



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

ÁLISSON EMANNUEL FRANCO ALVES

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I
COM MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIM) NA
PARAÍBA**

**CAMPINA GRANDE
2017**

ÁLISSON EMANNUEL FRANCO ALVES

**ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I
COM DE MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIM) NA
PARAÍBA**

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

Área de concentração: Genética Humana e Médica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. 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.

A474a Alves, Álisson Emmanuel Franco.
Ancestralidade de pacientes com Mucopolissacaridose tipo I com Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) na Paraíba [manuscrito] / Álisson Emmanuel Franco Alves. - 2017.
46 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. Síndrome de Hurler-Scheie. 2. Ancestralidade autossômica. 3. Grupos étnicos. 4. Variabilidade genética. I.
Título.

21. ed. CDD 576.54

ÁLISSON EMANNUEL FRANCO ALVES

ANCESTRALIDADE DE PACIENTES COM MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I COM
MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIM) NA PARAIBA

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

Área de concentração: Genética Humana e Médica.



Ao meu pai e minha mãe a quem devo todo meu respeito e admiração, também por serem patrocinadores de meus sonhos, dedico. À minha irmã, Emannelly, que está olhando por nós, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

As batalhas que ocorrem no decorrer de nossas vidas dependem, além de nossa força de vontade, das pessoas que estão ao nosso lado; nenhuma batalha é vencida sozinha. No perpassar desta luta, muitas pessoas passaram por minha vida e cada uma delas foi majestosamente importante por ter me estimulado e me auxiliado a correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais, Ana e Nequinho, por serem os principais colaboradores do meu sucesso, não apenas neste momento, mas em todos os momentos, difíceis ou não, fornecendo suporte emocional, compreensão e inspiração ao longo de minha carreira pessoal e profissional.

À minha mãe, meu maior exemplo profissional, meu espelho, educadora excepcional que não apenas transmite os seus conhecimentos, mas os media construindo e produzindo conhecimento com o seu jeito pisciano de ser, cheia de compaixão e um ser amável, pensando sempre nos demais.

Ao meu pai, meu espelho, educador excepcional que me ensinou valores essenciais para ser uma pessoa íntegra, a ser um homem de força, de coragem e dignidade para enfrentar a vida. Ambos, meu pai e minha mãe, me deixaram livre para seguir minhas escolhas, porém sempre me instruindo pelo caminho correto. Eu amo vocês dois!

A Deus, por me permitir tecer todas as minhas escolhas autonomamente, as certas e as erradas, porém, sempre com amigos e familiares me apoiando. Ainda, por ele ser autor de um dos mais importantes capítulos da nossa história: a vida.

À minha orientadora Simone Lopes por ter percebido meu potencial acadêmico e ter confiado a mim seus trabalhos, por ter sido a enzima catalisadora deste processo anabólico que é a construção de uma carreira acadêmica plena e honesta. Por ser uma mãe e nos acolher, nos aconselhar, além de uma educadora maravilhosa com metodologias e sonhos para um futuro melhor.

À toda minha família: meus primos, avós e avôs, as minhas tias e tios, madrinhas e padrinhos, por, direta ou indiretamente, fazer parte deste processo de formação profissional e pessoal, também pela compreensão por minha ausência nos jantares de domingo.

A minha irmã (*in memoriam*), embora fisicamente ausente, sentia sua presença ao meu lado, dando-me força. Ao meu irmão que por algumas vezes cozinhou para que eu pudesse estudar (hehehe), pelas conversas e confissões, por todos os momentos que compartilhamos juntos.

À minha família Australiana que participou de um dos melhores momentos acadêmicos e pessoal da minha vida, apoiando-me nos momentos difíceis daquela jornada. O período de 2013/2015 foi um período de muitas realizações e descobertas, amigos que eu jamais saberia que poderiam fazer moradia dentro do meu coração. Agradeço por todos os momentos que passamos juntos e aos que vamos passar. Em especial àqueles que de certa forma foram mais próximos: Dariany, Jade, Mariana, Vanessa, Lucas, Rebeca, Nay, Bruna, Valdeir, Matthew, Daniel Clarke e Daniel Casei, Rowarne, Joseph, Marcos, Nathan, Kauê, Marcelo, Gabriel.

Meus amigos, aos que estiveram comigo antes e durante o curso de Ciências Biológicas, ao pessoal do lab LGBM, esta família que formei na UEPB, admiro e tenho orgulho de tê-los conhecido: Cássia e Mikael, Jomárcio, João Victor, Mikaela Clotilde, Mayara JF, Mayla Dantas, Eliene França, Micaela, Rhaisa Farias, Rayssa Melo, Yorran, Isabela Almeida, Jéssica Ferreira, Jessica Florêncio, Franciele Ferreira, Samuel Ferreira, Mara Vieira, Anne Caroline, Sthefany, Gabriel Lincoln.

