



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

MICAELA DE MELO CORDEIRO EULÁLIO

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-  
C COM MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIM)**

**CAMPINA GRANDE  
2017**

MICAELA DE MELO CORDEIRO EULÁLIO

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-C COM MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIM)**

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

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Silva dos Santos Lopes.

**CAMPINA GRANDE**  
2017

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.

E88a Eulálio, Micaela de Melo Cordeiro.  
Ancestralidade de pacientes com mucopolissacaridose tipo III-C com Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIM)  
[manuscrito] / Micaela de Melo Cordeiro Eulálio. - 2017.  
44 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

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

1. Variabilidade genética. 2. Doenças genéticas. 3. Mucopolissacaridose. 4. Marcadores moleculares. I. Título.

21. ed. CDD 576.54

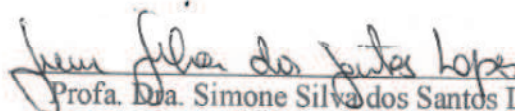
MICAELA DE MELO CORDEIRO EULÁLIO

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III-C COM MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIM)**

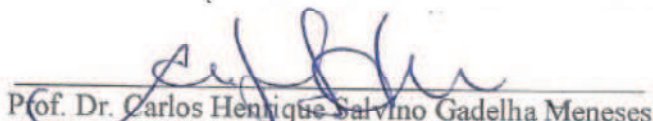
Trabalho de Conclusão de apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

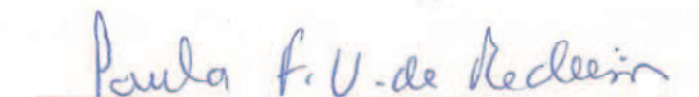
Aprovada em: 11/04/17.

**BANCA EXAMINADORA**



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

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

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

Ao meu pai, pela dedicação, companheirismo e amizade, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual da Paraíba por ter cedido o espaço, proporcionando essa pesquisa.

À toda a equipe do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da UEPB, por toda ajuda e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

À minha orientadora e professora Dra. Simone Lopes, por ter me acolhido tão carinhosamente no laboratório, e por ter me mostrado a importância dessa área do conhecimento, me proporcionando experiências que levarei para o resto da vida.

Ao professor Dr. Carlos Henrique por ter sido sempre tão prestativo, pelas dicas e esclarecimentos.

À Dra. Paula Franssinetti por ter cedido as amostras, proporcionando a realização desta pesquisa.

À minha mãe, Maria José, por não ter medido esforços para me dar tudo o que precisei, e por todo o apoio e carinho. Por ser sempre a primeira a torcer pela realização dos meus sonhos.

Ao meu pai, Antônio Eulálio, que sempre me apoiou nos estudos, e entendia minha ausência durante a graduação, e que mesmo não estando mais entre nós, continua no meu coração e nos meus pensamentos sempre, me dando força para ir além.

À minha irmã, Marcela Eulálio, pela ajuda nas horas mais difíceis da escrita, quando eu acreditava não saber mais de nada, tamanho era o meu cansaço. E ao meu irmão, Marcelino Eulálio, por sempre estar ao meu lado.

À minha companheira e amiga, Jessica Soares, por todo o seu carinho e paciência, e por sempre me mostrar que esse não é o fim, e sim o começo de uma longa estrada.

Aos meus avós, tios e primos, que mesmo distantes, me dão toda força e pela compreensão na minha ausência nos encontros familiares.

À todos os meus amigos, Swami, Isabella Johanes, Thayane, Bruna, Maria Luiza, Dulceria, Vanuza, Raony, Jessica Amanda, Gabriela Lucena, Fernanda Santiago, Mayara, etc. que me acompanharam de perto nesta longa caminhada.

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

Carl Jung

## RESUMO

A população brasileira deriva de um complexo processo de miscigenação entre as três populações parentais: europeus, ameríndios e africanos, o que a torna uma das mais heterogêneas do mundo. Inúmeros estudos tentam compreender do ponto de vista genético, como se deu a formação do povo brasileiro, e qual seria a distribuição da contribuição real dos três grupos étnicos em sua composição genética. Uma ferramenta bastante utilizada nestas pesquisas são os marcadores moleculares, os quais possibilitam inferir a ancestralidade dos indivíduos estudados. O presente estudo objetivou identificar a ancestralidade dos pacientes com mucopolissacaridose tipo III-C no estado da Paraíba, acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) com os Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIM) (APO4, AT3id, Sb19.3, CCR5 e PV92). Foram analisados sete pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para Mucopolissacaridose tipo III-C. Estes pacientes são oriundos das cidades de Mogeiro, Catolé do Rocha, Taperoá, Alagoa Nova e Cabaceiras no estado da Paraíba. Para análise dos dados de ancestralidade foi utilizado o programa Structure versão 2.3.1 e sua extensão online Structure Harvester v.0.6<sup>2</sup>. As frequências alélicas obtidas dos marcadores utilizados permitiram uma análise comparativa entre as amostras avaliadas no presente estudo e populações mundiais de referência. A variabilidade genética restringiu-se à três populações: africanas, ameríndias e europeias. A contribuição europeia deteve um maior percentual sob as demais, com uma frequência de 42,8% entre os indivíduos, enquanto a africana 35,1% e ameríndia 22,1%. De acordo com os dados obtidos pode-se inferir uma correlação entre o haplótipo causador da doença e a ancestralidade europeia, demonstrando a possibilidade da ocorrência de um efeito fundador para a doença no estado da Paraíba.

**Palavras-Chave:** Paraíba. Variabilidade genética. Structure.



## ABSTRACT

The Brazilian population driftage from a complex process of miscegenation among three parental populations: Europeans, Amerindians and Africans, resulting in one of the most heterogeneous population all over the world. Several studies attempt to comprehend, based on the genetic point of view, how the formation of the Brazilian people occurred, and what is the real statistic contribution of the three ethnic groups in their genetic composition would be. A widely used tool in such surveys are the molecular markers, which make it possible to infer the ancestry of the studied individuals. The present study aimed to identify the ancestry in patients with type III-C mucopolysaccharidosis in Paraíba state, whose follow-ups takes place at the University Hospital Alcides Carneiro (HUAC), with the Ancestral Information Markers (AIM) (APO4, AT3id, Sb19.3, CCR5 and PV92). Seven patients with a confirmed clinical-laboratory diagnosis for type III-C Mucopolysaccharidosis were analyzed. These patients come from Mogeiro, Catolé do Rocha, Taperoá, Alagoa Nova and Cabaceiras cities, in Paraíba state. For the analysis of the ancestral data the Structure program version 2.3.1 and its online extension Structure Harvester v.0.62 were used. The allele frequencies obtained from the markers allowed a comparative analysis between the samples evaluated in the present study and reference world populations. Genetic variability was restricted to three populations: African, Amerindian, and European. The European contribution had a higher percentage over the others, with a frequency of 42.8% among the individuals, while African and Amerindian demonstrated 35.1% and 22.1%, respectively. According to the obtained data, a correlation can be inferred between the haplotype that causes the disease and the European ancestry, demonstrating the possibility of a founding effect for the disease in Paraíba state.

**KEYWORDS:** Paraíba. Genetic variability. Structure.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Movimentos migratórios de grupos humanos .....	15
Figura 2 – Mapa da Paraíba .....	25
Figura 3 – Estimativa da mistura interétnica .....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das MPS .....	21
Tabela 2 – AIMs utilizados no estudo .....	26
Tabela 3 – Localização citogenética dos loci analisados .....	28
Tabela 4 – Frequência alélica dos AIMs estudados .....	28
Tabela 5 – Variabilidade genética individual das amostras estudadas .....	29
Tabela 6 – Comparação das frequências obtidas para os AIMs (PV92, AT3-I/D, APO4 e Sb19.3) com a de populações mundiais	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIMs	Ancestry Informative Markers (Marcadores Informativos de Ancestralidade)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>Indel</i>	Inserção/ Deleção
LGBM	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PSAs	<i>Population-specific Allele</i> (Alelos específicos de populações)
TBE	Tris-Borato-EDTA
U	Unidade
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
V	Volts
v.	Versão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
	2.1 Objetivo geral .....	14
	2.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
	3.1 Povoamento das américas .....	15
	3.2 Formação da população brasileira .....	16
	3.3 Colonização e história da Paraíba .....	16
	3.4 Marcadores moleculares .....	17
	3.5 Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) .....	18
	3.5.1 Inserção Alu (Sb19.3, APO4 e PV92) .....	18
	3.5.2 Inserção/ Deleção (Indel) – (AT3-I/D) .....	19
	3.5.3 Deleção (CCR5 $\Delta$ 32) .....	20
	3.6 Doenças genéticas .....	20
	3.6.1 Mucopolissacaridoses .....	21
	3.6.2 MPS tipo III-C .....	23
<b>4</b>	<b>PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	25
	4.1 Local do estudo e amostragem .....	25
	4.2 Obtenção do material genético .....	26
	4.3 Extração de DNA .....	26
	4.4 Amplificação .....	26
	4.5 Análise dos dados .....	27
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	28
	5.1 Análise dos marcadores informativos de ancestralidade .....	28
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	33
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
	<b>APÊNDICE A</b> – Concentrações adotadas para as reações de PCR .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

São muitos os estudiosos que debatem sobre a formação da população brasileira. No entanto, todos concordam que derivamos de um complexo processo de miscigenação entre ameríndios, europeus e africanos, sendo o questionamento mais frequente: quanto há de ameríndio, europeu e africano em cada um de nós?

