



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

ELIENE DE FRANÇA SILVA

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-
C COM MARCADORES DE LINHAGEM: ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL**

CAMPINA GRANDE-PB

OUTUBRO 2016

ELIENE DE FRANÇA SILVA

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-
C COM MARCADORES DE LINHAGEM:
ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento as exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

CAMPINA GRANDE-PB

OUTUBRO 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.

S586a Silva, Eliene de França.

Ancestralidade de pacientes com Mucopolissacaridose tipo III-C com marcadores de linhagem [manuscrito] : uma análise do DNA mitocondrial / Eliene de França Silva. - 2016.

45 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. DNA mitocondrial. 2. Mucopolissacaridose. 3. Ancestralidade. I. Título.

21. ed. CDD 572.86

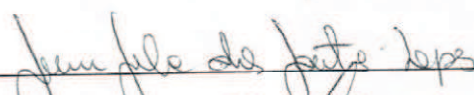
ELIENE DE FRANÇA SILVA

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-
C COM MARCADORES DE LINHAGEM:
ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento
as exigências para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

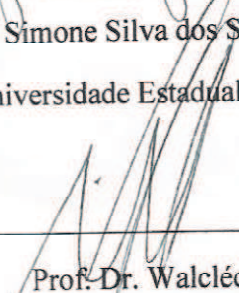
Aprovado em: 18 / 08 / 2016

BANCA EXAMINADORA

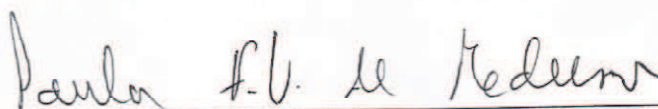


Profª Drª Simone Silva dos Santos Lopes (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Walclécio Moraes Lira

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª Drª. Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Dedico este trabalho a minha família pelo apoio e oportunidades dadas, aos amigos pelo incentivo e companheirismo, a Deus pela luz e força espiritual.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual da Paraíba e ao corpo docente do curso de bacharelado em ciências biológicas que contribuíram para minha formação ao longo dos quatro anos de curso;

À Dr^a Paula Francinetti, pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores Carlos Henrique e Bruno por disponibilizarem seus termocicladores;

À professora Dr^a Simone Lopes, minha orientadora, por quem tenho imensa admiração e carinho. Sou grata pela oportunidade dada, pela paciência, dedicação e ensinamentos;

À Patrícia, técnica do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da UEPB. Obrigada pelas horas compartilhadas, pela amizade, por estar sempre disponível para ajudar;

Aos colegas de laboratório, que estiveram sempre compartilhando conhecimento e alegrias que tornaram as horas de laboratório mais divertidas. Em especial, a Mayla, Nathalya, Denise, Mayara, Hugo e Álisson;

Aos amigos que compartilharam 4 anos de aprendizagem, tornando-os inesquecíveis. Em especial a Fleuriane, Ivynna, Mayla, Jaqueline, Camila, Raony e Mikaela, vocês serão minha eterna BioG;

As amigas que compartilharam apartamento durante esse tempo em Campina Grande. Em especial a Regianne, Daiely, Tamara e Josy. Obrigada por tornar o tempo longe de casa mais divertido, com certeza a falta da família foi recompensada com as melhores companhias.

À Thaty e Josy, as amigas que a vida me permitiu conhecer a tantos anos. Obrigada pelos anos de escola compartilhados e por continuarmos compartilhando experiências, mesmo com cada uma tendo seguido um caminho a vida se encarregou de juntar-nos novamente.

À minha família, por todo o apoio dado. Obrigada aos meus pais e minhas irmãs pelas oportunidades oferecidas, a compreensão pelos anos de ausência, o incentivo para que eu nunca desistisse e por todos os ensinamentos.

Por tudo, Obrigada Deus!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Jung

RESUMO

O estudo do povoamento das diferentes regiões mundiais fornecem informações que favorecem a compreensão da variabilidade genética nos diferentes grupos populacionais. A variabilidade genética nas populações, em especial no Brasil, é resultado da miscigenação instituída pelas migrações, principalmente, dos europeus e africanos. O agrupamento dessas populações não se deu de forma homogênea: pequenas populações, no decorrer das gerações, constituíram aglomerados de informações genéticas semelhantes levando ao aparecimento de doenças raras, como a Mucopolissacaridose (MPS). A MPS III-C é uma doença genética de depósito lisossômico causada pela deficiência da enzima Acetil-coA- α -glucosamina acetiltransferase, que leva ao acúmulo do sulfato de heparano nas células, causando ao várias disfunções ao indivíduo, particularmente, disfunções progressivas no sistema nervoso. Para conhecer a diversidade dos haplogrupos presentes nas populações, a genética de populações utiliza marcadores de linhagens. Na presente pesquisa, foram utilizados marcadores de matrilinearidade com objetivo de identificar a ancestralidade materna dos pacientes diagnosticados com MPS III-C no estado da Paraíba. Sete amostras de pacientes paraibanos com MPS III-C foram submetidas a análise. A região HVRI e HVRII do DNA mitocondrial (DNAMt) dos pacientes foi amplificada, sequenciada bidirecionalmente em sequenciador automático (ABI3500XL) e analisadas pelos *Softwares online MITOMASTER e HaploGrep*. Os resultados obtidos revelaram a presença de seis haplogrupos: dois ameríndios: A2 (29%), A2a1(15%), três africanos: L3e1a1 (14%), L3b (14%), L2b, (14%) e um europeu: J1c (14%). A partir desses haplogrupos foi calculado por estatística direta a contribuição de cada grupo populacional. As linhagens predominantes foram a ameríndia (43%) e a africana (43%), enquanto a contribuição europeia foi de 14%. As frequências obtidas para a linhagem materna dos pacientes com MPS III-C são semelhantes as frequências encontradas nos paraibanos saudáveis. Desta maneira, a origem da mutação responsável pelo desenvolvimento de MPS III-C provavelmente não está ligada as linhagens maternas africanas e ameríndias.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, Mucopolissacaridose III-C, Ancestralidade.

ABSTRACT

The study of the settlement of the various world regions provide information that favoured the understanding of genetic variability in different population groups. The genetic variability in populations, especially in Brazil, is the result of mixing established by migrations, mainly of Europeans and Africans. The grouping of these populations not homogeneously: small populations, over the generations, constituted clusters of similar genetic information leading to the appearance of rare diseases, such as Mucopolysaccharidosis (MPS). MPS III-C is a Lysosomal Storage disease caused by genetic deficiency of the enzyme acetyl-CoA- α -Glucosamine acetiltransferase, which leads to the accumulation of heparano sulfate in the cells, causing the individual many dysfunction, particularly progressive dysfunction in the nervous system. To meet the diversity of haplogroups present in populations, the population genetics uses lineages markers. In this research were used matrilineage markers in order to identify the maternal ancestry of patients diagnosed with MPS III-C in the State of Paraíba. Seven samples of Brazilian patients with MPS III-C were subjected to analysis. The HVRI and HVRII region of the mitochondrial DNA (mtDNA) of the patient was amplified, sequenced bidirectionally in automatic sequencer (ABI3500XL) and analyzed by Software online MITOMASTER and HaploGrep. The results revealed the presence of six haplogroups: two native Americans: A2 (29%), A2a1 (15%), three Africans: L3e1a1 (14%), L3b (14%), L2b (14%), and a European: J1c (14%). From these haplogroups was calculated by statistical direct the contribution of each population group. The lineages prevalent were the amerindian (43%) and african (43%), while the european contribution was 14%. The frequencies obtained for the maternal lineage of patients with MPS III-C are similar frequencies found in Paraíba. In this way, the origin of the mutation responsible for the development of MPS III-C probably is not on the African and Amerindian maternal lineages.

Keywords: Mitochondrial DNA, Mucopolysaccharidosis III-C, Ancestry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Provável rota do homem para a América através do Estreito de Bering. | 22 |
| Figura 2- Genoma mitocondrial | 27 |
| Figura 3 – Distribuição dos haplogrupos mitocondriais..... | 28 |
| Figura 4 – árvore filogenética dos haplogrupos do DNA mitocondrial | 25 |
| Figura 5- Mapa da Paraíba | 29 |
| Figura 6A - Amplificação da região HRVI | 32 |
| Figura 6B- Amplificação da região HRVII | 33 |
| Figura 7- Proporção dos haplogrupos mitocondriais observados..... | 35 |
| Figura 8 - Proporção da ancestralidade materna observada | 36 |
| Figura 9- Sequências nucleotídicas após alinhamento com a sequência controle rCRS..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Classificação das mucopolissacaridose..... | 19 |
| Tabela 2- Marcadores utilizados na pesquisa..... | 30 |
| Tabela 3 - Condições de amplificação das regiões HRVI e HRVII do DNAm. | 30 |
| Tabela 4 - Haplótipos mais frequentes na análise | 33 |
| Tabela 5 - Haplótipos encontrados na região HRVI de cada paciente | 34 |
| Tabela 6- Haplótipos encontrados na região HRVII de cada paciente..... | 34 |
| Tabela 7 - Haplogrupos obtidos a partir dos polimorfismos encontrados..... | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| A | Adenina |
| AcCoA | Acetil coenzima A |
| C | Citosina |
| DDL | Doenças de depósito lissosômico |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DNAmt | DNA mitocondrial |
| dNTP | Desoxinucleotídeo tri-fostato |
| EDTA | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético) |
| EIM- | Erro inato do metabolismo |
| EXO I | Exonuclease I |
| GAG | Glicosaminoglicanos |
| G | Guanina |
| H | Heavy |
| HVRI | Região Hipervariável I |
| HVRII | Região Hipervariável II |
| HVRIII | Região Hipervariável III |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| L | Light |
| kb | Quilobase/Kilobase |
| MPS | Mucopolissacaridose |
| MPS I | Mucopolissacaridose tipo I |
| MPS II | Mucopolissacaridose tipo I |