Em especial a Mayara JF, que por muitas vezes esteve ao meu lado. Quando tínhamos que esperar infinitos ciclos de PCR por horas, ou esperar a corrida do gel aquele momento nunca era sem graça, pois sua presença alegre sempre em qualquer lugar que esteja. Só tenho a agradecer pela sua amizade, que sejamos amigos por toda eternidade. Te amo amiga!; e a Gabriel Lincoln por estar sempre presente.

Aos funcionários da UEPB, Edilma e dona Mari, Dona Bernadete, às técnicas mais fabulosas que tive o prazer imenso de conhecer: Táfnis, Patrícia, Elaine, Andeilma, Silvana. Ao professor Carlos por ter cedido por tantas vezes o seu laboratório para que pudéssemos concluir nossas pesquisas, a Dr^a Paula por nos ter cedido às amostras, a todos pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

A CAPES e a UEPB pelas bolsas concedidas para meu aperfeiçoamento acadêmico agradeço.

“Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de ser feliz.”

Almir Sater

RESUMO

A formação da população brasileira se deu a partir de três grupos populacionais fundadores: os ameríndios, europeus e africanos, e é uma das populações mais heterogêneas do mundo. A população brasileira é resultado de uma miscigenação que teve início com a invasão da colônia portuguesa, mais tarde, abrindo portas para a imigração de outros grupos étnicos, como os europeus e africanos. A partir de estudos moleculares é possível prever a disposição de genes dentro e entre as populações. Alguns migrantes carregavam alelos para doenças raras como a mucopolissacaridose (MPS). Estudos genéticos da população brasileira através de marcadores moleculares de DNA permitem que se faça um retrato molecular das populações ancestrais e das contribuições que os colonizadores deixaram no DNA dos brasileiros. A MPS tipo I é uma doença autossômica recessiva rara, crônica e progressiva, causada pela deficiência de uma enzima denominada α -L-iduronidase, responsável pela degradação de dois tipos de glicosaminoglicanos: sulfato de dermatano e heparan sulfato. A fim de conhecer características genóticas das populações a biologia molecular faz uso de marcadores moleculares. Nesta pesquisa foram utilizados Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs): PV92, APO4, Sb19.3, AT3i/d e CCR5; com o objetivo de realizar a análise de ancestralidade dos pacientes com mucopolissacaridose tipo I na Paraíba. Seis amostras de pacientes com MPS tipo I foram analisadas com os marcadores AIMs e as frequências alélicas encontradas foram analisadas no programa *Structure*. Os resultados obtidos revelaram uma contribuição maior europeia com uma contribuição de 41,6%, sendo 30,7% de contribuição Africana e 27,7% Ameríndia. Os pacientes com MPS tipo I da Paraíba apresentam uma maior frequência europeia, seguida por uma frequência Africana e Ameríndia, respectivamente.

Palavras-Chave: Síndrome de Hurler-Scheie, ancestralidade autossômica, grupos étnicos, variabilidade genética.

ABSTRACT

The formation of the Brazilian population was based on three founding population groups: Amerindians, Europeans and Africans, and is one of the most heterogeneous populations in the world. The Brazilian population is the result of a miscegenation that began with an invasion of the Portuguese colony, later opening doors for an immigration of other ethnic groups, such as Europeans and Africans. From molecular studies it is possible to predict an array of genes within and among populations. Some migrants loaded alleles for rare diseases such as mucopolysaccharidosis (MPS). Genetic studies of the Brazilian population by molecular markers of DNA that make a molecular picture of the ancestral populations and the contributions that the colonizers left no DNA of the Brazilians. Type I MPS is a rare, chronic and progressive recessive autosomal disease caused by the deficiency of an enzyme called α -L-iduronidase, responsible for the degradation of two types of glycosaminoglycans: dermatan sulfate and heparan sulfate. In order to know genotypic characteristics of populations molecular biology makes use of molecular markers. In this research, Ancestral Informative Markers (AIMs) were used: PV92, APO4, Sb19.3, AT3I/D and CCR5; with the objective of performing an ancestry analysis of patients with type I mucopolysaccharidosis in Paraíba. Six samples of patients with type I MPS were analyzed with the AIM markers and the allelic frequencies found were analyzed in the program Structure. The results showed a greater contribution from Europe with a contribution of 41.6%, with 30.7% of the African contribution and 27.7% of the Amerindian. The patients with type I MPS of Paraíba present a greater European frequency, followed by an African and Amerindian frequency, respectively.