Os estudos genéticos sobre a formação do povo brasileiro revelam que a maioria das patrilinhagens da população brasileira é de origem europeia (provavelmente mais de 90%), enquanto a maioria das matrinhagens (cerca de 60%) é de origem ameríndia ou africana, muito embora, possa haver diferenças significativas entre as várias regiões do país (PENA et al., 2000; SANTOS et al., 2006).

Esses dados genéticos corroboram com dados históricos sobre o início da colonização brasileira, dado que os colonos portugueses não trouxeram suas mulheres, acarretando no relacionamento entre homens portugueses e mulheres indígenas, e mais tarde, com as africanas (BARROS, 2006).

A estratificação populacional pode agir como um fator de confusão em pesquisas de associação ou caso/controle, de forma que diversos trabalhos indicam a averiguação da composição étnica por meio de marcadores de ancestralidade (SHRIVER et al., 2003; GATTÁS et al. 2004, ZEMBRZUSKI et al, 2006).

A ferramenta molecular escolhida para as análises do estudo em questão foi os AIMS, que apresentam vantagens por serem de genotipagem fácil e relativamente barata, além de serem abundantes no genoma humano (RAY et al., 2005). Também possuem alto diferencial de frequência alélica ( $\delta$ ) entre populações mundiais e, portanto, podem ser utilizados para caracterizar a composição genética de populações miscigenadas (PARRA et al. 2003; BEUTEN et al. 2011).

Dentre as doenças que se comportam de forma variável entre os grupos étnicos, está a mucopolissacaridose tipo III-C (MPS III-C), que é uma doença hereditária autossômica recessiva de depósito lisossômico. As mucopolissacaridoses (MPSs) englobam um grupo heterogêneo de doenças metabólicas hereditárias, com variadas incidências mundiais entre 1,9 a 4,5 para cada 100.000 recém-nascidos vivos (POORTHUIS et al., 1999; APPLGARTH et al., 2000; NELSON et al., 2013). As MPS são caracterizadas pelo acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) dentro dos lisossomos, devido à deficiência de uma enzima lisossômica que atua na degradação desses GAGs.

A MPS III-C é uma doença rara, visto que afeta um pequeno número de pessoas quando comparado com a população em geral (FELDHAMMER, 2009). No estado da Paraíba, foram diagnosticados sete pacientes com essa doença, mostrando sua elevada frequência no estado.

Devido a elevada frequência de MPS III-C na Paraíba, o objetivo deste estudo é identificar a ancestralidade dos pacientes por meio dos marcadores informativos de ancestralidade (AIM) (PV92, Sb19.3, AT3i.c, CCR5 e APO4).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar a ancestralidade dos pacientes com mucopolissacaridose tipo III-C no estado da Paraíba, acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC), com os marcadores informativos de ancestralidade (AIM) (APO4, AT3id, Sb19.3, CCR5 e PV92).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar as frequências alélicas dos marcadores autossômicos específicos de população (Sb19.3, APO4, PV92, AT3id e CCR5);
- Estimar a contribuição das linhagens ancestrais africanas, ameríndias e europeias nesse grupo de estudo;
- Comparar os dados obtidos com os de outras populações.



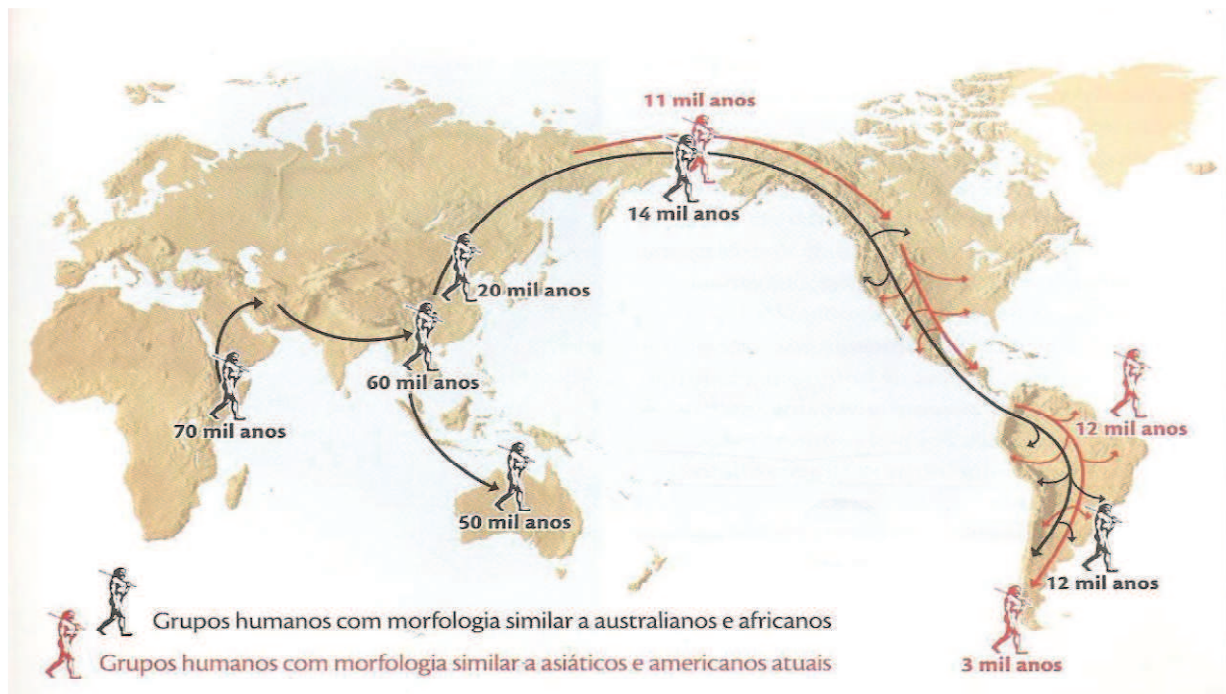
### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Povoamento das Américas

Os dados genéticos oferecem grande potencial para o estudo da história da população humana, sendo, por isso, utilizados com frequência para esclarecer dúvidas a respeito das ondas migratórias, que são alvo de grande discussão nos dias atuais. Com isso, o processo de pré-colonização do Novo Mundo vem sendo estudado através de evidências arqueológicas, anatômicas, linguísticas e genéticas (HEY, 2005).

Uma das teorias do processo de pré-colonização das Américas consiste na saída de grupos humanos da África em direção ao continente asiático, dispersando-se progressivamente em direção ao leste ibérico, região do Estreito de Bering e chegando as Américas até então despovoada (Figura 1).

Outras teorias sobre essas rotas migratórias estão em constante debate, apontando a chegada desses grupos através da passagem pela costa do Oceano Pacífico, bem como por migrações provenientes da África via Oceano Atlântico (SENE, 2013).



**Figura 1** – Movimentos migratórios de grupos humanos. Fonte: adaptada de SENE, 2013.

### **3.2. Formação da população brasileira**

Há aproximadamente 500 anos, com a chegada de Pedro Álvares Cabral, o Brasil começou a ser colonizado pelos europeus. Estima-se que, na época do descobrimento, existiam cerca de 2,5 milhões de índios nas terras brasileiras (SALZANO e FREIRE-MAIA, 1970 apud ALVES-SILVA et al., 2000), logo, a chegada dos portugueses ao território brasileiro nos primeiros anos não causou desequilíbrio. Entretanto, décadas após a ocupação foram chegando às terras brasileiras povos oriundos da Holanda, França, Espanha e, principalmente, Portugal atraídos pelas riquezas e recursos naturais (BARROS, 2006).