| | |
|-----------|---|
| MPS III | Mucopolissacaridose tipo III |
| MPS III-C | Mucopolissacaridose tipo III-C |
| MPS IV | Mucopolissacaridose tipo IV |
| pb | Pares de Bases |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase) |
| rCRS | <i>Revised Cambridge Reference Sequence</i> (Sequência de Referência de Cambridge Revisada) |
| SAP | <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> |
| SH | Sulfato de heparan |
| SNPs | Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) |
| T | Timina |
| TBE | Tris-Borato-EDTA |
| U | Unidade |
| UV | Ultravioleta |
| v. | Versão |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----|-------------|
| % | Porcentagem |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromol |
| mM | Milimolar |
| °C | Graus C |
| ng | Nanograma |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral | 17 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 17 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 18 |
| 3.1 Erros Inatos do Metabolismo e Doenças de Depósito Lisossômico | 18 |
| 3.2 Mucopolissacaridoses | 18 |
| 3.3 Mucopolissacaridose III-C | 20 |
| 3.3.1 Tratamento das mucopolissacaridoses | 21 |
| 3.3.2 Dados epidemiológicos da mucopolissacaridose III-C | 21 |
| 3.4 Povoamento das Américas | 22 |
| 3.4.1 Brasil: a população triíbrida | 23 |
| 3.4.2 Povoamento da Paraíba | 24 |
| 3.5 DNA mitocondrial | 24 |
| 3.6 Análise de Ancestralidade | 26 |
| 4 MATERIAL E METÓDOS | 28 |
| 4.1. Local do estudo e amostragem | 28 |
| 4.2. Obtenção do material genético | 29 |
| 4.3. Amplificação da região controle DNAmT | 29 |
| 4.4. Sequenciamento das amostras | 31 |
| 4.5. Análise dos dados | 31 |
| 5 RESULTADOS | 32 |
| 5.1 Amplificação da região controle DNAmT | 32 |
| 5.2 Sequenciamento | 33 |
| 6 DISCUSSÃO | 37 |
| 7 CONCLUSÃO | 39 |
| REFERÊNCIAS | 40 |
| Apêndice A- Eletroferogramas da região HVRI | 44 |

| | |
|--|-----------|
| Apêndice B- Eletroferogramas da região HVRII..... | 45 |
|--|-----------|

1. INTRODUÇÃO

A evolução humana é caracterizada por especiação, extinção e eventos de dispersão que foram ligados à registros paleoclimáticos globais e regionais. No continente americano a dispersão iniciou com os primeiros habitantes entrando na América do Norte, provavelmente por terra no pleistoceno durante períodos frios (MASLIN, 2015; PROUS, 1997).

As dispersões geraram conexões genéticas entre os diferentes povos, assim, surgiram as nações miscigenadas, dentre elas o Brasil, caracterizado por uma sociedade de povos multiétnicos, formados a partir de imigrantes europeus (o colonizador), africanos (os escravos) e nativo-americanos (os nativos do continente). A fim de conhecer como se deu o processo das dispersões, e conseqüentemente, a miscigenação do homem moderno, a genética molecular utiliza principalmente marcadores de linhagens maternas e paternas (DNA mitocondrial e cromossomo Y, respectivamente), representantes das informações genéticas não recombinantes, passadas de geração em geração (RIBEIRO,1995; SANTOS-LOPES, 2007).

O DNA mitocondrial (DNAm_t) apresenta algumas características que o tornam um instrumento útil para o estudo da genética de populações. É herdado matrilineamente, ou seja, a mãe transmite esse DNA para sua prole, mas somente as filhas o transmitem para a geração seguinte. Deste modo, o estudo do DNAm_t humano permite o conhecimento da história genética das mulheres nas populações (PRADO, 2002).

Os padrões de diversidade genética e estrutura populacional nas populações humanas constituem uma base importante para muitas áreas de investigação em genética humana. Fornece valiosa fonte de dados para inferências sobre a história evolutiva humana, distribuição da variação genética e informa sobre genes que conferem aumento da susceptibilidade à determinadas doenças. Por exemplo, as mucopolissacaridoses, que apresentam comportamento variável entre os grupos étnicos (BERGUIGUI, 2014; WANG, 2007).

Dentre as doenças que se comportam de forma variável entre grupos étnicos está a mucopolissacaridose tipo III-C (MPS III-C), que é uma doença hereditária autossômica recessiva de depósito lisossômico. Longas cadeias de açúcares (glicosaminoglicanos) ficam retidas nos lisossomos das células devido à deficiência na atividade da enzima Acetil-CoA: α -glucosaminidase-acetiltransferase. Os indivíduos afetados por esta doença têm principalmente o sistema nervoso afetado devido à diminuição da atividade cerebral. A idade de início dos

sintomas e a taxa de progressão da doença variam consideravelmente, mesmo em irmãos afetados (The MPS and Related Diseases Society of Australia, 2013).

O estudo de doenças raras através de marcadores moleculares informativos de ancestralidade é uma valiosa ferramenta para definir e/ou confirmar a história da formação de uma população. Com o conhecimento da origem ancestral de uma população, é possível presumir o risco para o desenvolvimento de determinadas doenças ligadas a grupos ancestrais (MACHADO, 2010).

Devido a elevada frequência de MPS III-C na Paraíba, o objetivo desse estudo é identificar a ancestralidade materna dos pacientes com MPS III-C oriundos da Paraíba para identificar a origem da mutação e inferir o padrão evolutivo que mantém a frequência destes pacientes na população paraibana.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Identificar a ancestralidade materna de pacientes diagnosticados com mucopolissacaridose III-C oriundos do estado da Paraíba.

1.2 Objetivos Específicos

- Identificar a ancestralidade dos pacientes com MPS III-C da Paraíba com marcadores de linhagens materna (DNA mitocondrial);
- Caracterizar a população quanto aos polimorfismos das regiões hipervariáveis I e II do DNAm para verificar a ancestralidade materna da população;
- Identificar e estimar a frequência dos haplogrupos pertencentes da amostragem estudada;
- Estimar as proporções das linhagens ancestrais africanas, ameríndias e europeias na formação desta amostragem;
- Comparar as frequências haplotípicas com outras populações brasileiras.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Erros Inatos do Metabolismo e Doenças de Depósito Lisossômico

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são um grupo de doenças geneticamente determinadas por alterações na informação contida no DNA que determinará alterações no metabolismo através de alterações na estrutura e/ou função de moléculas proteicas importantes para reações bioquímicas (LIMA, 2009). Estes distúrbios de natureza genética geralmente correspondem a um defeito enzimático capaz de acarretar a interrupção de uma via metabólica (BICALHO, 2015; FELDHAMMER, 2009). Entre os EIM estão as Doenças de Depósito Lisossômico (DDL), caracterizadas pela deficiência no catabolismo de moléculas. Estas doenças compreendem 14% de todas as doenças hereditárias de metabolismo e, embora individualmente raras, em conjunto afetam 1 em cada 7.700 nascidos vivos. Dentre as DDL mais de 30% são MPS, distúrbios que afetam enzimas necessárias para a degradação de glicosaminoglicanos (GAGs) (FELDHAMMER, 2009).

Os GAGs são polissacarídeos usados na construção de ossos, cartilagens, pele, tendões e outros tecidos do corpo. Quando falta uma das enzimas responsável por seu catabolismo, os GAGs não são degradados, e conseqüentemente, a maioria deles permanecem nos lisossomos, causando o acúmulo responsável pela maioria das manifestações muscoesqueléticas dos pacientes com MPS (LIMA, 2009; GURANY, 2011).

2.2 Mucopolissacaridoses

As MPS se caracterizam por serem doenças graves, crônicas e multissistêmicas, causadas pela atividade deficiente de enzimas que degradam os GAGs. Existem sete tipos de MPS (Tabela 1), dois destes (III e IV) têm subtipos indicando origens genéticas diferentes para a mesma apresentação clínica (BICALHO, 2015; TURRA, 2009).

Tabela 1 - Classificação das mucopolissacaridose.

| MPS | Subtipo | Nome atribuído | Enzima deficiente | GAC acumulado |
|------------|----------------|------------------------------|--|----------------------|
| I | — | Hurler, Huler-Scheie, Scheie | α - L- iduronidase | HS + DS |
| II | — | Hunter | Idunorato-2-sulfatase | HS+DS |
| III | III-A | Sanfilippo A | Heparan-n- sulfatase | HS |
| | III-B | Sanfilippo B | α -N- acetilglicosaminidas | HS |
| | III-C | Sanfilippo C | Acetil CoA: α - glicosamina acetiltransferase | HS |
| | III-D | Sanfilippo D | N-acetilglicosamina 6- sulfatase | HS |
| IV | IV-A | Morquio A | Galactose 6-sulfatase | QS |
| | IV-B | Morquio B | β - galactosidade | QS |
| VI | — | Maroteaux Lamy | N-acetilgalactosamina-4- sulfase | DS |
| VII | — | Sly | β - glucuronidase | HS + DS |
| IX | — | Natowicz | Hialuronidase | AH |

DS: Dermatan Sulfato; HS: Heparan Sulfato; QS: Queratan Sulfato; AH: Ácido hialurônico.

Fonte: Adaptado de BICALHO, 2015.

Nas MPS, os GAGs parcialmente degradados são armazenados nos lisossomos e excretados na urina em grandes quantidades. Diante de uma suspeita clínica, são realizados primeiramente exames de urina para um direcionamento dos próximos testes, que podem ser quantitativos e qualitativos. Os testes qualitativos podem ser baseados na turvação urinária ou na visualização de manchas metacromáticas em papel impregnado em corantes. A análise para os testes qualitativos auxiliam na identificação de qual GAG está aumentado, direcionando a investigação para ensaios enzimáticos específicos que devem ser realizados. É possível realizar o diagnóstico pré-natal das MPS por meio da medida da atividade enzimática em células cultivadas do líquido amniótico e das vilosidades coriônicas (VIEIRA, 2007; HREBICEK, 2006).

2.3 Mucopolissacaridose III-C

A Mucopolissacaridose tipo III-C (MPS III-C), ou síndrome de sanfilippo C, é uma doença autossômica recessiva causada pela degradação deficiente de Sulfato de Heparano (SH). O SH é uma repetição de dissacarídeo composto por unidades de sulfatase L-idurônico ou ácido glucurônico ligado a N-glucosamina. É encontrado em proteoglicanos associado com à membrana celular, porém é mais abundante no tecido conjuntivo e na matriz intracelular, onde se tem mostrado essencial para desempenhar funções em interações celulares e sinalização (PSHEZHETSKY, 2015).