Key-words: Hurler-Schei syndrome, autosomal ancestry, ethnic groups, genetic variability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Dispersão humana através dos continentes	17
Figura 2 – Mecanismos envolvidos na patogênese das Mucopolissacaridoses.....	24
Figura 3 – Mapa situando a localização das cidades de origem dos pacientes com MPS I no estado na Paraíba	28
Figura 4 – Contribuição ancestral individuais dos pacientes com MPS tipo I.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação das Mucopolissacaridoses	25
Tabela 2	– Marcadores moleculares utilizados neste estudo	29
Tabela 3	– Frequência dos alelos observados para os AIMS.....	31
Tabela 4	– Variabilidade individual dos pacientes deste estudo	31
Tabela 5	– Frequência do alelo *1 para cada <i>locus</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AIMs	<i>Ancestry Informative Markers</i> (Marcadores Informativos de Ancestralidade)
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
GAG	Glicosaminoglicanos
HUAC	Hospital Universitário Alcides Carneiro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
MCMC	<i>Makarov Chain Mont Carlo</i> (Cadeia Makarov e Monte Carlo)
MPSs	Mucopolissacaridoses
MPS I	Mucopolissacaridose tipo I
LGBM	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeira Polimerase)
rs	Reference SNP
SINEs	<i>Short Intersperced Nuclear Elements</i> (Elementos Nucleares Intercalados Curtos)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
TBE	Tris-Borato-EDTA
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1.	Objetivos Gerais	15
2.1.1.	Objetivos Específicos.....	15
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1.	Povoamento das Américas.....	16
3.1.1.	Formação do povo brasileiro.....	17
3.1.2.	História da Paraíba.....	18
3.2.	Ancestralidade.....	19
3.3.	Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs).....	20
3.3.1	AT3I/D – Inserção/Deleção.....	21
3.3.2.	Inserções <i>A/u</i> (PV92, APO4, Sb19.3).....	22
3.3.3	CCR5 Δ 32.....	23
3.4.	Mucopolissacaridoses	23
3.4.1.	Mucopolissacaridose tipo I.....	26
4.	METODOLOGIA.....	28
4.1.	Local de Estudo e amostragem	28
4.2.	Extração de DNA.....	28
4.3.	Genotipagem das amostras.....	29
4.4.	Eletroforese em gel.....	29
4.5.	Análise dos resultados.....	30
5.	RESULTADOS.....	30
5.1.	Análise dos marcadores informativos de Ancestralidade.....	30
6.	DISCUSSÃO.....	32
7.	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
	APENDICE A.....	44

1. INTRODUÇÃO

A população brasileira é uma das mais miscigenadas do mundo, sua composição genética e contribuição ancestral é dada a partir de três grupos populacionais fundadores desde a colonização: Africanos, Ameríndios e Europeus (DANIEL *et al.*, 2008). Esse processo de miscigenação teve início com a chegada dos colonizadores europeus (portugueses) e os negros africanos (mão de obra escrava), em um continente povoado por aproximadamente 2,5 milhões de nativos americanos (IBGE, 2017b).

Estudos genéticos da população brasileira através de marcadores moleculares de DNA permitem que se faça um retrato molecular das populações ancestrais e das contribuições que os colonizadores deixaram no DNA dos brasileiros (SANTOS, *et al.*, 2006). A heterogeneidade da população brasileira é formada pela mistura desses três grupos populacionais fundadores, entende-la favorece a compreensão de diversas doenças e suas implicações, contribuindo para a genética clínica, genômica e na a prescrição de medicamentos personalizados (PENA *et al.*, 2011). Os conhecimentos genéticos atuais contribuem significativamente para o estudo da evolução do homem moderno, e busca reconstruir a história evolutiva a partir do DNA (LEITE, 2012). Para isto, marcadores moleculares vêm sendo utilizados para análises da estrutura populacional de diferentes regiões sendo os mesmos ferramentas eficientes para a reconstrução da origem das populações atuais existentes (CROACH *et al.*, 2006).

As mucopolissacaridoses (MPSs) são doenças de depósito lisossômico que se caracterizam pelo acúmulo intralisossômico de glicosaminoglicanos (GAGs). O acúmulo anormal compromete a função celular e orgânica, ocasionando inúmeras manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos (WRAITH, 1995). A classificação das MPSs se baseia na deficiência de uma enzima específica para um determinado metabólito, podendo apresentar fenótipos distintos ou não para cada tipo de MPS (VIEIRA *et al.*, 2008).