Assim, historicamente, a atual população brasileira é uma mistura de três populações parentais: europeus, ameríndios e africanos, devido ao processo de colonização do país. Esse acentuado nível de miscigenação torna a população brasileira uma das mais heterogêneas do mundo (PENA et al., 2000; BARROS, 2006).

São numerosos os estudos que tentam compreender, do ponto de vista genético, o processo que gerou o povo brasileiro, e qual seria a contribuição real dos três grupos étnicos em sua composição genética (LOPES, 2007). O trabalho inicial foi desenvolvido por Pena (2000), conhecido como “Retrato Molecular do Brasil” o qual analisou homens auto-classificados como brancos em quatro regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul). Os resultados obtidos demonstraram uma linhagem paterna quase exclusivamente europeia, enquanto que a herança materna estava distribuída entre africana, ameríndia e europeia.

### **3.3. Colonização e história da Paraíba**

A Paraíba, estado da região nordeste do Brasil que ocupa uma área de 56.340,9 km<sup>2</sup> e possui 223 municípios, tem como capital a cidade de João Pessoa. Segundo dados do IBGE (Censo 2010), a Paraíba possui uma população equivalente a 3.766.528 pessoas, sendo 52,7% das pessoas pardas, 39,8% brancas, 5,7% negras e apenas 1,8% amarela ou indígena; isso de acordo com o sistema de autotaxonomia.

O Brasil apresenta um histórico de miscigenação dado que seu território foi explorado desde as primeiras décadas do século XV por indivíduos interessados no comércio de Pau-brasil (RIBEIRO, 1995).

Desde meados de 1520, os franceses já frequentavam nosso território, formando uma aliança com os índios Potiguaras. Essa tribo não era muito propensa à guerra, por isso, recebeu os franceses em sua convivência mais íntima, permitindo a miscigenação, que unia

homens loiros da França às mulheres Potiguaras. Portanto, quando os primeiros colonizadores portugueses apareceram por essas terras tentando colonizá-las, franceses e potiguaras estavam em bom entendimento para a defesa de seus interesses. Logo, para ganhar força nessa batalha, os portugueses conseguiram conquistar os índios tabajaras e jogá-los contra os seus irmãos potiguaras - ambos eram primitivos ocupantes da terra (RIBEIRO, 1995).

Os portugueses objetivavam a subordinação da Paraíba a Portugal, sendo assim, não mediram forças e marchou, juntamente com os tabajaras, contra os potiguaras. O resultado disso foi a emigração dos potiguaras para o Rio Grande do Norte e a diminuição dos franceses no litoral do estado (MELLO, 2013).

O império português expandia-se no território paraibano por meio dos grandes engenhos de açúcar feitos pela mão de obra escrava dos africanos e essa riqueza atraiu os holandeses. Porém, o controle holandês sobre a Paraíba não durou muito tempo, indo apenas de 1634 a 1654 (vinte anos de duração) e, ainda assim, não foi um domínio total, logo, a miscigenação não foi estimulada. Já os portugueses, atraídos pela beleza das mulheres do território conquistado, iniciaram os primeiros ramos de família (FELINTO, 2000).

### **3.4. Marcadores moleculares**

Pode-se dizer que os marcadores moleculares são sequências de DNA que revelam polimorfismos geneticamente relacionados, podendo ser também definidos como fenótipos moleculares oriundos de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). De acordo com Milach (1998), esses marcadores são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente.

Os marcadores genéticos têm sido elementos essenciais nos estudos de segregação de caracteres hereditários, na análise do comportamento de genes em populações e na reconstrução da história evolutiva de populações, entre outras aplicações (REGITANO et al., 2009).

Há diversos marcadores moleculares utilizados para a identificação de polimorfismos, são eles: os polimorfismos de sequência, tais como: os SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), os polimorfismos de inserções e deleções (INDELS), e os polimorfismos de inserção Alu, que são bastante utilizados em estudos evolutivos populacionais (BASTOS-RODRIGUES et al., 2006).

### 3.5. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)

Na reconstrução da história evolutiva da espécie, considera-se, desde a descrição dos primeiros marcadores genéticos para humanos, que os melhores locais do genoma a serem analisados são aqueles em que podemos diferenciar uma população de outra, quer pela frequência diferencial quer pela ocorrência de um alelo em uma população e em outra não (GONTIJO, 2008).

Os primeiros marcadores com descrições de que apresentavam alelos específicos em uma dada população foram denominados “polimorfismos privados” (GONTIJO, 2008 apud NEEL, 1975). Cada população humana possui seus polimorfismos “privados”, os quais são causados com frequência pelas particularidades genéticas de fundadores individuais.

Os marcadores genéticos são frequentemente utilizados para avaliar a composição ancestral das populações. Porém, a precisão, nas estimativas de mistura étnica, é diretamente dependente do valor de  $\delta$  que possui um alto diferencial de frequência alélica dos marcadores utilizados, portanto, os AIMs são os marcadores ideais para estimativas eficazes de mistura populacional (PARRA et al., 1998), permitindo estimar a contribuição dos diferentes grupos na formação de determinada população, ou seja, inferir sua ancestralidade.

#### 3.5.1. Inserção *Alu* (APO4, Sb19.3 e PV92)

As inserções *Alu* são elementos de transposição, sequências genéticas móveis responsáveis, em parte, por gerar variabilidade genética. São consideradas a maior família de repetições intercalantes curtas (short interspersed elements – SINEs), sendo encontradas exclusivamente no genoma de primatas e representando cerca de 5% do genoma humano, possuindo 290 pb de comprimento (GONTIJO, 2008).

Segundo Batzer e Deininger (2002), caso compartilhem a mesma sequência *Alu* no mesmo local do seu genoma, duas pessoas descendem de um antepassado comum que lhes forneceu aquele segmento específico de DNA, posto que é improvável que o evento de inserção ocorra duas vezes em um mesmo locus.

Outro estudo dirigido por Batzer e colaboradores (1996b) aponta que as sequências *Alu* dentro de um genoma humano podem ser divididas em grupos de elementos que se relacionam com base nas mutações de diagnósticos compartilhados, ou seja, cada inserção *Alu* surgiu dentro da população humana como um evento único na história evolutiva, fazendo esta repetição idêntica por descendência de um ancestral comum.

O *locus Alu* APO se situa no braço longo do cromossomo 11 (BATZER et al., 1994), na região não codificadora próxima ao complexo de genes da apolipoproteína AI-CIII-AIV (KARATHANASIS, 1985), e apresenta-se bastante frequente em europeus dada a sua inserção alélica. Sua amplificação por PCR produz um fragmento de 400pb (presença da inserção) e outro de 110pb (ausência da inserção) (NOVICK et al., 1995).

A inserção *Alu* Sb19.3 pertence à subfamília Yb8 situada no braço curto do cromossomo 19 (19p12), como descrito por Arcot e colaboradores (1995). A presença da inserção caracteriza o alelo Sb19.3\*1, que é apresentado em elevada frequência em europeus, gerando um fragmento de 457pb, presença da inserção, enquanto que a ausência da inserção gera um fragmento de 157pb (MACHADO, 2008).

O *Alu* PV92 localiza-se no cromossomo 16 (Batzer et al., 1994) e a caracterização do alelo *PV92\*1* dá-se devido à presença da inserção *Alu*, a qual gera um fragmento de, aproximadamente, 400pb, sendo mais prevalente em populações asiáticas (MACHADO, 2008).

### 3.5.2. Inserção/ Deleção (*Indel*) – (AT3-I/D)

*Indels* são marcadores genéticos bialélicos caracterizados pela inserção ou deleção de um fragmento ou par de base. Aproximadamente 20% dos polimorfismos que acometem a espécie humana são representados por indels. Eles podem ter sido originados a partir de um evento de retrotransposição com as inserções *Alu* ou por outros eventos mutacionais, como a indel AT3 (WEBER et al., 2002).

A antitrombina III (AT3) faz parte da família dos inibidores da serina protease, tendo como função biológica inativar, irreversivelmente, várias proteinases de coagulação, tais como os fatores IXa, Xa, XaII e trombina (CASPER et al., 2012; MACHADO, 2008). As deleções e inserções resultam em numerosas mutações, e na deficiência de antitrombina III, e apesar de sua baixa prevalência, pode ser decorrente de causas hereditárias ou adquiridas (GODOY et al., 1998; LIMA, 2006).