O locus do gene causador da MPS III-C foi relatado pela primeira vez em 1992, através de um estudo com dois irmãos afetados pela doença. A localização do gene causador da MPS III-C no cromossomo 8 foi posteriormente confirmada pelo cultivo de fibroblastos da pele de pacientes. Nesse experimento também foi possível observar a deficiência na atividade da enzima N-acetiltransferase e sua consequente relação com a MPS III-C (HREBICEK, 2006).

Os indivíduos diagnosticados com MPS III-C manifestam sintomas como deterioração neurológica progressiva e severa, causando hiperatividade, distúrbios do sono, anormalidades comportamentais, neuropsiquiátrica, retardo mental, perda auditiva e manifestações como hepatomegalia, nanismo, rigidez articular, hipertricose e rostos grosseiros. As anormalidades físicas são mais leves, sendo as principais complicações os distúrbios comportamentais e a regressão neurológica (HREBICEK, 2006; GUARANY, 2011; DELGADILLO, 2013).

A evolução clínica da MPS III-C se dá em três fases. Depois de um período de desenvolvimento normal, a primeira fase começa normalmente entre 1 e 3 anos de idade com retardo de desenvolvimento cognitivo, mais notável pelo retardo da fala. A segunda fase começa entre 3 e 4 anos com problemas graves de comportamento e progressivo declínio intelectual. A terceira fase começa na adolescência com o aparecimento da demência de forma grave, perda da locomoção, disfagia e lesões trato piramidais (DELGADILLO, 2013).

A identificação do genótipo de pacientes com MPS III-C é importante para prever o fenótipo. Apesar da doença ainda não ter cura, os estudos se tornam a cada dia mais importantes para, possibilitar o aconselhamento genético das famílias e auxiliar no diagnóstico pré-natal (GIUGLIANI *et al*, 2010).

2.3.1 Tratamento das mucopolissacaridoses

Até o momento, não existe cura para os indivíduos afetados pela MPS. Entretanto, existem tratamentos para reduzir os sintomas. Os tratamentos são ferramentas para restauração da atividade deficientes das enzimas (GIUGLIANI, 2010).

A Terapia de reposição enzimática consiste na administração direta, por via venosa, da enzima deficiente. A enzima pode ser administrada indiretamente, por transplante de medula óssea ou por transplante de células tronco hematopoiéticas, ou ainda, por células autófagas modificadas geneticamente para expressar a enzima. O Transplante de medula óssea e o transplante de células tronco hematopoiéticas são procedimentos de alto risco por ter alta taxa de mortalidade, entretanto, quando seu objetivo de corrigir a deficiência enzimática é alcançado, a expectativa de vida aumenta e muitas anormalidades sistêmicas melhoram. A administração destes tratamentos depende do tipo de MPS, do quadro clínico, da idade e do comprometimento neurológico do paciente (GUARANY, 2011, GIUGLIANI, 2010).

2.3.2 Dados epidemiológicos da mucopolissacaridose III-C

A incidência global das MPS III está estimada em 1,9 - 4,5: 100.000 nascimentos (HAMARTZ, 2008). Entretanto, a prevalência da MPS III-C varia de acordo com as populações, na República Checa, Portugal, Austrália, Holanda, França, Alemanha, Grécia, Suécia, Taiwan e Reino Unido para cada 100.000 nascidos vivos a prevalência é de 0,42, 0,12, 0,07, 0,21, 0,09, 0,10, 0,15, 0,17, 0,03, 0,06, respectivamente (POUPETOVÁ *et al*, 2010; FEDELE, 2015).

No Brasil, há subdiagnóstico da MPS III-C, que pode ser explicado pelo envolvimento predominante neurológico das MPS III. No entanto, segundo a Rede Brasileira de Mucopolissacaridose há 21 pacientes diagnosticados, sendo 8 paraibanos (38%) (Rede MPS Brasil, 2012).

3.4 Povoamento das Américas

Os primeiros americanos foram grupos de caçadores-coletores asiáticos que vieram da Ásia passando pela Beringia por uma ponte de terra (o estreito de Bering) formada entre 40.000 e 13.000 anos atrás, quando o nível do mar estava baixo (Figura 1). A partir da chegada à América, os novos habitantes se espalharam por todo o continente, povoando os territórios (SANTOS-LOPES, 2007; PRADO, 2002; BERGUIGUI, 2014).

Figura 1 - Provável rota do homem para a América através do Estreito de Bering.



Fonte: Imagem retirada do canal “curtir geografia”
<<https://www.youtube.com/watch?v=UMpeEKOURzg>>. Acessado em: 22/09/2016

A chegada dos europeus na América representou o evento culminante de uma importante mudança nos padrões das migrações humanas. Em termos genéticos, as mudanças representam o estabelecimento de fluxo gênico entre populações de grupos étnicos diferentes, mantidos inalterados por vários séculos (SANTOS, 2002). O colonizador europeu promoveu a vinda dos primeiros escravos africanos para as Américas, sendo a grande maioria deles originários da África central e ocidental. Com a chegada dos africanos às Américas, formou-

se um tripé que gerou um povo com 70% do seu genoma original e receberam 30% restantes principalmente dos europeus (GOMES, 2007).

A Colômbia foi o ponto de partida mais importante para a América do sul durante o povoamento do continente pelos paleoíndios. A partir da Colômbia, duas grandes rotas migratórias aconteceram resultando na colonização da América do sul ao longo da costa do pacífico, e nas regiões andinas no sentido da planície amazônica (XAVIER, 2015).

3.4.1 Brasil: a população triíbrida

A introdução de novos povos no território brasileiro transformou o ambiente e as gerações que se sucederam. A imigração portuguesa trouxe homens desacompanhados das suas mulheres, logo, esses se relacionaram com as nativas gerando um extenso cruzamento que deu origem ao mestiço de branco com índio (mameluco) (FAUSTO, 1996). As relações se estenderam com a introdução de mais um povo, o africano. O que gerou o brasileiro triíbrido, que além do mameluco tem na sua composição o mulato (mistura de europeus e africanos) e o cafuzo (mistura de africanos e nativos). A partir dessa mestiçagem cada família expressa no fenótipo de seus membros características singulares de ancestrais mais próximos ou remotos das três grandes etnias (RIBEIRO, 1995).

A significativa presença de africanos na sociedade brasileira pode ser constatada pelos indicadores de população no fim do período colonial. Negros e mulatos representavam cerca de 75% da população de Minas Gerais, 68% de Pernambuco, 79% da Bahia e 64% do Rio de Janeiro. Apenas São Paulo tinha uma população majoritariamente branca (56%) (FAUSTO, 1996). Entretanto, a predominância de africanos no território brasileiro gerou desconforto ao europeu que viu o cenário “desequilibrado” referindo-se á questão racial. Para a eliminação da população negra foi incentivado o casamento de índios e negros com mulatos e brancos. Tratava-se de miscigenar as diversas populações do estado nacional para garantir a evolução futura do país através do branqueamento. A ideologia do branqueamento incentivou a imigração europeia, por meio de benefícios legais relacionados á posse de terra, e simultaneamente reduziu a imigração dos povos considerados de “raça inferior”, garantindo a evolução futura do país (RAMOS, 2002).

Vários decretos foram expedidos para que províncias introduzissem europeus em seus territórios. Em 1871 o decreto de 26 de março autorizou a fundação de uma sociedade com o fim de promover a emigração de europeus para a província de São Paulo. Assim como em 1872 o decreto n. 5.295 de 31 de maio, estabeleceu introdução e o estabelecimento de 700

imigrantes alemães, ou do norte da Europa na da província do espirito santo. O nordeste brasileiro também foi alvo da introdução de brancos e a população dos sertões do norte recebeu puros descendentes de portugueses (ROCHA, 1919).

3.4.2 Povoamento da Paraíba

Derivada dos vocábulos indígenas, a Paraíba significa rio ruim (difícil de navegar). O território paraibano foi ocupado pelos portugueses em 1585 com a fundação da cidade Filipéia de Nossa Senhora das Neves (MELLO, 1994; MOREIRA *et al*, 2003). Atualmente, o estado da Paraíba é dividido em 223 municípios distribuídos em uma superfície de 56. 468.427 Km². A população é estimada em 3.766.528 pessoas. No critério declaração de cor a maior parte da população paraibana que se declara parda (52,7%), seguida de branca (39,8%), negra (5,7%) e indígena ou amarela (1,8%) (IBGE, 2010).

A formação do território paraibano se deu com a contribuição materna, principalmente, das mulheres nativas e a contribuição paterna, principalmente, dos portugueses (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001). A princípio, os franceses estabeleceram-se na Paraíba antes dos portugueses, e conseguiram uma relação amigável com os nativos potiguaras, estabelecendo matrimônios com as nativas enquanto exploravam o pau-brasil (RIBEIRO, 1995).

O domínio português se estabeleceu após a conquista do apoio dos nativos tabajaras que lutaram contra os potiguaras para o estabelecimento português no território. Assim, em 5 de agosto de 1585 foi oficializada a fundação da Paraíba. Toda a estratégia política administrativa dos portugueses objetivava a subordinação da Paraíba à Portugal. Daí por diante, estes se expandiram e o império cresceu a cada dia devido aos grandes engenhos movido à mão-de-obra escrava dos africanos (MELLO, 1994; FELINTO, 2000). Na segunda metade do século XVII e, principalmente no século XVIII, foram alcançados os pontos mais distantes do território paraibano, com incorporações das terras sertanejas (MELLO, 1994).