A MPS tipo I é ocasionada por uma deficiência na enzima α -L-Iduronidase e sua deficiência leva a não metabolização dos GAGs heparan e dermatano sulfato, levando o paciente a um atraso no desenvolvimento e a perda de habilidades adquiridas. No Brasil a incidência para MPS I é de 1 para cada 106.000 recém nascidos (Rede MPS Brasil, 2017). Esta Rede em parceria com outros diversos centros brasileiros auxilia no atendimento e no diagnóstico de pacientes com os diversos tipos de MPS. Até 2015 foram diagnosticados no país 1152 pacientes com MPSs no Brasil, sendo 225 com MPS tipo I (GIUGLIANI *et al.*, 2017). Logo, o presente trabalho objetiva identificar a ancestralidade total autossômica de

pacientes com MPS tipo I no estado da Paraíba, devido a uma alta frequência no país, segundo Giugliani *et al* (2017) de 31%, para verificar se há uma correlação entre a doença e a ancestralidade dos pacientes, podendo facilitar o aconselhamento genético.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar a análise de ancestralidade dos pacientes com mucopolissacaridose tipo I da Paraíba acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) em Campina Grande, com os marcadores informativos de ancestralidade (AIM) (APO4, AT3id, Sb19.3, CCR5 e PV92).

2.2. Objetivos específicos

- Identificar as frequências alélicas dos marcadores utilizados (PV92, APO4, Sb19.2, AT3I/D, CCR5);
- Estimar a contribuição ancestral a partir dos marcadores utilizados nas populações ancestrais: africanas, ameríndias e europeias;
- Comparar as frequências obtidas com as de outras populações mundiais;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Povoamento das Américas

Para um estudo de identificação da estrutura populacional humana, um bom começo é partir de uma perspectiva evolucionária que considera as evidências genéticas, a origem do homem moderno, *Homo sapiens sapiens* é datada de cerca de 150 mil anos, na África; devido ao fato de que na África encontra-se maior diversidade genética do que em qualquer outro continente (PENA, 2005). A partir do processo de migração que é uma das principais razões da variabilidade genética (MACHADO, 2012).

Um conjunto de evidências reunidas pelos pesquisadores Greenberg (linguista), Turner (bioantropólogo dental) e Zegura (bioantropólogo geneticista) na década de 1980, levou a proposição de que os primeiros nativos americanos chegaram as Américas através de três grandes migrações (SILVA E CARVALHO, 2006), no qual se dispersaram ocupando e habitando os novos espaços (TARAZONA-SANTOS, 2002). Segundo os autores Silva e Carvalho (2006), os imigrantes seriam caçadores especializados, que cruzaram o estreito de Bering no final do pleistoceno (Figura 1). De acordo com esta hipótese, na primeira migração teriam vindo os chamados Paleoíndios, que ocuparam parte da América do Norte e toda América Central e do Sul. Na segunda onda migratória vieram os chamados Na-Dene e ocuparam Alasca, Canadá e regiões no sudeste dos Estados Unidos e do norte do México. A última imigração trouxe os Esquimo-Aleutas, que formaram os grupos esquimós e os habitantes das ilhas. Através de estudos do sequenciamento de DNA de nativos americanos pode-se inferir que a maioria dos nativos americanos são descendentes da primeira migração, ainda assim, as outras duas migrações tiveram importantes contribuições genéticas (WAUGH, 2012).