De acordo com Gontijo (2008), o gene da AT3 localiza-se no cromossomo 1 (1q25.1), possui 19kb, sete éxons e é caracterizado pela presença ou ausência de uma inserção de 76pb no éxon 1 do gene da antitrombina III. A presença dessa inserção gera um fragmento de 572bp e caracteriza o alelo *AT3-I/D\*1*, mais frequente na população africana (PARRA, E., et al., 1998), enquanto que a ausência da inserção caracteriza o *AT3-I/D\*2*, o que, por consequência, resulta na presença de duas bandas de pesos diferentes visualizadas em

eletroforese. A mais pesada corresponde ao alelo AT3\*1 (572pb) e a mais leve, ao alelo AT3\*2, que gera um fragmento de 496pb, mais frequente na população ameríndia (LUIZON, 2003).

### **3.5.3. Deleção (CCR5 $\Delta$ 32)**

O receptor quimiocina 5 (CCR5) pertence a uma família de receptores acoplados a proteínas G que se cruzam a membrana celular, estando envolvido na quimiotaxia dos leucócitos para as áreas de inflamação. O gene que codifica CCR5 está localizado na região p21.3 do cromossomo 3, formando um aglomerado com outros genes dos receptores de quimiocina (MACÊDO, 2003).

O gene *CCR5* possui uma deleção de 32pb, a ausência de deleção gera um fragmento de 225pb, enquanto que a presença gera um fragmento de 193pb. Estudos de genética evolutiva mostraram que essa deleção de 32pb surgiu no norte da Europa há cerca de 1.200 anos e foi disseminada pelo continente europeu pela população Viking. Os europeus apresentam uma alta frequência da deleção  $\Delta$ 32 e esse fato tem sido atribuído a uma forte pressão seletiva, possivelmente exercida por patógenos ou por algumas doenças infecciosas, tais como a varíola, comum naquela época. Atualmente, estimasse que cerca de 10% dos indivíduos de origem europeia tenham a deleção  $\Delta$ 32 no gene *CCR5* (GALVANI et al., 2003).

## **3.6. Doenças genéticas**

O grau de miscigenação da população brasileira foi ocasionado, por um lado, pelos processos migratórios, o que levou ao aumento da diversidade genética, e, por outro, pelas inserções de novas características genotípicas. Essas inserções podem ocasionar mutações genéticas, que, por sua vez, influencia os fatores evolutivos de um povo. As doenças genéticas são um exemplo, tendo a MPS III-C uma possível ligação com os imigrantes que formaram a população no passado (MACHADO, 2012).

A maioria das doenças genéticas são raras, afetando um indivíduo em milhares ou milhões. Também conhecidas como doenças hereditárias, são transmitidas de geração em geração, em que genes defeituosos passam dos pais para os filhos, podendo gerar determinadas doenças ou distúrbios. Estudos apontam que a associação entre ancestralidade e a ocorrência de determinadas doenças genéticas existe e, dependendo do grupo ou região geográfica, pode haver um risco diferencial (PENA, 2005; HABBER et al., 2011).

### 3.6.1. Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPSs) englobam um grupo heterogêneo de doenças metabólicas hereditárias, com variadas incidências mundiais entre 1,9 a 4,5 para cada 100.000 recém-nascidos vivos (POORTHUIS et al., 1999; APPLGARTH et al., 2000; NELSON et al., 2003).

As MPS são doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pelo acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) dentro dos lisossomos, devido à deficiência de uma enzima lisossômica que atua na degradação desses GAGs. Assim, essas moléculas, não degradadas ou parcialmente degradadas, acumulam-se nas células, tecidos e órgãos, o que ocasiona um comprometimento na função celular e orgânica, levando as manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos. A doença vai evoluindo, sendo a expectativa média de vida dos pacientes com a forma mais grave, em torno da primeira e/ou segunda década (NEUFELD; MUENZER, 2001).

De acordo com Vieira (2007), as MPS fazem parte de 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. As MPS foram divididas em sete principais tipos (Tabela 1) dependendo da enzima que está deficiente e quanto ao substrato que se acumula (NEUFELD et al, 2001).

**Tabela 1** – Classificação das MPS

<b>Tipo de MPS</b>	<b>Nome</b>	<b>Locus cromossômico</b>	<b>Enzima Deficiente</b>	<b>GAGs na urina</b>
I	Hurler, Huler-Scheie, Scheie	4p16.3	$\alpha$ -L- iduronidase	Dermatan e Heparan Sulfato
II	Hunter	Xq28	Iduronate sulfatase	Dermatan e Heparan Sulfato
IIIA	Sanfilippo A	17q25.3	Heparan N-sulfatase	Heparan Sulfato
IIIB	Sanfilippo B	17q21	$\alpha$ -N-acetilglicosaminidase	Heparan Sulfato
IIIC	Sanfilippo C	Not Known	AcetilCoA: $\alpha$ -	Heparan Sulfato

			glicosaminaacetiltrans ferase	
IIID	Sanfilippo D	12q14	N-acetilglicosamina- 6-sulfatase	Heparan Sulfato
IVA	Morquio A	16q24.3	N-acetilglicosamina- 6-sulfatase	Queratan Sulfato
IVB	Morquio B	3p21.33	$\beta$ - galactosidase	Queratan Sulfato
VI	Maroteaux- Lamy	5q13-q14	N- acetilgalactosamina-4- sulfatase	Dermatan Sulfato
VII	Sly	7q21.11	$\beta$ -glicuronidase	Dermatan e Heparan Sulfato
IX	Natowicz	3p21.2-p21.3	Hialuronidase	Ácido Hialurônico

**Fonte:** Adaptado de NEUFELD; MUENZER, 2001

Embora ainda não haja cura para as MPSs, existem tratamentos, como, por exemplo, o de reposição enzimática, que retarda a progressão da doença, melhora as anormalidades sistêmicas e proporciona uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Porém, os únicos tipos de MPS que recebem Terapia de Reposição de Enzima (TRE), atualmente, são os tipos I, II, IV-A e VI (GUARANY et. al, 2015; RIBEIRO, 2013). Antes do advento de terapias dirigidas para a restauração da atividade da enzima deficiente, o tratamento tinha como principal foco a prevenção e o cuidado das complicações, aspecto ainda bastante importante no manejo desses pacientes (GIUGLIANI, R. et. al, 2010).

De acordo com Giugliani e colaboradores (2010), o desenvolvimento da TRE começou na década de 90, tornando-se uma realidade aprovada para uso clínico em 2003 para MPS I, em 2005 para MPS VI e em 2006 para MPS II, tendo, atualmente, também para a MPS IVA.

Outra possibilidade de tratamento para essa doença, conforme Pasqualim (2013) é o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), por meio do qual há a reconstituição do sistema hematopoiético do paciente com células tronco que produzem a enzima deficiente (sejam elas de medula óssea, cordão umbilical ou sangue periférico) de um doador saudável e compatível.

As MPSs podem ser facilmente detectadas por exames clínicos, quando em estágio avançado, e através de um profissional qualificado. Mas, sua identificação nos estágios



iniciais requer um conhecimento mais profundo da doença, bem como profissionais mais preparados. Diversos autores alegam a dificuldade de diagnóstico dessa doença, devido à falta de conhecimento dos profissionais da saúde a respeito das MPSs (TURRA et. al, 2009; VIEIRA, 2008).

### **3.6.2. MPS tipo III-C**

A síndrome de Sanfilippo é uma doença rara, que apresenta um distúrbio no metabolismo de mucopolissacarídeos, e corresponde às mucopolissacaridoses III-A, III-B, III-C e III-D. Por suas características genéticas, bioquímicas e clínicas, as mucopolissacaridoses constituem um grupo grande e heterogêneo dentro das doenças de depósito lisossômico. São causadas pela deficiência ou ausência de enzimas específicas, que são responsáveis por quebrar os glicosaminoglicanos (GAGs), em passos diferentes de sua rota de degradação (LEISTNER, GIUGLIANI, 1998).

Existem quatro tipos de deficiências enzimáticas que podem causar a síndrome de Sanfilippo, sendo a enzima deficiente a determinante do tipo de MPS III. Na mucopolissacaridose III-C, a enzima deficiente é chamada de acetil-CoA-alfa-glucosamina acetiltransferase (SGM – HCPA apud MPS Society - EUA).

O quadro clínico de mucopolissacaridose tipo III foi primeiramente descrito por Sanfilippo et al. (1963), logo, o nome dado a MPS III é uma homenagem a esse médico, por ter relatado os primeiros casos da doença em 1963. Dentre as mucopolissacaridoses, a síndrome de Sanfilippo é uma das mais frequentes, sendo que isso irá variar de região para região. Assim, em algumas regiões, a síndrome de Sanfilippo será um dos subtipos de MPS III mais raros (COLVILLE, et al, 1996).