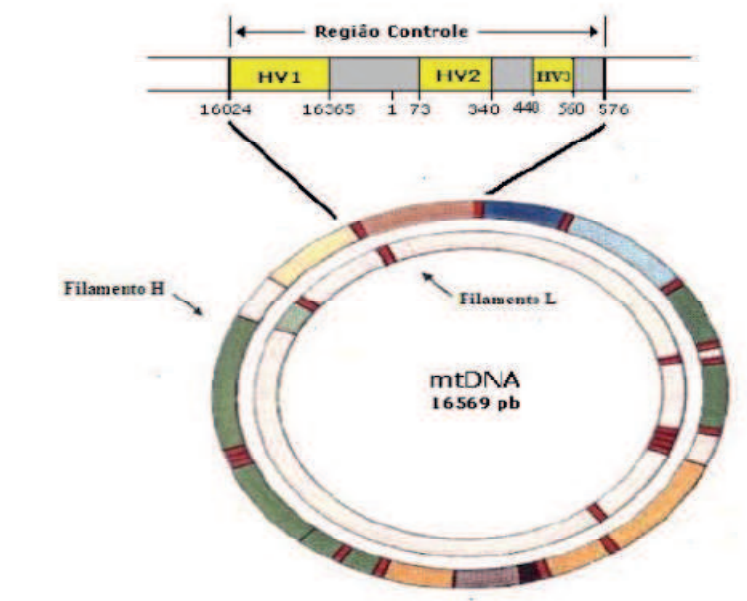
3.5 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (DNAMt) é circular, composto por duas cadeias: uma pesada (H-Heavy) rica em purinas (adenina e guaninas) e uma leve (L-Light) rica em pirimidinas (timinas e citosinas). A fita molecular desse material genético é constituída apenas por éxons (regiões do DNA codificante de proteínas) com aproximadamente 16.596 pares de base (pb) .

Ademais, o DNAm possui duas regiões com propriedades evolutivas diferentes. A maior região representa mais de 90% do DNA, é codificante e contém 37 genes. A segunda região, denominada “alça D (D-loop)” ou região controle, compõe 10% do genoma mitocondrial, tem em torno de 1.122 pb, e não é codificante (PENA 2002; BUHER *et al*, 2011).

Anderson e colaboradores (1981) numeraram as cadeias desta molécula a partir da região controle próxima da origem da replicação. A região controle vai da posição 16024 a 16569 e da posição 1 a 576, e é nesta região que se encontram três segmentos hipervariáveis (HRVI, HRVII e HRVIII), altamente polimórficos. A região HRVI se estende da posição 16024-16365, a HRVII da posição 73-340 e a HRVIII da posição 430-576 (Figura 2) (MORAIS, 2013).

Figura 2 - Genoma mitocondrial humano com destaque para as regiões hipervariáveis I, II e III



Fonte: adaptado de RINCON, 2009

A região controle do DNAm evolui 5 vezes mais rápido que o restante da molécula, enquanto, a região codificadora apresenta uma taxa de mutação cerca de 5 vezes maior que o DNA nuclear. Essa rápida taxa de mutação que se acumula de maneira relativamente cronológica dentro de linhagens maternas, permite a diferenciação de populações que tenham se separado em um espaço de tempo relativamente curto, como é o caso dos grupos étnicos humanos (PRADO, 2002).

Os últimos anos passaram a ser cenário do estudo extensivo do DNAmT em várias populações nativas do continente americano e asiático. Devido a ausência de recombinação o DNAmT transmite os haplótipos inalterados em matrilinearidade, desse modo, esse DNA mostrou-se uma ferramenta molecular capaz de fornecer informações sobre questões a respeito do povoamento dos territórios (PRADO, 2002; SANTOS, 2002; BUHER, 2011). Uma das metodologias mais utilizadas nos estudos de ancestralidade é a investigação da região controle do DNAmT. Uma vez que nessa região estão três regiões hipervariáveis, é possível classificar a linhagem de um determinado indivíduo nos diferentes haplogrupos mitocondriais, isso se deve a presença dos polimorfismos estáveis entre as populações (GOMES, 2007).

3.6 Análise de Ancestralidade

Mudanças nas sequências do DNA ocorrem quando um nucleotídeo é substituído por outro, o que pode ocorrer durante o período da replicação. A mutação de ponto é a menor alteração que pode ocorrer a nível de DNA (CAVALLI-SFORZA *et. al*, 2003). A ocorrência dessas mutações geram nas populações os polimorfismos genéticos, definidos em função da presença de múltiplos alelos em um mesmo locus, no qual dois desses alelos apresentam frequência igual ou superior a 1% na população.

O conjunto dos polimorfismos de um indivíduo constitui um haplótipo, sequências de variações genéticas que ocorrem ao longo dos cromossomos individuais, do mesmo modo, diferentes haplótipos agrupados formam um haplogrupo (grupo de haplótipos que compartilham um ancestral em comum) (PENA, 2002; LANGERGRABER, 2012).

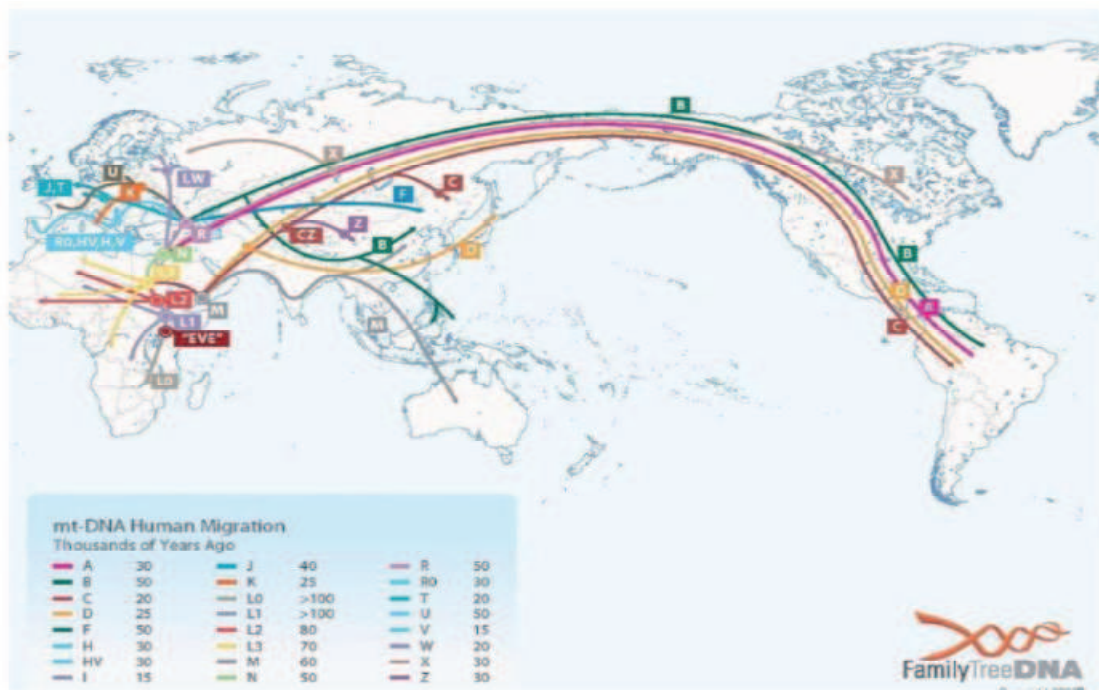
A árvore filogenética dos haplogrupos mitocondriais está representada na figura 3. O macro haplogrupo L ramificou-se nos haplogrupos L0, L1, L2, L3, L4, L5 e L6. O haplogrupo L0 está mais próximo do mais recente ancestral comum (Eva mitocondrial). O L3 se ramificou nos macro haplogrupos M e N, presentes na Ásia e na Europa. Após sair da África o macro haplogrupo N ramificou-se nos haplogrupos, H, I, J, K, T, U, V, W e X, que constituem 98% da população europeia e divergiu dando origem ao super-haplogrupo R. O super-haplogrupo R contém os três principais haplogrupos europeu (R0, JT e V), e representa mais de 90% da população europeia. O macro haplogrupos M se ramificou nos haplogrupos C, D, E, G e Z, característicos da Ásia e Oceania (Figura 4) (KONG, 2011; PIERRON, 2011).

O continente americano é constituído, majoritariamente, pelos haplogrupos A, B, C, D e X. Por serem haplogrupos asiáticos, é proposto que as populações asiáticas entraram no

continente americano antes dos europeus. Os nativos das Américas foram provavelmente provenientes de um único evento migracional no qual aquele haplótipo carregado por aquela população foi o haplótipo fundador e hoje é considerado mais frequente. Porém, os haplogrupos encontrados nas populações nativas-americanas apresentam algumas mutações específicas, que diferenciam das sequências homologas dos haplogrupos asiáticos (KUMAR, 2011; PRADO, 2002).

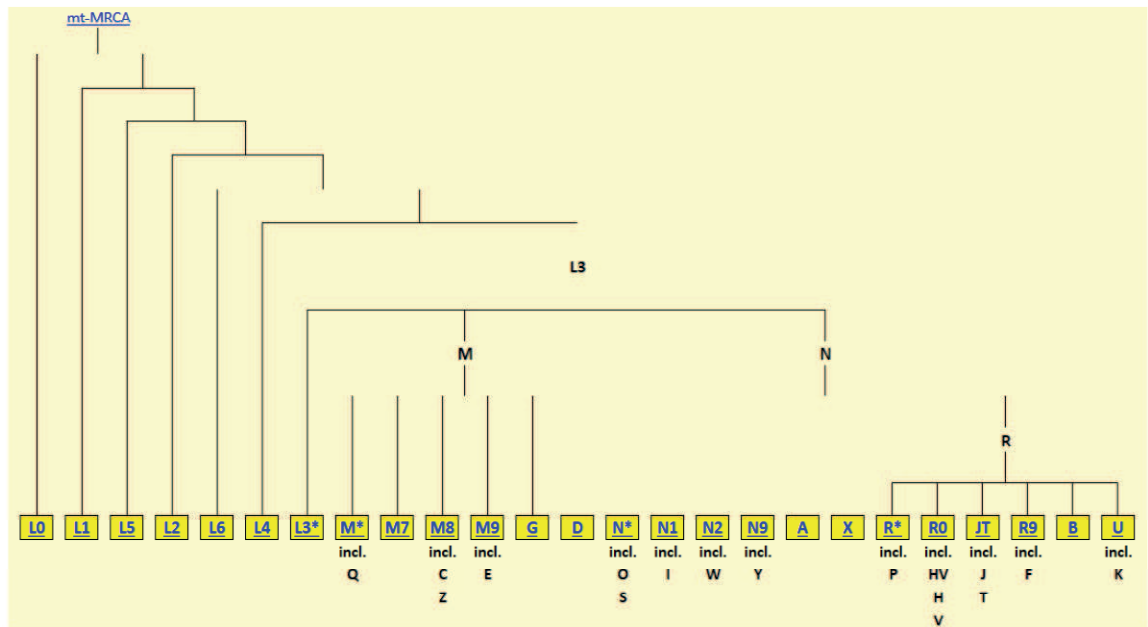
O haplogrupos A é mais frequente nas populações da América do norte, e essa frequência diminui na direção sul. O contrário acontece com os haplogrupos C e D, cujas frequências tende a aumentar na direção norte-sul. Enquanto o haplogrupos B, apesar de estar ausente nas populações do norte da América do norte, aparece em frequências constantes nas demais regiões (PRADO, 2002).