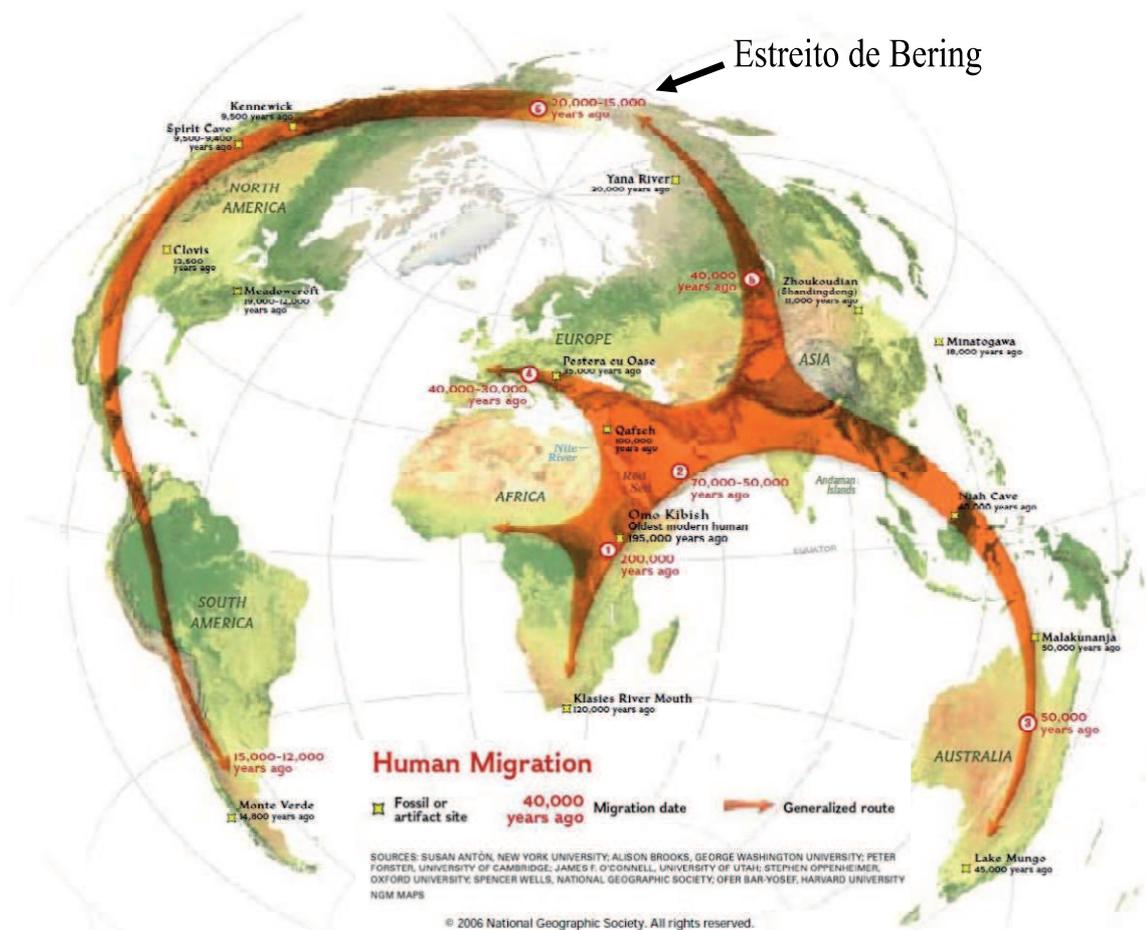


Figura 1. Dispersão humana através dos continentes. Fonte: Disponível em: <<http://unbamericaindigena.blogspot.com.br/2011/09/mapas-de-povoamento-das-americas.html>>. Acesso em: 30 de março de 2017 (NatGeo, 2006 mod).

3.1.1. Formação do povo brasileiro

A população ameríndia encontrada no território brasileiro foi estimada em 1 a 10 milhões de indivíduos nativos americanos durante o período da chegada dos portugueses (FUNAI, 2017). Após a instalação e o início da exploração dos recursos no Brasil, em 1630 os Holandeses tomaram Olinda e iniciaram um longo período de domínio em boa parte do território atual do Nordeste (IBGE, 2017b).

Devido à hostilidade no modo como as terras brasileiras foram tomadas e a luta pela defesa de suas terras, a população indígena teve uma redução drástica (FUNAI, 2017), devido a isto, houve a necessidade de mão de obra escrava, havendo um aumento na população Africana no Brasil (CORRÊA, 2010), no entanto, durante o século 19 e 20 houve uma constante imigração Portuguesa para o Brasil, cerca de quatro milhões de Africanos foram trazidos para cá, principalmente do centro-oeste da África e cerca de 3,9 milhões de Europeus (não Portugueses) (CALLEGARI-JACQUES *et al.*, 2003).

Embora não haja registros exatos dos primeiros escravos negros que chegaram ao Brasil, acredita-se que em 1538, Jorge Lopes Bixorda, traficou para a Bahia os primeiros escravos africanos, sendo a escravidão implantada no século XVII e intensificada nos anos de 1700 e 1822 (IBGE, 2017b). Dados históricos remetem que 40% (cerca de 10 milhões de indivíduos) dos escravos trazidos para a América vieram para o Brasil (SALZANO e FREIRE-MAIA, 1967). Freyre em seu livro *Casa grande & senzala*, publicado em 1933, considerou que ao negro foram atribuídos serviços domésticos e ao Português, gerar descendentes a partir uma colonização híbrida.

Em 1808 com a chegada da família real portuguesa ao Brasil houve um aumento significativo na população e, logo após, em 1824, houve a imigração dos colonos alemães para o sul do Brasil; 1870 a imigração italiana, e só em 1888 houve a abolição da escravatura, aumentando assim o incentivo à imigração para o país de outras populações do mundo: espanhóis e japoneses, por exemplo; estima-se que no período de 1820 a 1975 mais de 5,5 milhões de imigrantes, maioria de origem europeia, chegaram ao Brasil (IBGE, 2017b). Com a vinda desses povos para o Brasil, formou-se a população brasileira atual, caracterizada por uma diversidade genética e uma miscigenação elevada (CALLEGARI-JACQUES e SALAZANO, 1999).

