Extração orgânica de DNA do sangue**

1. Em um tubo de eppendof(2 ml) colocar 300 µl de sangue de cada amostra;
2. Adicionar no tubo contendo o sangue, 500 µl de solução de lise de Madissen previamente aquecida em banho Maria;
3. Posteriormente, adicionar 15 µl de proteinase K (20 mg/ ml) em cada amostra;
4. Dar vórtex (10 segundos);
5. Encubar em banho Maria a 56 °C (overnight);
6. Retirar as amostras e dar vórtex (10 segundos);
7. Adicionar o mesmo volume que está no eppendof de fenol (800 µl);
8. Homogeneizar por 10 minutos (manualmente);
9. Centrifugar 10 minutos a 13:000 rpm (rotação por minuto) a 4 °C;
10. Remover o sobrenadante para um novo tubo e adicionar o volume recuperado de cada amostra o clorofórmio: álcool isoamílico (24:1);
11. Homogeneizar por 10 minutos (manualmente);
12. Centrifugar por 10 minutos a 13:000 rpm a 4°C;
13. Remover o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 100 µl de acetato de sódio e completar 2x o volume recuperado de etanol 100% gelado (verificar a precipitação do DNA);
14. Centrifugar por 15 minutos a 13:000 rpm a 4°C;
15. Descartar o sobrenadante e inverter o tubo. Deixar secar na estufa por 30 minutos a 37 °C (verificar se secou). Caso não tenha secado deixar por mais tempo;
16. Após tirar da estufa adicionar 100 µl de etanol gelado e centrifugar por 15 minutos (13:000 rpm a 4 °C). Descartar o sobrenadante e deixar secar.
17. Adicionar 100 µl de TE;
18. Colocar no banho Maria por 30 minutos a 37 °C;
19. Armazenar no congelador a -20 °C.