A sua incidência, de acordo com Wiedemann (1992), está em torno de 1:30.000 nascimentos. Segundo Nelson (1997), a baixa incidência encontrada no Norte da Irlanda (1:2.800.000 casos) e em outros países é subestimada, pois, na mucopolissacaridose tipo III, as alterações físicas que acompanham a deficiência mental não são de grande intensidade e os testes de urina podem apresentar resultados negativos. Ou seja, muitos casos não chegam a ser diagnosticados e os indivíduos afetados são considerados deficientes mentais de causas inespecíficas.

Estudos recentes na Holanda e na Austrália apontaram que a incidência da síndrome de Sanfilippo (A, B, C e D) é de, aproximadamente, 1 a cada 70.000 nascimentos, sendo que o

tipo A é mais comum em populações do noroeste europeu, o tipo B, no sudoeste europeu, e os tipos C e D são raros em qualquer lugar (SGM – HCPA apud MPS Society - EUA).

Segundo Hamartz (2008), a incidência global da MPS III está estimada em 1,9 – 4,5: 100.000 nascimentos. Porém, a prevalência dessa síndrome 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).

O diagnóstico do tipo de MPS baseia-se nas suas manifestações clínicas e radiográficas. Entretanto, segundo Albano (2000), para o estabelecimento definitivo do diagnóstico e, também, a fim de classificar o tipo exato de MPS, exames bioquímicos são necessários para definir qual a enzima deficiente e o mucopolissacarídeo eliminado na urina. Afinal, o diagnóstico não é fácil, logo, a confirmação do mesmo deve ser baseada na investigação da deficiência enzimática.

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).

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

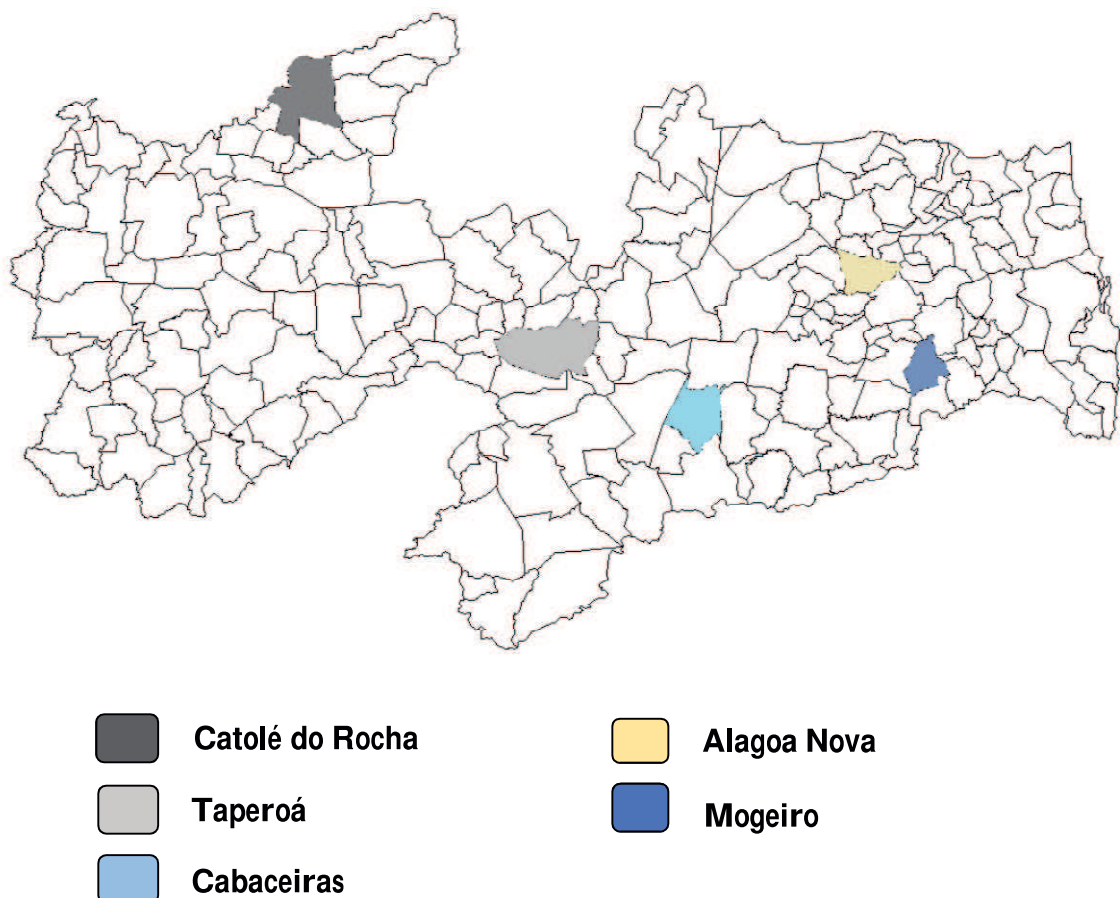
## 4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1. Local do estudo e amostragem

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

Foram analisados sete pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado para Mucopolissacaridose tipo III-C, acompanhados por profissionais especializados do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/ UFCG). Todos os pacientes são paraibanos oriundos das cidades de Mogeiro, Catolé do Rocha, Taperoá, Alagoa Nova e Cabaceiras (Figura 2). Os pacientes foram nomeados de M1 à M7, a fim de preservar suas identidades.

**Figura 2** – Mapa da Paraíba com destaque para as cidades natal dos pacientes com mucopolissacaridose tipo III-C



## 4.2. Obtenção do material genético

Todas as amostras para este estudo foram cedidas pela Dra. Paula Fransinette, do HUAC – UFCG.

## 4.3. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada a partir do sangue das amostras coletadas no HUAC. O procedimento foi realizado seguindo o protocolo do fabricante Wizard Genomic DNA Purification Kit<sup>1</sup> (PROMEGA, 2014).

## 4.4. Amplificação

Cada um dos marcadores moleculares utilizados para a detecção de polimorfismos dos AIMs (Sb19.3, PV92, APO4, AT3-I/D e CCR5) foram amplificados por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2** – AIMs utilizados no estudo

<b>Marcador</b>	<b>Sequência de oligonucleotídeos</b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>
Sb19.3 <sup>1</sup>	5' TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG 3' 5' AAGCACACAATTGGTTATTTCTGAC 3'	457pb e/ou 157pb
PV92 <sup>2</sup>	5' AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT 3' 5' TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG 3'	443pb e/ou 129pb
APO4 <sup>3</sup>	5' AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG 3' 5' AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA 3'	400pb e/ou 100pb
AT3-I/D <sup>4</sup>	5' CCACAGGTGTAACATTGTGT 3' 5' GAGATAGTGTGATCTGAGGC 3'	572pb e/ou 496pb
	5' ACCAGATCTCAAAAAGAA 3'	

<sup>1</sup> Disponível em: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)

CCR5 <sup>3</sup>	5' CATGATGGTGAAGATAAGCTTCA 3'	225pb ou 193pb
-------------------	-------------------------------	----------------

1: Parra et al., 1998; 2: Njoroge et al., 2010; 3: Batzer et al., 1996; 4: Oliveira, 2014; 5: Reiche et al., 2008.

As reações de amplificação totalizaram um volume de 12,5ul e foram realizadas utilizando o termociclador Veriti (*Applied Biosystems*). Todos os parâmetros utilizados para cada marcador molecular estão descritos no anexo B.

Para fins de análise, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para os AIMs: Sb19.3, PV92 e APO4, e com uma concentração de 12% para o CCR5 e AT3-I/D. As diferenças de concentração do gel dão-se devido ao fato de que os marcadores moleculares CCR5 e AT3-I/D apresentam poucos pares de base entre os seus fragmentos, apenas 32pb para o CCR5 e 76pb para o AT3-I/D, o que pode dificultar um pouco a observação, necessitando de adequações na metodologia empregada.

Para corrida do gel foi-se utilizada cuba vertical com tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089M; Ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) por aproximadamente 150 minutos, com voltagem de 120V e 36 miliAmperes. Posteriormente, para visualização do resultado obtido com o produto da PCR, realizou-se a coloração utilizando Nitrato de Prata, por ser mais sensível e eficiente, podendo detectar melhor as bandas presentes no gel.

#### 4.5. Análise dos dados

Os dados alélicos foram obtidos pela análise das bandas reveladas no gel de poliacrilamida, possibilitando a criação de uma matriz de dados, a qual foi submetida ao programa de bioinformática (*Structure*) utilizado nesta pesquisa, que possibilitou a obtenção das frequências alélicas.