3.1.2. História da Paraíba.

O estado da Paraíba é dividido em 223 municípios dos quais estão subdivididos em uma área de 56.468,427 km² até o ano de 2015, teve sua população estimada em 2016 de 3.999,415 pessoas (IBGE, 2017a). Segundo dados do censo do IBGE (2010), maior parte da população paraibana se autodeclara parda (52,7%), com 39,8% se autodeclaram Branca, negra (5,7%) e indígena (1,8%).

Antes da ocupação do território paraibano por Portugueses, a Paraíba era ocupada por nativos americanos, índios, pertencentes aos grupos linguísticos dos Tupis e dos Cariris. Ao primeiro grupo pertenciam os grupos Tabajara e Potiguara. Os Cariris se dividiam em quatro grandes tribos: os Paiacu, Sucuru, Ariá e os Icó (CLEROT, 1965).

Após descobrir as riquezas do Brasil, Portugal dividiu sua colônia em 15 capitânicas, para 12 donatários. Houveram cinco expedições para a conquista da Paraíba, tendo sua cessação com a aliança de um português e um chefe indígena. A partir daí iniciou-se o surgimento de vilas como, por exemplo, Pilar e Campina Grande (GOVERNO DA PARAÍBA, 2017).

Com a morte do Rei de Portugal, D. Sebastião e seu sucessor, seu tio, D. Henrique, o Rei da Espanha, D. Felipe II, conseguiu em 1580 o trono Português. Isto prejudicou os planos Holandeses que estavam travando uma batalha pela sua liberdade contra os espanhóis, sendo assim, o governo e companhias privadas holandesas formam a Companhia das Índias Ocidentais, para invadir as colônias. Então, sucessivas tentativas de invasão holandesa foram feitas, a maioria fracassada, entre elas em Salvador, Rio Grande do Norte e na Paraíba. Só mais tarde em 1634, os holandeses tiveram algum sucesso, durante o domínio holandês, por muito tempo, não houve mistura étnica (GOVERNO DA PARAÍBA, 2017).

3.2. Ancestralidade

A espécie humana possui uma origem ancestral, o que implica dizer que estamos todos relacionados de algum modo, em diferentes graus de parentesco (CHACRAVATI *et al.*, 2009), por isso é importante ser claro sobre qual estrutura referencial está sendo usado nas discussões sobre ancestralidade; devido da recombinação, cada segmento do genoma tem sua própria história ancestral, e vários segmentos do genoma de um indivíduo podem ter histórias ancestrais que traçam as diferentes populações (ROYAL *et al.*, 2010).

A ancestralidade pode estar associada à biogeografia, na qual a origem de uma pessoa está associada à localização geográfica de presumíveis antepassados, inferida em comparação com as populações contemporâneas que vivem nesses locais (SHRIVER, 2003). Há também estudos de linhagens ancestrais e do DNA autossômico (*family history*), o primeiro representa linhagens paternas ou maternas dos indivíduos e o último identifica toda sua linhagem ancestral autossômica. A variação autossômica pode ser estimada por abordagens de sequenciamento de todo o genoma, com painéis genotípicos, ou através de uma avaliação de AIMs (CLARK *et al.*, 2005)

A utilização de marcadores genéticos permite fazer comparativos de dados semelhantes na literatura e fazer inferências sobre relações entre populações. A estimativa da ancestralidade tem o potencial de mostrar padrões de migração humana passada e fornecer informações básicas sobre a variação genética humana que é essencial para distinguir populações miscigenadas (AKEY *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2009), também usadas para associações com doenças (REICH *et al.*, 2005) e admite propiciar parâmetros e auspiciar a disposição dos genes dentro e entre populações (CAVALLI-SFORZA, 1998).

3.3. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)

Segundo Morais (2013), diversas mutações ocorreram ao longo da evolução da espécie humana, gerando variações que podem constituir os haplótipos e, na maioria dos casos, servindo como marcadores de linhagem por serem específicas a determinado grupo populacional de uma área definida. Haplótipos são conjuntos de alelos ou de marcadores, ou seja, formas alternativas do mesmo gene e/ou polimorfismos, no geral, são herdados como uma única unidade devido a sua baixa taxa de recombinação. É devido à análise desses haplótipos em indivíduos que é possível a identificação de polimorfismos locais entre as diferentes populações, geralmente de regiões geográficas precisas, um conjunto de haplótipos determina um haplogrupo, este se refere a um grupo grande de haplótipos, os quais são séries de alelos em lugares específicos de um cromossomo.

Alguns fatores evolutivos são sugeridos para explicar os mecanismos genéticos que modulam as frequências e distribuição das mutações em diferentes populações, sendo os principais fatores: a pressão seletiva, altas taxas de mutação “*Hot spots*”, efeito fundador e endogamia. Na Arábia Saudita (OZAND *et al.* 1990) e na Tunísia (KHEDHIRI *et al.*, 2009) existe uma forte associação entre frequência elevada de MPS e casamentos consanguíneos (MOAMMAR *et al.*, 2010), no Brasil a taxa de consanguinidade foi estimada em 4,8% (SANTOS *et al.*, 2010) e no Nordeste do Brasil entre 6 e 12% (FREIRE-MAIA, 1957).