Figura 3- Distribuição dos haplogrupos do DNA mitocondrial



fonte: charles kerchner's – mtdna haplogroup descriptions & information links, 2006. < <http://www.kerchner.com/haplogroups-mtdna.htm> >. Acessado em: 28/09/2016

Figura 4- Árvore filogenética dos haplogrupos do DNA mitocondrial a partir da “Eva mitocondrial”



Fonte: Phylo Treemt < <http://www.phylotree.org/tree/index.htm>>. Acessado em 28/09/2016.

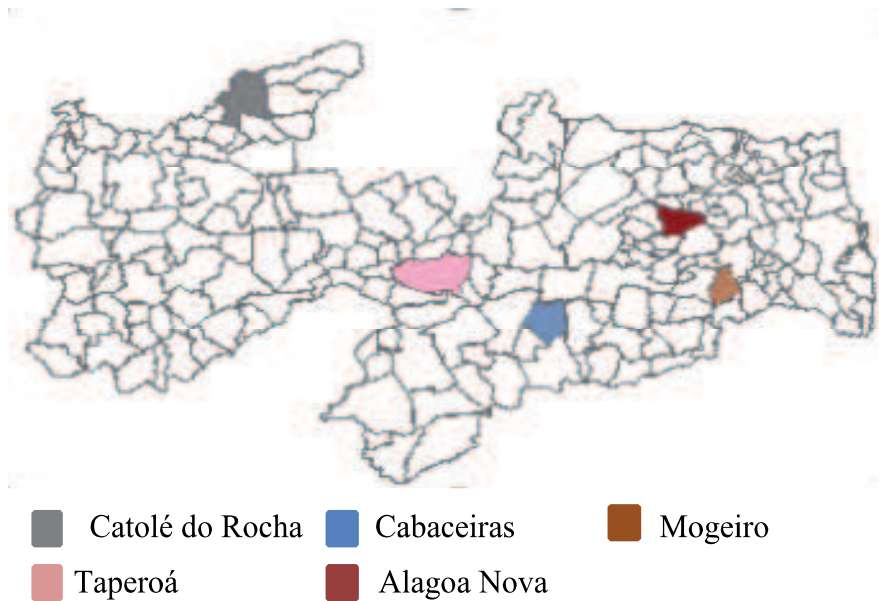
4 MATERIAL E METÓDOS

4.1. Local do estudo e amostragem

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – *Campus I*, Campina Grande-PB.

Foram analisadas sete amostras de indivíduos diagnosticados com mucopolissacaridose tipo III-C. Todos os pacientes são paraibanos oriundos das cidades de Mogeiro, Catolé do Rocha, Taperoá, Alagoa Nova e Cabaceiras (Figura 5). Os pacientes foram nomeados de MC1 à MC7, a fim de preservar suas identidades.

Figura 5 - Mapa da Paraíba com destaque para as cidades natal dos pacientes com mucopolissacaridose tipo III-C



Fonte: Adaptado de IBGE cidades, 2016

4.2. Obtenção do material genético

Todas as amostras utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC), Campina Grande.

4.3. Amplificação da região controle DNAm_t

As regiões HRVI e HRVII da região controle do DNAm_t foram amplificadas utilizando dois pares de nucleotídeos específicos (*primers*) (L15996/H16401 e L29/H389). O par de *primers* L15996 (direto) e H16401 (reverso) permitiu a amplificação da região HRVI, enquanto os *primers* L29 (direto) e H389 (reverso) permitiu a amplificação da região HRVII (Tabela 2). As letras L e H correspondem a cadeia leve e pesada do genoma mitocondrial, respectivamente.

Tabela 2- Marcadores utilizados na pesquisa.

| Primers | Sequências | Região amplificada | Referência |
|---------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------------|
| L15996 | 5' CTC CAC CAT TAG CAC CCA AAG C 3' | HVI | IPCC-JP¹ |
| H16401 | 5' TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG 3' | | |
| L29 | 5'GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C 3' | HVII | IPCC-JP¹ |
| H389 | 5'CTG GTT AGG CTG GTG TAA GG 3' | | |

Fonte: Autor. 1: Instituto de Polícia Científica da Capital, João Pessoa- PB

Para a amplificação das amostras foi preparada uma solução com o volume final de 20µl , contendo um mix com água ultra pura, 1,5x de tampão (Sinapse); 200 mM de dNTPs; 10µM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 ng de DNA genômico. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). A ciclagem de temperatura foi com 35 ciclos distribuídos a partir da ativação da Taq por 5 minutos a 95°C, desnaturação inicial 95°C por 30 segundos, anelamento por 90 segundos a 55°C (HRVI) e 57°C (HRVII), extensão por 30 segundos a 72°C e extensão final por 68°C a 10 minutos (Tabela 3).

Tabela 3 – Condições de amplificação das regiões HRVI e HRVII do DNAm.

| Etapa | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|-----------------|-------------------------------|--------|--------|
| Ativação da Taq | 95 °C | 5 min | |
| Desnaturação | 95 °C | 30 seg | |
| Anelamento | 55 °C (HRVI) 57 °C (HRVII) | 90s | 35 |
| Extensão | 72 °C | 30 seg | |
| Extensão final | 68 °C | 10 min | |

Fonte: Adaptado de Instituto de Polícia Científica, João Pessoa- PB.

A análise dos produtos da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com *sybr green* em cuba vertical com tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089M; Ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) por aproximadamente 90 minutos, voltagem de 120V

e 36 miliAmperes e visualizados através de transiluminador de luz UV. O tamanho dos fragmentos amplificados foram quantificados utilizando um marcador padrão de peso molecular de 1Kb (Amresco®) em cada gel, para análise da qualidade das amostra amplificadas.

4.4. Sequenciamento das amostras

As amostras amplificadas foram primeiramente purificadas pelo método de enzimas hidrolíticas EXO I (*Exonuclease I*) e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). A EXO I é responsável por degradar os oligonucleotídeos não incorporados, enquanto, a SAP catalisa a remoção dos grupos fosfato dos DNTPs não incorporados que permaneceram após a amplificação. Um misto com água mili-q, EXO I e SAP foi preparado e adicionado ao produto de PCR. Para ativação das atividades enzimáticas o misto foi submetido a 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos no termociclador veriti (*Applied Biosystems- Thermo Fishers*).

Subsequente à purificação das amostras os produtos de PCR foram preparados para a reação com *Byg Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit*, usando 4,75µl de água ultra pura, 1,75µl de tampão de sequenciamento 5X, 0,5µl de *Dye Terminator*, 1µl do *primer* (5pMol/µl) e 2µl do produto de PCR. As condições de termociclagem da reação consistiram em 1 min a 96°C seguidos por 40 ciclos de 15s a 96°C, 15s a 50°C e 4 min a 60°C. Após a reação com *Byg Dye* os produtos foram purificados por precipitação com EDTA/acetato de sódio/etanol, e em seguida sequenciados bidireccionalmente em sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 3500XL).

4.5. Análise dos dados

A fim de verificar a qualidade das seqüências geradas pelo sequenciamento direto das regiões HRVI e HRVII foram utilizados os *softwares Genetic Analyzer 3.0 (Applied Biosystems)* e *Sequencing Analysis v.5.1*. Para a adesão (*contig*) das seqüências diretas e reversas de cada amostra foi utilizado o programa *Standen (pregap4 e gap 4)* (BONFIELD *et al.*, 1995).

O programas online *Mitomaster* descrito por Brandon e colaboradores (2009) (<http://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>) foi utilizado para detecção dos polimorfismos mitocondriais, para isto a seqüência dos pacientes foram

comparadas com a *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) primeira sequência do genoma mitocondrial humano, revisada por Andrews e colaboradores (1999). Em seguida os polimorfismos identificados foram submetidos ao programa, também online, *HaploGrep* descrito por Kloss-Brandstatter e colaboradores (2010) (<https://haplogrep.uibk.ac.at/>) para identificação dos haplogrupos de cada indivíduo.