Para análise dos dados, foi utilizado o programa *Structure* versão 2.3.1 (parâmetros:  $k=3$ ; 20.000 *burning* por 200.000 interações MCMC; *Admixture model*) e sua extensão online *Structure Harvester v.0.6<sup>2</sup>*, descrita por Earl et al. (2012), para análise das contribuições ancestrais dos indivíduos em estudo a partir dos marcadores informativos de ancestralidade.

<sup>2</sup> Disponível em: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise dos marcadores informativos de ancestralidade

A partir dos dados alélicos analisados para os marcadores Sb19.3, AT3-I/D, APO4, CCR5 e PV92, a variabilidade genética restringiu-se a três populações: africanas, ameríndias e europeias.

**Tabela 3** – Localização citogenética dos loci analisados e populações parentais com maior frequência do alelo\*1

Loci	Polimorfismo	Número do rs	Localização	População com maior frequência do Alelo*1	Fragmento gerado (pb)
Sb19.3	Inserção <i>Alu</i>	rs3138524	19p12	Europeu	457pb
PV92	Inserção <i>Alu</i>	rs3138523	16q23.3	Ameríndia	129pb
APO4	Inserção <i>Alu</i>	rs3138522	11q23.3	Europeu	400pb
AT3-I/D	7bpb <i>indel</i>	rs3138521	1q25.1	Africana	572pb
CCR5	Deleção	rs333	3p21.3	Europeu	193pb

AIM, tipo de polimorfismo analisado, localização cromossômica, rs (número de identificação SNP) respectivo na base de dados do NCBI e população onde o alelo\*1 é mais frequente. **Fonte:** Adaptado de MACHADO, 2008.

O número de amostras analisadas para cada marcador, os genótipos encontrados e suas frequências alélicas estão sumarizadas na tabela 4.

**Tabela 4** – Frequência alélica dos AIMs estudados

Marcador	Genótipo	n	Frequência alélica (%)
Sb19.3	0	0	0%
	1	1	19,8%
	2	6	80,2%
At3i.d	0	4	61,7%
	1	0	0%
	2	3	38,3%

	0	0	0%
APO4	1	5	71,5%
	2	2	28,5%
	0	5	71,9 %
PV92	1	0	0 %
	2	2	28,1%
	0	3	38,6%
CCR5	1	4	61,4%

Sb19.3; At3i.d; APO4; PV92: 0= homozigoto sem inserção; 1= homozigoto com inserção; 2= heterozigoto. CCR5: 0= homozigoto sem deleção; 1= homozigoto com deleção. **Fonte:** Autor – Dados retirados do *Software Structure*.

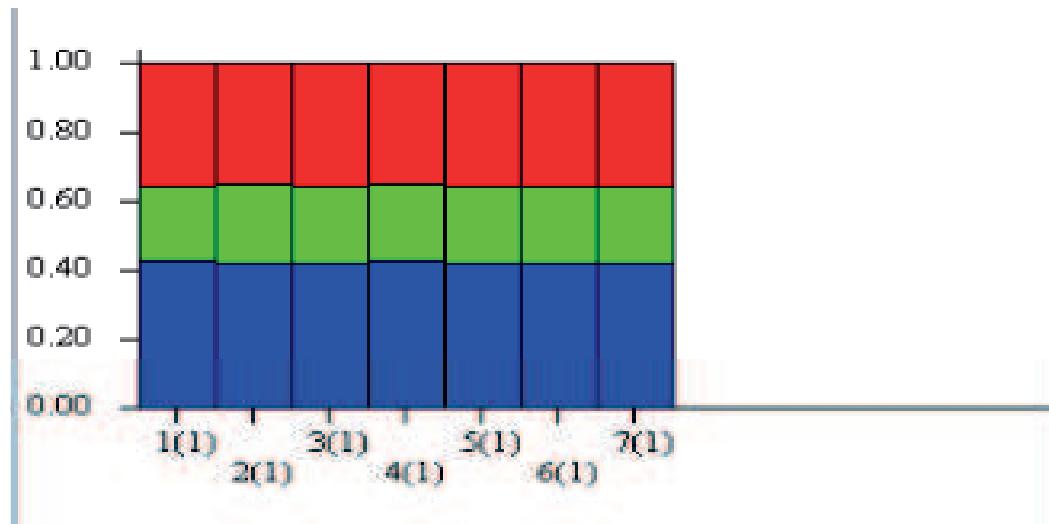
A contribuição europeia deteve um maior percentual sob as demais, demonstrando uma frequência de 42,8% entre os indivíduos, enquanto a africana 35,1% e ameríndia 22,1%. Na tabela 5, pode-se observar as contribuições individuais de cada paciente (M1 à M7), os quais apresentaram proporções semelhantes.

**Tabela 5** – Variabilidade genética individual das amostras estudadas.

Indivíduo	Contribuições individuais (%)		
	Africana	Ameríndia	Europeia
M1	35,1%	22%	42,9%
M2	35%	22,2%	42,8%
M3	35,2%	22,1%	42,8%
M4	35%	22,1%	42,8%
M5	35,2%	22%	42,7%
M6	35,1%	22,1%	42,8%
M7	35,1%	22,2%	42,8%

**Fonte:** Autor – Dados retirado do *Software Structure*.

No gráfico 3, pode-se observar a mistura interétnica dos indivíduos acometidos pela Síndrome de Sanfilippo, em que cada coluna corresponde a um indivíduo.



**Figura 3** – As cores vermelho, verde e azul correspondem a contribuições africanas, ameríndias e europeias, respectivamente. **Fonte:** Imagem retirada do software Structure.

As frequências alélicas dos marcadores utilizados foram obtidas a partir do software *Structure*. Na tabela 6, pode-se observar uma comparação entre as amostras avaliadas neste trabalho com a de populações mundiais.

**Tabela 6** – Comparação das frequências obtidas para os AIMs (PV92, AT3-I/D, APO4 e Sb19.3) com a de populações mundiais

Marcador	População	Populações mundiais	Frequência obtidas neste estudo
PV92*1	Ameríndia	90%	28,1%
AT3*1	Europeia	26%	38,3%
APO*1	Europeia	94%	100%
Sb19.3*1	Europeia	92,7%	100%



## 6. DISCUSSÃO

A miscigenação é um processo observado em muitas populações humanas e consiste no encontro de duas ou mais populações ancestrais, as quais, frequentemente, são geneticamente distintas (PATTERSON et al. 2010). Ao decorrer do processo, a nova população pode apresentar diferenças na proporção de mistura entre os grupos de indivíduos que a compõem (HOGGART et al. 2003).

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, em que cada indivíduo pode apresentar diferentes percentuais de contribuições ancestrais. Devido ao seu histórico de ocupação, as linhagens genealógicas que mais contribuíram para a formação da população brasileira foram as ameríndias, europeias e africanas.

As frequências alélicas dos marcadores utilizados, obtidas a partir do software *Structure*, permitiu uma análise comparativa entre as amostras avaliadas no presente estudo e populações mundiais. O alelo PV92\* 1, por exemplo, atinge frequências superiores a 90% em populações ameríndias (LUIZON et al. 2008), no entanto, a frequência do mesmo na amostra avaliada não passou de 28,1%.

O alelo AT3\* 1 apresentou frequência de 38,3 % na amostra, sensivelmente diferente dos grupos mundiais, sendo o valor mais próximo encontrado entre europeus (26%). Entretanto, a frequência do AT3 apresentou maior proximidade com os europeus do que com uma amostra de Salvador, a qual apresentou uma frequência de 55% para esse alelo, de acordo com Abe-Sandes et al. (2010). O alelo APO\* 1 manifestou-se em todos os pacientes (100%), ficando próxima a encontrada entre europeus (94%) e igual a frequência encontrada entre os ameríndios, também 100%. O alelo Sb19.3\* 1 apresentou frequência de 100% nos indivíduos estudados. Tal marcador, em populações mundiais, é mais frequente em europeus (92,7%), e é encontrado com uma frequência de 71% entre os ameríndios (FERREIRA, 2012).

Os dados do estudo em questão corroboram com o descrito por Callegari-Jaques (2003), visto que as maiores contribuições ancestrais da população em estudo foi a europeia, com 42,8%, seguida da africana, com 35,1% e, por último, a ameríndia, com 22,1%. Contudo, é importante ressaltar que o n amostral deste estudo é menor que o abordado por Callegari-Jaques (2003), cuja amostragem é a região nordeste.