Para reconstruir a história evolutiva da espécie humana, considera-se que os melhores locais para serem analisados são aqueles os quais podemos diferenciar uma população da outra, ou seja, pela diferenciação de alelos entre populações (NEEL e WEISS, 1975). No entanto, marcadores de alelos específicos populacionais são muito raros. Com isso iniciou-se a busca por marcadores que diferenciam a frequência entre populações (SHRIVER *et al.*, 1997)

Os marcadores utilizados para avaliar a composição ancestral de uma população eram denominados PSAs (do inglês, *Population Specific Alleles*) (SHRIVER *et al.*, 1997), atualmente são conhecidos como *Ancestry Informative Markers* (AIMs) ou Marcadores informativos de Ancestralidade (BONILLA *et al.*, 2004). A frequência entre populações pode ser determinada pelos AIMs, estes são adequados em avaliação da composição ancestral de populações híbridas, sendo sua precisão diretamente proporcional à magnitude da diferença das frequências dos marcadores utilizados (WIEZEL, 2008). Para associações entre etnias e hereditariedade é fundamental agrupar populações humanas e indicar sua ancestralidade (BAMSHAD, 2003).

Contudo, a análise dos AIMs é importante, pois descreverá a diversidade genética populacional e também poderá nos mostrar a reconstrução histórica dos povoamentos

(CALLEGARI-JACQUES e SALZANO, 1999); a contribuição das populações fundadoras ancestrais na formação de populações atuais principalmente as miscigenadas (SHRIVER *et al.*, 2003) e estudos de mapeamento genético de associações com doenças (SHRIVER, 1997).

Várias análises estimando a mistura entre as populações já foram realizadas, como por exemplo, o trabalho de Ferreira *et al.* (2006), que mostrou em uma parcela da população de São Paulo a contribuição Africana com uma frequência de 14%, Ameríndia 7% e 79% Europeia. Enquanto que numa população afro-descendente no Brasil a contribuição foi de 26% Africano, 12% Ameríndio e 62% Europeus (MUNIZ *et al.*, 2008). Estudos como estes demonstram que a análise a partir do fenótipo não é suficiente para contar a história de uma população miscigenada como a do Brasil.

Com o estudo dos AIMS é possível estimar mais precisamente as proporções ancestrais de uma população como a Brasileira, miscigenada (PARRA *et al.*, 1998; PARRA *et al.*, 2001; SHRIVER *et al.*, 2003).

Neste estudo foram analisados 5 (cinco) marcadores informativos de ancestralidade, sendo um polimorfismo de inserção/deleção (*indel*, do inglês), três inserções *Alu* – PV92, APO4 e Sb19.3, e a deleção CCR5. Os diferentes alelos encontrados nos marcadores informativos de ancestralidade foram denominados alelos 0 (zero), 1 (um) e 2 (dois). Para os polimorfismos, o alelo 0 foi caracterizado pela ausência de inserção e homocigoto, o alelo 1 pela presença de inserção homocigoto e o alelo 2 heterocigoto.

3.3.1. AT3I/D – Inserção/Deleção

A perda ou a inserção de um par de bases caracteriza os marcadores genéticos bialélicos, do inglês Indels (WEBER *et al.*, 2002)

O gene SERPINC1 que codifica a atirrombina III (AT3) localiza-se no cromossomo 1 (1q25.1), possui 19kb e sete éxons; a AT3 é membro da família de inibidores da serina, caracteriza-se por ser uma molécula de inativação de diversas enzimas de coagulação, tais como fatores IXa, Xa, XIIa e a trombina (LIU *et al.*, 1995) A presença do polimorfismo de comprimento de 76pb (inserção/deleção) rs3138521, localizada na região 5' do éxon1, gera um fragmento de 572pb e caracteriza o alelo 1, sendo mais frequente na população africana, enquanto que o fragmento de tamanho 496pb caracteriza a população ameríndia (LIU *et al.*, 1995, GONTIJO, 2008).

Para análises de populações híbrida como a brasileira, este polimorfismo é útil “por apresentar uma frequência da inserção do alelo principal 85,8% em populações africanas, diferenciando assim, africanos de europeus e africanos nativos-americanos (TELO, 2010).