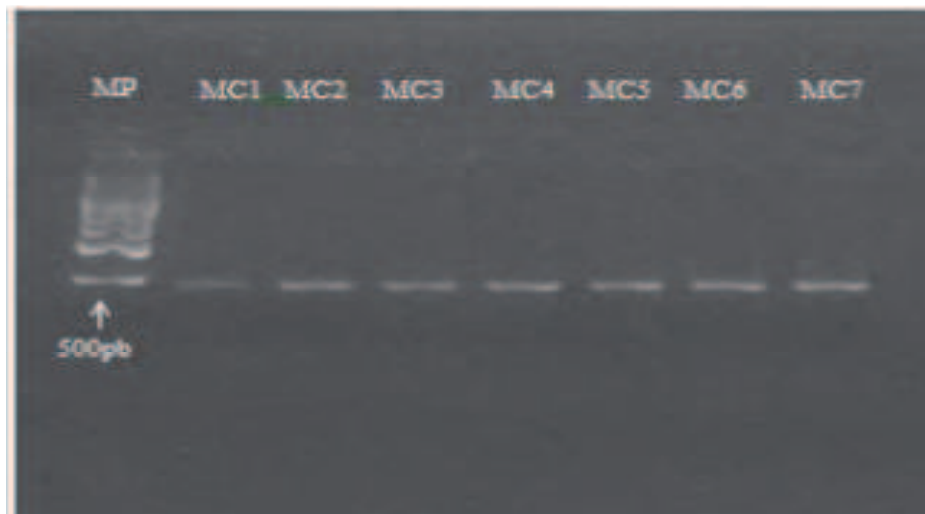
Após a identificação dos polimorfismos e haplogrupos as sequências foram submetidas a um alinhamento múltiplo com a rCRS pelo programa Bioedit v.7.0 (*Biological sequence alignment editor*) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). O alinhamento teve o objetivo de identificar os sítios de mutação. As frequências dos haplogrupos obtidos foram feitas por estatística direta.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação da região controle DNAMt

A região controle do DNAMt (1000pb) foi amplificada através dos oligonucleotídeos L15996/H16401 (HRVI) e L29/H389 (HVRII). A região HRVI originou um fragmento de 500pb (Figura 6A), do mesmo modo, a amplificação da região HRVII, gerou um fragmento 500pb. O produto obtido foi de boa qualidade sem bandas inespecíficas e com o fragmento de interesse nítido (Figura6B).

Figura 6A - Amplificação dos marcadores da região HRVI em gel de agarose 1%. MP (Marcador de peso molecular) de 1 kb; MC1-MC7 (Pacientes).



Fonte: Autor

Figura 6B- Amplificação da região HRVII em gel de agarose 1%. MP (Marcador de peso molecular) de 1 kb; MC1-MC7 (Pacientes).



Fonte: Autor

5.2 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras permitiu caracterizar os haplótipos presentes na região HRVI e HRVII do DNAmT dos pacientes. O resultado obtido forneceu quatorze sequências nucleotídicas, sete pertencentes à região HVI e sete pertencentes à região HVII. Os eletroferogramas gerados das sequências nucleotídicas foram de boa qualidade com picos bem estabelecidos, sem ruídos e valores de confiança (Phred: medida da qualidade de bases nucleotídicas geradas por sequenciamento) igual ou superior a 25 (Apêndice A e B).

A análise do programa *Mitomaster* gerou 84 haplótipos, dos sete pacientes. Dos haplótipos gerados seis (73G; 315C; 16223T; 16126C; 16362C; 263G) foram encontrados na maioria dos indivíduos (Tabela 4). Os polimorfismos foram separados por paciente e região hipervariável (Tabela 5 e 6).

Tabela 4 - Haplótipos mais frequentes na análise

| Haplótipos | Repetição* |
|------------|------------|
| 73G | 7 |
| 315C | 7 |
| 16223T | 6 |
| 16126C | 4 |

| | |
|--------|---|
| 16362C | 5 |
| 263G | 7 |

* Número de indivíduos que apresentaram o haplótipo (Fonte:Autor)

Tabela 5 - Haplótipos encontrados na região HRVI de cada paciente

| Paciente | Haplótipos |
|----------|--|
| MC1 | 16111T, 16126C, 16223T, 16259T, 16290T, 16319A, 16362C |
| MC2 | 16223T, 16311C, 16327T |
| MC3 | 16124C, 16223T, 16278T, 16362C, 16390A |
| MC4 | 16114A, 16129A, 16213A, 16223T, 16278T, 16355T, 16362C |
| MC5 | 16111T, 16126C, 16223T, 16259T, 16290T, 16319A, 16362C |
| MC6 | 16069T, 16126C |
| MC7 | 16126C, 16223T, 16278T, 16290T, 16319A, 16362C |

Fonte: Autor

Tabela 6- Haplótipos encontrados na região HRVII de cada paciente

| Paciente | Haplótipos |
|----------|--|
| MC1 | 73G, 146C, 153G, 235G, 263G, 315C |
| MC2 | 73G, 150T, 185A, 189G, 263G, 315C |
| MC3 | 73G, 263G, 315C |
| MC4 | 73G, 150T, 152C, 182T, 195C, 198T, 204C, 263G, 315C |
| MC5 | 73G, 146C, 153G, 235G, 263G, 315C |
| MC6 | 73G, 185A, 228A, 263G, 295T, 315C |
| MC7 | 59C, C64T, 73G, T146C, T152C, 153G, 235G, 263G, 297G, 315C |

Fonte: Autor

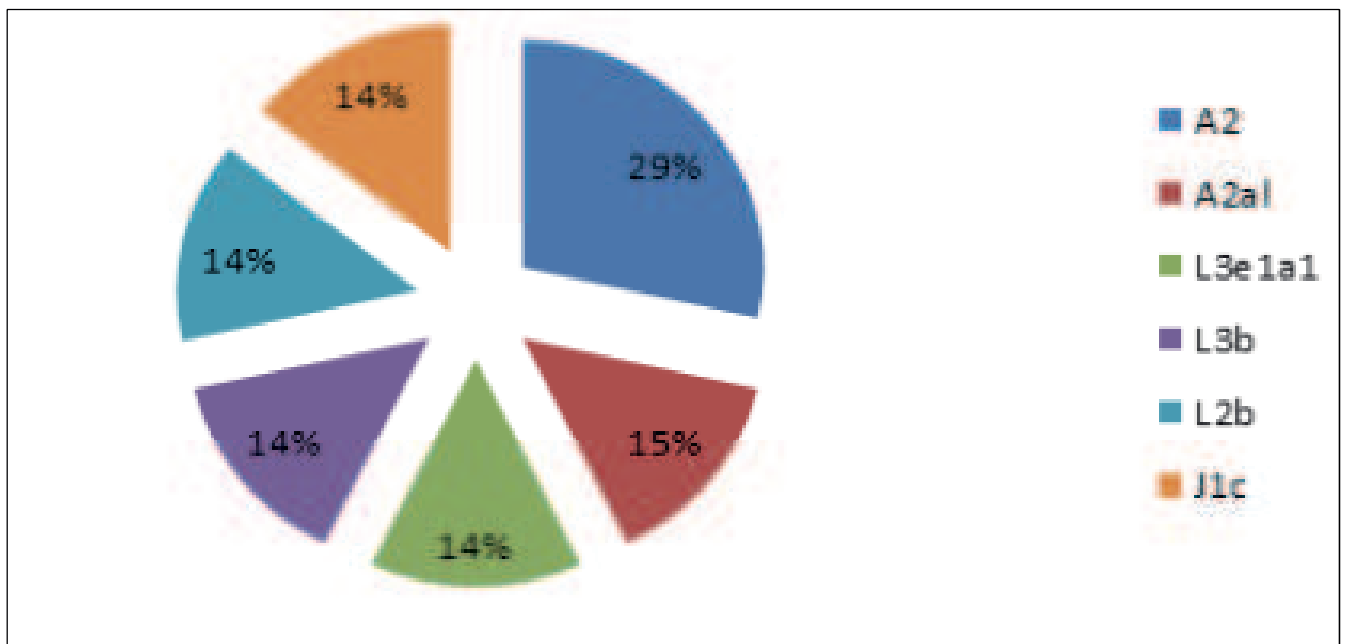
A análise do software *Haplogrep* mostrou que os pacientes pertencem a 6 haplogrupos diferentes (A2, L3e1a1, L3b, L2b, J1c, A2a1) Apesar de o universo amostral ser pequeno, foram encontradas linhagens mitocôndrias das três etnias (europeia, africana e ameríndia) formadoras da população brasileira (Tabela 7; Figura 7). As contribuições africanas e ameríndias prevaleceram com 43% e a contribuição europeia foi de 14% (Figura 8).

Tabela 7 - Haplogrupos obtidos a partir dos polimorfismos encontrados

| Amostra | Haplogrupo | Linhagem |
|---------|------------|-----------|
| MC1 | A2 | Ameríndia |
| MC2 | L3e1a1 | Africana |
| MC3 | L3b | Africana |
| MC4 | L2b | Africana |
| MC5 | A2 | Ameríndia |
| MC6 | J1c | Europeia |
| MC7 | A2a1 | Ameríndia |