Nos estudos desse autor com os marcadores autossômicos, como os microssatélites, as proporções obtidas na região nordeste são de 73% europeia, 17% africana e 10% ameríndia, com uma predominância de contribuição europeia. Em contrapartida, Alves Silva et al (2000)

afirma que, na região nordeste, as proporções da linhagem materna são de 44% africana, 34% Europeia e 22% ameríndia. Para a patrilinearidade, as proporções são de 96% europeia e apenas 4 % africana (CARVALHO-SILVA et al. 2001).

Com a formação de uma população miscigenada, espera-se que a frequência de qualquer *locus*, e, em especial, de *loci* AIMS, definidos como marcadores que apresentam frequências extremas e distintivas entre populações diferenciadas por fatores étnicos ou geográficos, atinja valor intermediário ao encontrado nas populações parentais (GONTIJO, 2008). No estudo em questão, as frequências alélicas do PV92 apresentaram alta discrepância em relação às populações mundiais, enquanto que o AT3, APO e Sb19.3 apresentaram valores próximos quando comparados às populações parentais.

Pode-se verificar que a variabilidade genética individual de cada paciente foi bastante semelhante, observada a uniformidade nas contribuições ancestrais. Essa similaridade nos resultados pode ser explicada pelo pequeno tamanho amostral, levando em conta que foram sete pacientes analisados, como também pelo parentesco existente.

## 7. CONCLUSÃO

O estudo realizado transcreve a aplicabilidade da análise via DNA autossômico para a determinação da ancestralidade desse grupo de pacientes, tornando-se extremamente relevante, devido ao número elevado de casos MPS IIIC encontrados no estado da Paraíba.

Os resultados obtidos reforçam os dados históricos, tendo como populações parentais os africanos, europeus e ameríndios. Comparando as composições étnicas individuais dos pacientes, pode-se observar uma uniformidade, ocasionada, provavelmente pelo parentesco, e a maior contribuição ancestral foi a europeia.

De acordo com os dados obtidos, pode-se inferir uma correlação entre o haplótipo causador da doença e a ancestralidade europeia, demonstrando a possibilidade da ocorrência de um efeito fundador para tal doença no estado da Paraíba.

## REFERÊNCIAS

- ABÉ-SANDES, K.; BOMFIM, T.F.; ABE-SANDES, C.; ACOSTA, A. X.; ALVES, C.R.B. Ancestralidade Genômica, Nível Socioeconômico e Vulnerabilidade ao HIV/AIDS na Bahia, Brasil. **Saúde Soc.** São Paulo, v. 19, supl. 2, p. 75-84, 2010.
- ALBANO, L.M.J.; SUGAYAMA, S.S.M.M.; BERTOLA, D.R.; ANDRADE, C.E.F.; UTAGAWA, C.Y.; PUPPI, F.; et. al. Clinical and laboratorial study of 19 cases of mucopolysaccharidoses. **Rev Hosp Clin Fac Med**, São Paulo; v. 55, n.6, 2000.
- 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.
- APPLEGARTH, D.A.; TONNE, J.R.; LOWRY, R.B. Incidence of inborn erros of metabolismo in British Columbia, 1969-1996. **Pediatrics.**, v. 105, n.1, p. 10-14, 2000.
- ARCOT, S.S.; SHAIKH, T.H.; KIM, J.; BENNET, L.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; NELSON, D.O.; DEININGER, P.L.; BATZER, M.A.; Sequence diversity and chromosomal distribution of young *Alu* repeats. **Gene**, V. 163, p. 273-278, 1995.
- AUSEEOL, J. et. al. Na acetylated 120kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC Wbroblasts; A candidate molecule for MPS IIIC. **Molecular Genetics and Metabolism.** V. 87, p. 22-31, 2006.
- BARROS, J.E.X.S. **Diversidade haplotípica de microssatélites do cromossomo Y humano na população de Pernambuco, Nordeste do Brasil**; UFPE: Recife, 2006.
- BASTOS-RODRIGUES,L.; PIMENTA, J.R.; PENA, S.D.J. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. Em: **Annals of human Genetics**, v. 70, p. 1-8, 2006.

BATZER M.A; DEININGER P.L.; HELLMANN-BLUMBERG, U.; JURKA, J.; LABUSA, D.; RUBIN, C.M.; SCHMID, C.W.; ZIETKIEWICZ, E.; ZUCKERKANDL, E. Standardized nomenclature of *Alu* repeats. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, n. 1, p. 3-6, 1996b.

BATZER M.A; DEININGER P.L. Repeats of Alu and Human Diversity of Genomic. **Genetics**, v. 3, 370-9, 2002.

BATZER, M.A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D.H.; SHAIKH, T.H.; NOVICK, G.E.; IOANNOU, P.A.; SCHEER, W.D.; HERRERA, R.J. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 12288-12294, 1994.

BEUTEN, J.; HALDER, I.; FOWLER, S.P.; GORING, H. H.H.; DUGGIRALA, R.; ARYA, R.; THOMPSON, I. M.; LEACH, R.J.; AND. LEHMAN, D.M. Wide Disparity in Genetic Admixture Among Mexican Americans from San Antonio, TX. **Ann Hum Genet**, v. 75, p. 529-38, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, SM; GRATTAPAGLIA, D; SALZANO, FM; SALAMONI, SP; CROSSETTI, SG;. FERREIRA, ME; HUTZ, MH. Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. **AMERICAN JOURNAL OF HUMAN BIOLOGY** 15:824–834.2003.

CARVALHO-SILVA DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Hum Genet** 68:281–286. 2001.

CASPERS, M.; PAVLORA, A.; DRIESEN, J.; HARBRECHT, U.; KLAMROTH, R.; KADAR, J.; FISCHER, R.; KEMKES-MATTHES, B.; OLDENBURG, J. Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S – Practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 108, n.2. p. 247-257, 2012.

COLVILLE, G.A.; WATTERS, J.P.; YULE, W.; BAX, M. Sleep problems in children with Sanfilippo syndrome. **Rev Med Child Neurol**, v. 38, n. 6, p. 538-44, 1996.

EARL, D.A.; vonHOLDT, B.M.; Structure Harvester: a website and program for visualizing Strucuture output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Reources*, v.4, p. 359-361, 2012.

FEDELE, A. Sanfilippo syndrome: causes, consequences, and treatments. **The Application of Clinical Genetics** . v.8, p. 269- 280, 2015.

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

FELDHAMMER, M; DURAND, S; MRAZOVA, L; et al. 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.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FLORES, C.N.; MACA-MEYER, J.A.; PÉREZ, A.M.; GONZÁLEZ, J.M.; LARRUGA, V.; CABRERA, M. A Predominant European Ancestry of Paternal Lineages from Canary Islanders. Em: **Annals of Human Genetics**, n.67, p. 138 – 152, 2003.

GALVANI, C.N.; SLATKIN, M. Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5 -  $\Delta$ 32 HIV- resistance allele. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, dezembro, 2003.

GATTÁS, G. J. F.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J.A.; SIRAQUE, M. S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M. A. V.; et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**, v. 37; n. 4; p. 451-8, 2004.

GIUGLIANI, R.; FEDERHEN, A.; ROJAS, M.V.M.; VIEIRA, T.A.; ARTIGALÁS, O.; PINTO, L.L.C. et. al. Terapia de Reposição Enzimática para as Mucopolissacaridoses I, II e VI: Recomendações de um Grupo de Especialistas Brasileiros. **Rev Assoc Med Bras**, v. 5, n. 3, p. 257-77, 2010.

GODOY, J.M.P.; SILVA, S.R.O.R.A.M.; NAGATO, L.; SOUZA, D.S. Prevalência da deficiência de antitrombina III na trombose venosa profunda. **Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascular**, n. 14, p. 103-106, 1998.

GONTIJO, C.C. **Composição genética de duas populações afro-derivadas brasileiras inferias a partir de marcadores informativos de ancestralidade**. UnB: Brasília, 2008.

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

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

HEY, J. On the number of new world founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. **PLoS Bioloy**, v.3, n.6, p. 965-975. Junho, 2005.

HOGGART, C.J.; PARRA, E.J.; SHRIVER, M.D.; BONILLA, C.; KITTLES, R. A.; CLAYTON, D. G.; MICKEIGUE, P. M. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. **Am J Hum Genet**, v. 72, p. 1492 – 1504, 2003.

KARATHANASIS SK, Zannis VI, Breslow JL. Characterization of the apolipoprotein A-IC-III gene complex. **Methods Enzymol**,128:712-26, 1986.

LEISTNER, S.; GIUGLIANI, R. A useful routine for biochemical detection and diagnosis of mucopolysaccharidoses. **Genet Mol Biol**, v. 21, n. 1, 1998.

LIMA, J. Trombofilias e gravidez. **Boletim da SPHM**, v. 21, n.3, setembro, 2006.

LOPES, S.S.S. **Estudos filogeográficos com uso de marcadores moleculares localizados em uma região de baixa taxa de recombinação do cromossomo X humano**. UFMG: Belo Horizonte, 2007.

LUIZON, M.R.; MENDES, J.C.T.; OLIVEIRA, S.F.D.E.; SIMÕES, A. L. Ancestry Informative Markers in Amerindians from Brazilian Amazon. **Am J Hum Biol**, v. 20, p. 86-90, 2008.

LUIZON, M.R. **Polimorfismos de DNA população-específicos em indígenas da Amazônia Brasileira**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP. Ribeirão Preto – SP, 2003.

MACÊDO, A.K.V. **Determinação do polimorfismo de  $\Delta$ ccr5 e comparação com a distribuição de frequências encontradas em indivíduos infectados pelo HIV-1 na população de Pernambuco**. UFPE: Recife, 2003.

MACHADO, T.M.B. **Ancestralidade em Salvador – BA**. FIOCRUZ: Salvador, 2008.

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

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a.

MPS III – Síndrome de Sanfilippo. **SGM – Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA)**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/redempsbrasil/sobre/CartilhaMPSIII.pdf>>. Acessado em: 12 de janeiro de 2017.

NEEL, J.V; WEISS, K.M. The genetic structure of tribal population, the Yanomama Indians. XII. Biodemographic studies. **Am Phys Anthropol** 42 (1): 25-51. 1975.

NELSON, J. CROWHURST, J.; CAREY, B.; GREED, L. Incidence of the mucopolysaccharidosis in Western Australia. **Am J Med Genet.**, v. 123A, n.3, p. 310-3, 2003.

NELSON J. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. **Hum Genet**, v. 101, n.3, p. 355-8,1997.

NEUFELD, E.F.; MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLUE, D., editors. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. New York: MacGraw-Hill, p. 3421-52, 2001.



NJOROGE, S.K.; WITEK, M.A.; HUPERT, M.L.; SOPER, S.A. Microchip electrophoresis of Alu elements for gender determination and inference of human ethnic origin. **Electrophoresis**, v.31, p. 981-990, 2010.

NOVICK, G.E.; NOVICK, C.C.; YUNIS, J.; YUNIS, E.; MARTINEZ, K.; DUNCAN, C.G.; TROUP, G.M.; DEININGER, P.L.; STONEKING, M.; BATZER, M.A.; HERRERA, R.J. Polymorphic human-specific Alu insertions as markers for human identification. **Electrophoresis** 16: 1596-601. 1995.

OLIVEIRA, P.C. **Ancestralidade genética e genes de susceptibilidade em portadores de câncer de próstata do Estado da Bahia**. FIOCRUZ: Bahia, 2014.

PARRA, E.J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M.A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; ALLISON, D.B.; DEKA, R.; FERRELL, R.E.; SHRIVER, M.D.; Estimation african american admixture proportions by use of population-specific alleles. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, p. 1839-1851, 1998.

PASQUALIM, Gabriela. **Efeitos da terapia de reposição enzimática com início tardio no modelo murino de mucopolissacaridose do tipo I**. Porto Alegre: Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular- UFRGS), 2013.

PATTERSON, N; PETERSEN, D.C.; ROSS, R.E.; SUDOYO, H.; GLASHOFF, R. H.; MARZUKI, S.; REICH, D.; HAYES, V.M. Genetic structure of a unique admixed population: implications for medical research. **Hum Mol Genet**, v. 19, n.3, 2010.

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, nº 159, p. 16 – 25, 2000.

POORTHIUS, B.J.; WEVERS, R.A.; KLEIJER, W.J, GROENER, J.E.; JONG, J.G., et al. The frequency of lysosomal storage in the Netherlands. **Hum Genet**, v. 105, n. 1-2, p. 151-, 1999.

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

datain different populations. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 33. p. 387-396, 2010.

PSHEZHETSKY, A. Crosstalk between 2 organelles: Lysosomal storage os heparina sulfate causes mitochondrial defects and neuronal death in mucopolysaccharidosis III type C. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. V.3, n.1, p. 10449793-1049793-7, 2015.

RAY, D.A.; WALKER, J.A.; HALL, A.; LLEWELLYN, B.; BALLANTYNE, J.; CHRISTIAN, A.T.; TURTELTaub, K.; et al. Inference of human geographic origins using Alu insertion polymorphisms. **Forensic Science International**, v. 153, p. 117 – 24, 2005.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. Em: **Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – Embrapa**, São Paulo. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/PPPSE2010/18627/1/PROCILCAR2009.00079.pdf>. Acessado em: 14/01/2017.

REICHE, E.M.V.; WATANABE, M.A.E.; BONAMETTI, A.M.; MORIMOTO, H.K.; MORIMOTO, A.A.; WIECHMANN, S.L.; MATSUO, T.; OLIVEIRA, J.C.; REICHE, F.V. Frequence of CCR5 -  $\Delta$ 32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy boold donos, HIV-I-exposed seronegative and HIV-1-seroposite individuals of Southern Brazilian population. **International Journal of Molecular Medicine**, v.22, p. 669-675, 2008.

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil**. São Paulo: Companhia das Letras. P 47, 1995.

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

SEILSTAD, M.; BEKELE, E.; IBRAHUM, M.; TOURÉ, A.; TRAORÉ, M. A view of modern human origins from Y chromosome microsatellite variation. **Genome Research**, v. 9, p. 558-567. Julho, 1999.

SENE, G.M. Caminhos pré-colombianos. **Revista de História**. Disponível em: <<http://revistadehistoria.com.br/secao/artigos/caminhos-pre-colombianos>>. Acessado em: 11/01/2017.

SHRIVER, M.D.; PARRA, E.J.; DIOS, S.; BONILLA, C.; NORTON, H.; JOVEL, C.; PFAFF, C.; et al. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Hum Genet**, v. 112, n. 4, p. 387 – 99, 2003.

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

WEBER, J.L.; DAVID, D.; HEIL, J.; FAN, Y.; ZHAO, C.; MARTH, G.; Human Diallelic Insertion/ Deletion Polymorphisms. **Am J Hum Genet**. V. 71, p. 854-862, 2002.

WIEDEMANN, H.R.; KUNZE, J.; DIBBERN, H. **Atlas de síndromes clínicas dismórficas**. Trad. de Hildegard Thiemann Backup. 3a ed. São Paulo: Manole; p.118-27, 1992.

VIEIRA, T. **A História Natural das Mucopolissacaridoses: Uma Investigação da Trajetória dos Pacientes desde o Nascimento até o Diagnóstico**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, 2007.

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

ZEMBRZUSKI, V.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; HUTZ, M.H. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. **Ann Hum Genet**, v. 70, p. 822-8, 2006.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A – concentrações adotadas para as reações de PCR

**PV92:** desnaturação inicial a 94° C por 5 min; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94° C por 40s, anelamento a 55°C por 50s, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 7 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 0,2mM de dNTPs; 0,25µM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.

**Sb19.3:** desnaturação inicial a 94° C por 5 min; seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 94° C por 30s, anelamento a 60°C por 30s, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 5 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 2,76 mM de dNTPs; 0,84mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.

**APO4:** desnaturação inicial a 94° C por 5 min; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 50°C por 2 min, e alongação a 72°C por 2 min; com extensão final a 72°C por 5 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 0,2 mM de dNTPs; 375 n g de cada iniciador; 2,5 U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.

**AT3-I/D:** desnaturação inicial a 94° C por 6 min; seguida por 1 ciclo a 54°C por 2 min e mais 35 ciclos de: desnaturação a 72° C por 1 min, anelamento a 94°C por 30s, e alongação a 54°C por 1 min; com extensão final a 72°C por 10 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 200 mM de dNTPs; 0,25 mM de cada iniciador; 1U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.

**CCR5:** desnaturação inicial a 94° C por 5 min; seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 94° C por 1 min, anelamento a 58°C por 1 min, e alongação a 72°C por 1 min; com extensão final a

72°C por 10 min. Foi utilizado: 1,5x de tampão (Sinapse); 1,25  $\mu$ M de dNTPs; 2,5  $\mu$ M de cada iniciador; 2,5 U de Taq DNA Polimerase e 20-50 n g de DNA genômico.