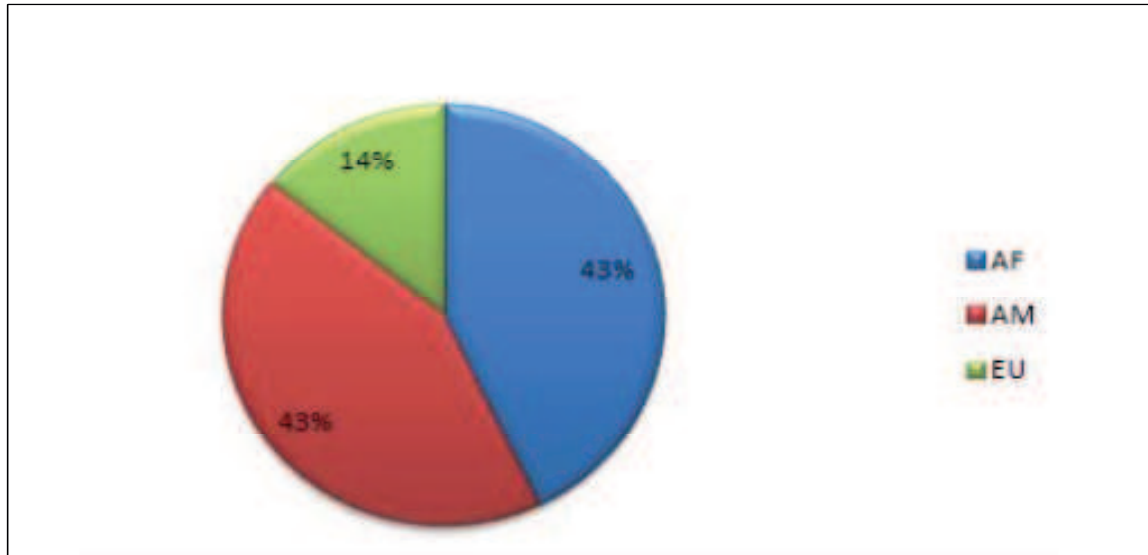
Fonte: Autor

Figura 7 - Proporção dos haplogrupos mitocondriais observados



Fonte: Autor

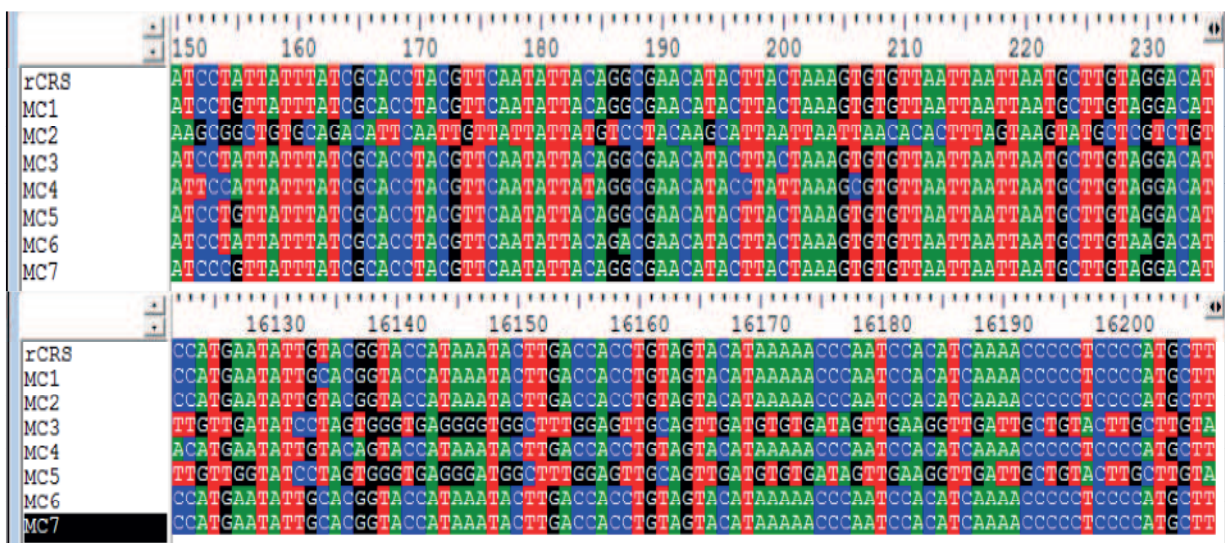
Figura 8 - Proporção da ancestralidade materna observada



AF: Africano; AM: Ameríndio; EU: Europeu (Fonte: Autora)

O alinhamento múltiplo das sequências (Figura 9) foi realizado no programa *Bioedit*, para fins de comparação foi adicionada a sequência controle do genoma mitocondrial (rCRS), revisada por Andrews e colaboradores em 1999. A partir deste alinhamento foram estabelecidos os sítios de mutações entre as sequências.

Figura 9- Sequências nucleotídicas após alinhamento com a sequência controle rCRS



Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou a variabilidade genética do DNAmT de pacientes paraibanos com mucopolissacaridose tipo III-C. Apesar dos indivíduos da pesquisa pertencerem a um grupo especial da população, os dados obtidos corroboram com estudos históricos relacionados ao processo de povoamento.

As contribuições das linhagens mitocondriais do presente universo amostral revelou a presença de 6 haplogrupos representantes dos três grupos populacionais fundadores da população brasileira. A predominância ameríndia foi obtida a partir da presença dos haplogrupos A2 (29%), A2a(15%), enquanto a contribuição africana foi representada pelos haplogrupos L3e1a1(14%), L3b (14%), L2b (14%). O haplogrupo J1c (14%) foi o único representante europeu.

O haplogrupo A é típico dos nativos americanos, principalmente, da América do Norte, estando presente também no leste asiático. Do mesmo modo, o haplogrupo A2 e A2a encontrados nos pacientes com MPS III, são típicos da América do norte e do extremo Oriente da Sibéria. A presença desses haplogrupos nos pacientes paraibanos está de acordo com a história, o território brasileiro foi habitado primeiramente de povos vindos da Sibéria que povoaram a América do Norte e chegaram a América do sul.

O haplogrupo africano L3b é característico do nordeste da África ocidental, enquanto o L3e1a1 é encontrado na África Central, em conjunto com a contribuição ameríndia, a presença desses haplogrupos no presente grupo de estudo confirma o processo da formação da população, as mulheres africanas inseridas no território brasileiro deixaram sua evidente descendência.

A contribuição europeia por meio do haplogrupo J1c, encontrado em toda a Europa é a menor frequência dos resultados obtidos nesse estudo. Assim, a história do DNAmT brasileiro mais uma vez corrobora com dados históricos. A menor contribuição do DNAmT europeu em território brasileiro, particularmente, em território paraibano é explicado pela falta de mulheres europeias no início da colonização, seguindo o processo do povoamento, mesmo com a presença de mais mulheres europeias, as relações dos europeus com as nativas e africanas se sobressaíram, e a contribuição desse DNAmT foi contida.

Alves-Silva e colaboradores (2000) realizaram uma pesquisa com o DNAmT de brasileiros, o resultado mostrou que a maior parte das matrilineagens brasileiras são ameríndias, seguida de contribuições africanas e europeias. Do mesmo modo Mendes (2005)

no seu estudo em comunidades da Amazônia encontrou haplogrupos representantes da população ameríndia e africana, no entanto, nenhum haplogrupo europeu foi encontrado.

Representando a região centro-oeste Barcelos (2010) analisou o DNAmT de comunidades da população do centro-oeste brasileiro, seus resultados mostraram que a contribuição ameríndia prevaleceu, seguida da contribuição africana e europeia.

PENA e colaboradores (2002) realizaram um estudo com o DNAmT da população brasileira, no qual os resultados divergem dos dados apresentados até o momento. Uma distribuição de origem geográficas uniformes com 33% de linhagens ameríndia, 28% de africanos e 39% de europeias. Os haplogrupos europeus mais comuns encontrados no Brasil foram o H (44%), T (14%) e J (11%). Os haplogrupos L3 e L1c, juntos, constituem quase metade (49%) da constituição africana no Brasil (49%) e os principais haplogrupos dos ameríndios (A, B, C e D) foram encontrados em brasileiros brancos. O haplogrupo A foi o mais frequente (30%), seguido pelos haplogrupos B (29%), C (24%) e D (16%).

Um estudo na Finlândia revelou que a população finlandesa apresenta doenças genéticas raras e incomuns ou desconhecidas em outros países (CAVALLI-SFORZA, 2003). A explicação genética para esse fenômeno é uma deriva genética extrema comum em populações que se originaram de um número pequeno de fundadores (LYNN *et al*, 2010). O padrão de doenças genéticas é significativamente alterado tornando uma característica rara em uma população comum em outra. Nesse contexto o efeito fundador assume grande importância em populações com o número de fundadores pequeno (CAVALLI-SFORZA, 2003).

O Brasil, com ênfase para a Paraíba, assim com a Finlândia, teve na sua formação um número pequeno de fundadores, as contribuições europeias, africanas e ameríndias são as responsáveis pela maioria dos genótipos presentes nos territórios. As frequências gênicas nas pequenas cidades da Paraíba podem ter se desviado substancialmente de uma geração para outra, caracterizando uma deriva genética. Além de uma possível deriva genética, no nordeste brasileiro casamentos consanguíneos são comuns. Santos e colaboradores (2013) realizaram um estudo com famílias nordestinas, o resultado obtido revelou alta frequência de casamentos consanguíneos em pessoas com deficiência (9% para 32%).

7 CONCLUSÃO

Com os dados obtidos, pode-se inferir que a ancestralidade materna dos pacientes paraibanos com MPS III-C não difere da população geral. As contribuições ameríndias e africanas prevaleceram. Desta forma, é provável que a origem da mutação responsável pelo desenvolvimento de MPS III-C não esteja ligada diretamente à ancestralidade materna, visto que, não há uma diferença significativa das frequências populacionais encontradas no grupo de estudo e a população paraibana não afetada pela MPS III-C. Por se tratar de uma doença rara e existir um subdiagnóstico no Brasil, o número amostral da presente pesquisa foi baixo, podendo ter influenciado no resultado final. Espera-se que pesquisas futuras possam continuar o estudo com pacientes diagnosticados com mucopolissacaridoses, e em um futuro próximo se tenha as informações necessárias para compreender melhor o padrão evolutivo que mantém a alta frequência destes pacientes na população paraibana.

REFERÊNCIAS

- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **The American Journal of Human Genetics**. v.67, p.444-461, 2000.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARREL, B.G.; de BRUIJM, M.H.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIR, P.H.; SMITH, A.J.H.; STADEN, R.; YOUNG, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 9, p. 457-465, 1981.
- ANDREWS, R.M.; KUBACKA, I.; CHINNERY, P.F.; LIGHTOWLERS, R.N.; TURNBULL, D.M.; HOWELL, N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, 1999.
- BARCELOS, R, S, S. **Contribuição genética de duas populações urbanas da região centro-oeste brasileira estimada por marcadores uniparentais**. (Tese de doutorado), UnB, Brasília, 2006.
- BERGUIGUI, M; ARENAS, M. Spatial and temporal simulation of human evolution. Methods, frame-work and applications. **Current Genomics**. V. 15, n° 4, p. 245-255. 2014.
- BICALHO, C. **Avaliação do comprometimento auditivo em pacientes com mucopolissacaridose**. FIOCRUZ: Salvador, 2015.
- BONFIELD, J.K.; SMITH, K.F.; STADEN R. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 24, p. 4992-4999, 1995.
- BRANDON, M.C.; RUIZ-PESINI, E.; MISHMAR, D.; PROCACCIO, V.; LOTT, M.T.; NQUYEN, K.C.; SPOLIM, S.; PATIL, U.; BALDI, P.; WALLACE, D.C. Mitomaster: a bioinformatics tool for the analysis of mitochondrial DNA sequences. **Human Mutation**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2009.
- 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. **Genes, povos e línguas**. Ed. Companhia das letras. São Paulo, 2003.
- DELGADILLO, V; O'CALLAGHAN, M; GORT, L; COLL, M; PINEDA, M. Natural history of Sanfilippo syndrome in Spain. **Orphanet journal of rare diseases**. 2013.
- FAUSTO, B. **História do Brasil: Cobre, um período de mais de quinhentos anos, desde as raízes da colonização portuguesa até nossos dias**. São Paulo: Edusp. 1996.
- FEDELE, A. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. **The Application of Clinical Genetics** . v.8, p. 269- 280, 2015.
- FELDHAMMER, M; DURAND, S; MRAZOVA, L; BOUCHER, R; LAFRAMBOISE,

R;STEINFELD, R; WRAITH, J; MICHELAKAKIS, H; DIGGELEN,O; HREBICEK, M; KMOCH, S; PSHEZHETSKY, A. Sanfilippo Syndrome Type C: Mutation Spectrum in the Heparan Sulfate Acetyl-CoA: a-Glucosaminide N-Acetyltransferase (HGSNAT) Gene. **Human mutation**. V. 30, n° 6, p. 918-925, 2009.

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

GIUGLIANI,R; FEDERHEN, A;ROJAS; M. terapia de reposição enzimática para as mucopolissacaridoses iii e vi: recomendações de um grupo de especialistas brasileiros. **Associação Brasileira de medicina**. n°53, v.56, n°3, p.257-277, 2010.

GUARANY, N. **Avaliação do efeito da terapia de reposição enzimática na capacidade funcional de pacientes com mucopolissacaridose**. UFRGS, Porto Alegre, 2011

HREBICEK, M; MRAZOVA,L; SEYRANTEPE, V; DURAND,S; ROSLIN, N; NOSKOVA,L; HARTMANNOVA, H; IVANEK, R; CIZKOVA, A; POUPETOVA, H; SIKORA, J; URINOVSKA, J; STRANECKY, V; ZEMAN, J; LEPAGE,P; ROQUIS, D; VERNER, A; AUSSEIL, J; BEESLEY,C; MAIRE, I; POORTHUIS, B; KAMP, J; DIGGELEN, O; WEVERS, HUDSON, T; FUJIWARA, M; MAJEWSKI, J; MORGAN,K; KMOCH, S; PSHEZHETSKY, A. Mutations in *TMEM76** Cause Mucopolysaccharidosis IIC (Sanfilippo C Syndrome). **The american journal of human genetics**. V.79, p.807-819, 2006.

IBGE. **Cidades**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=2503100>>. Acessado em: 03/09/2016.

IBGE. Censo Demográfico 2010. Rio de Janeiro. Disponível em; <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/>>. Acessado em: 03/09/2016.

KLOSS-BRANDSTAETTER, A.; PACHER, D.; SCHOENHERR, S.; WEISSENSTEINER, H.; BINNA, R.; SPECHT, G.; KRONENBERG, F. **HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups**. 2010.

KUMAR, S; BELLIS, C; ZLOJUTRO, M; MELTON, P. E; BLANGERO, J; CURRAN, J. E. “Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins” **BMC evolutionary biology**, (2011).

LANGERGRABER, K.E; PRUFER, K; ROWNY, C; BOESCH, C; CROCKFORD, C; FAWCETT, E. I; INOUE-MURUYAMA, M; MITANI, J. C; MULLER, M. N; ROBBINS, M.M; SCHUBERT, G; STOINSKI, T.S; VIOLA, B; WATTS, D; WITTIG, R.M; WRANGHAM, R.W; ZUBERBUHLER, K; PAABO, S; VIGILANT, L. Generation times in wild chimpanzees and gorillas suggest earlier divergence times in great ape and human evolution. **PNAS**. V. 109, n°39, p. 15716-15721. 2012.

LIMA, N. **Monitoramento da excreção de glicosaminoglicanos em pacientes com mucopolissacaridoses submetidos à terapia de reposição enzimática**. UFP. Bélem, 2009.

- LYNN, B; JOHN, C; MICHAEL, J. **Genética médica**. 4^a ed. Ed. Elsevier, 2010.
- MACHADO, T; BOMFIM, T; MANZOLI, G; ACOSTA, A; MEYER, R; ABÉ-SANDES, K. **Marcadores informativos de ancestralidade autossômicos em doenças genéticas**. XXII Congresso Brasileiro de Genética Médica, Salvador, 2010.
- MASLIN, M; SHULTZ, S; TRAUTH, M. A Synthesis of the theories and concepts of early human evolution. **Philosophical Transactions B**. 2015.
- MELLO, J.O.A. **História da Paraíba: Lutas e resistência**. João Pessoa: Ed. A união 1994.
- MENDES, C, T. **DNA Mitochondrial na Amazônia Brasileira: Estrutura Genética Regional e Inferências Continentais**. (Tese de Doutorado) USP, Ribeirão preto, 2005.
- MORAIS, P.J.S. **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de cabo verde residentes em Lisboa**. Escola superior de saúde Egag Moniz [Dissertação de mestrado]. 2013.
- MOREIRA, E; TARGINO, I; SILVA, L.M.G; SILVA, M.V.T; LIMA, G.L. Estruturação do território municipal paraibano: na busca das origens. **Cadernos do logepa**. v. 2, p. 81-93. 2003.
- PENA, S.D.J.; CARVALHO-SILVA, D.R.; ALVES-SILVA, J.; PRADO, V.F.; SANTOS, F.R. Retrato molecular do Brasil. **Ciência Hoje**, v. 27, n° 159, p. 16-25, 2000.
- PENA, S.D.J. **Homo Brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro**. Ribeirão Preto: Funpec. 2002.
- PIERRON, D; CHANG, I; ARACHICHE, A; HEISK, M; THOMS, O; BORLIN, M; MURAIL, P; THORAVAL, D; ROCHER, C; LETGILLIER, T. Mutation rate switch inside Eurasian mitochondrial haplogroups: Impact of selection and consequences for dating settlement in Europe. **PLoS ONE**. v.6, Issue 6. p. e21543. 2011.
- PRADO, V.F; ALVES-SILVA, J. Linhagens mitocondriais em populações nativas das américas. In: PENA (org). **Homo Brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro**. Ribeirão Preto: Funpec. p. 63-71, 2002.
- PROUS, A. Dossiê surgimento do homem na América. **Revista USP**. n, 34 p.8-21. 1997
- POUPĚTOVÁ, H; LEDVINOVÁ, J; BERNÁ, L; Dvořáková, L; Kožich, V; Elleder, M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 33. p. 387-396, 2010.
- PSHEZHETSKY, A. Crosstalk between 2 organelles: Lysosomal storage of heparan sulfate causes mitochondrial defects and neuronal death in mucopolysaccharidosis III type C. **Rare Diseases**. v,3, p. 1049793-1- 1049793-7, 2015.
- RAMOS, J.S. O Brasil sob o paradigma racial: sociologia histórica de uma representação. .In: PENA (org). **Homo Brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro**. Ribeirão Preto: Funpec. p. 131-148, 2002.

- RIBEIRO, P. **O sujeito na mucopolissacaridose: uma análise discursiva**. UCT. Recife, 2013.
- RIBEIRO D, **O Povo Brasileiro: Formação e Sentido do Brasil**. São Paulo, Companhia das letras. 1995.
- RINCON, D. **Estudos de DNA mitocondrial em populações remanescentes de Quilombos do Vale do Ribeira – São Paulo**. Instituto de Biociências: São Paulo, 2009.
- ROCHA, J. S. **História da colonização do Brasil**. v. 2. Rio de Janeiro, imprensa nacional: Rio de Janeiro, 1919. Disponível em: <<https://archive.org/details/hiscoloniz1919roch>> Acessado em: 07/ 09/ 2016.
- SANTOS, F.R. A história do povoamento pré-colombiano das Américas e o cromossomo Y humana. In: PENA (org). **Homo Brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro**. Ribeirão Preto: Funpec. P. 41-62, 2002.
- SANTOS, S. et al. As causas da deficiência física em municípios do Nordeste brasileiro e estimativa de custos de serviços especializados. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 19, n. 1, p. 1-2, 2013.
- SANTOS-LOPES, S.S; PEREIRA, R.W; WILSON, I.J; PENA, S.D.J. A worldwide phylogeography for the human X chromosome. **PLoS ONE**. v.2, nº6, p.e557. 2007.
- TURRA, G; SCHWARTZ, I. Evaluation of orofacial motricity in patients with mucopolysaccharidosis: a cross-sectional study. **Jornal de Pediatria**. V.85, nº 3, p. 254-260, 2009.
- VIEIRA, T; SCHWARTZ, I; MUÑOZ, V; PINTO, L; STEINER, C; RIBEIRO, M; BOY, R; FERRAZ, V; PAULA, A; KIM, C; ACOSTA, A; GIUGLIANI, R. Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From Birth to Biochemical Diagnosis?. **AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS**. P. 1741-1747, 2007.
- WANG, S; LEWIS, C; JAKOBSSON,M; RAMACHANDRAN, S;RAY, N; BEDOYA, G; ROJAS, W; PARR, M.V; MOLINA. J.A; GALLO, C; MAZZOTI, G; HILL, K; HURTADO, A.M; LABUDA, D; KLITZ,W; BARRANTE, R; BORTOLINI, M; SALZANO, F.M; PETZL-ERLER,M; TSUNETO, L.T; ROTHHAMMER,F; EXCOFFIER, L; FELDMAM, M.W; ROSENBERG, N.A; RUIZ-LINARES, A. Genetic variation and population structure in native americans. **PLoS Genetics**. V.3,nº11, p.e185. 2007
- XAVIER, C; BUILES, J.J; GOMES, V; OSPINO, J.M; AQUINO, J; PARSON, W; AMORIM, A; GUSMÃO, L; GOIOS, A. **Admixture and genetic diversity distribution patterns of non-recombining lineages of native american ancestry in colombian population**. V. 10, nº 3, p. e0120155, 2015

APÊNDICE A- Eletroferogramas da região HRVI de todos os indivíduos analisados e o seus valores de confiança (Phred)



APÊNDICE B- Eletroferogramas da região HRVII de todos os indivíduos analisados e o seus valores de confiança (Phred)