3.3.2. Inserções *Alu* (Sb19.3, APO4 e PV92)

Os elementos transponíveis correspondem a segmentos de DNA capazes de se mover dentro do genoma. Duas pessoas que compartilhem a mesma sequência *Alu* no mesmo local do seu genoma, elas descendem de um antepassado comum (BATZER e DEININGER, 2002). Devido à improbabilidade que o evento de inserção ocorra duas vezes em um mesmo *locus*. Muitos dos elementos *Alu* provaram ser úteis no estudo da evolução do ser humano e da história natural de diferentes regiões do genoma (CARROL *et al.* 2001).

A família *Alu* é um grupo de sequências de DNA que surgiram a partir de uma única sequência ancestral, é encontrada repetida diversas vezes dentro do genoma humano (BATZER *et al.*; 1996b) e é única de primatas (SHEN *et al.*, 1991; WATKINS *et al.*, 2001). Acredita-se sua amplificação tenha iniciado cerca de 65 milhões de anos atrás (ADE *et al.*, 2013; TELO, 2010) derivado a partir da transcrição reversa um RNA intermediário (7SL RNA) (GONTIJO, 2008), representam cerca de 11% de todo o genoma (ADE *et al.*, 2013).

As inserções *Alu* fazem parte da maior família de pequenos DNA repetitivos SINES (*Short Interspaced Nuclear Elements*) ou repetições intercalantes curtas e são originárias de um retrotransposon (BATZER e DEININGER, 2002). Retrotransposon ou elementos transponíveis (também conhecidos como genes saltadores) são fragmentos de DNA intermediários que podem se mover dentro do genoma (CORDAUX E BATZER, 2009).

A inserção *Alu* para o *locus* Sb19.3 (rs3138524) está localizada no cromossomo 19p12, sua presença gera um fragmento de 457pb que caracteriza o alelo Sb19.3*1. Apresentando frequência elevada em europeus e nativos africanos (ARCOT *et al.*, 1998; MACHADO, 2008).

O locus *Alu* para o *locus* APO4 (rs3138522) apresenta-se no braço longo do cromossomo 11, está próximo a um complexo de genes da apolipoproteína AI-CIII-AIV, a presença desta inserção gera um fragmento de 400 pb tendo frequência elevada em Europeus e Ameríndios (KARATHANASIS *et al.*, 1986).

O gene *Alu* para o *locus* PV92 (rs3138524) localiza-se no cromossomo 16 (BATZER *et al.*, 1994). A caracterização do alelo PV91*1 dá-se pela presença da inserção que gera um fragmento de 400 pb, mais prevalente em populações asiáticas (MACHADO, 2008) ou um fragmento de 129 pb, mais prevalente em nativos americanos, atingindo frequências superiores a 90% em populações ameríndias (LUIZON *et al.*, 2008).

3.3.3. CCR5 Δ 32

O gene que codifica CCR5 está localizado na região p21.3 do cromossomo 3, formando um aglomerado com outros genes dos receptores de quimiocina (MACEDO, 2003; SAMSON *et al.*, 1996). A deleção neste gene dá origem ao alelo mutante CCR5 Δ 32, sua presença em homozigose tem sido relatada em indivíduos resistentes ao HIV, e em heterozigose foi relatado uma progressão mais lenta à AIDS (DEAN *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1996).

Estudos populacionais do CCR5 Δ 32 (rs333) mostram que, esta deleção no gene CCR5 está presente numa frequência alélica média de 10% em europeus, porém não é exclusiva de pessoas com descendência europeia (GALVANI *et al.*, 2005; MARTINSON *et al.*, 1997). Uma frequência muito baixa, rara ou ausente, pode ser encontrada em Africanos, Japoneses e Ameríndios (GALVANI *et al.*, 2005; MARTINSON *et al.*, 1997)

Para o alelo CCR5 Δ 32 em populações urbanas brasileiras foi encontrada uma frequência de 3,5% e entre ameríndios brasileiros há uma ausência do alelo (PASSOS E PICANÇO, 1998); e para a população nordestina uma frequência de 4% (SALDANHA, 2008).

3.4. Mucopolissacaridoses

As mucopolissacaridoses (MPS's), descritas na **tabela 1**, são doenças autossômicas recessivas de depósito lisossômico, exceto pela MPS II a qual é relacionada a uma herança ligada ao cromossomo X; são caracterizadas pelo acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs) intralisossômicos, devido a incapacidade de uma enzima responsável pela degradação dessas moléculas. Os GAGs, também denominados mucopolissacarídeos, não degradados acumulam-se dentro das células e sua quantidade em excesso é excretada pela urina do paciente com MPS. Este acúmulo anômalo compromete a função celular e orgânica, levando a um grande número de manifestações clínicas, as quais são progressivas e afetam múltiplos órgãos (WRAITH, 1995; VIEIRA, 2007).

Características comuns entre as MPS incluem organomegalia, problemas respiratórios, de visão, de audição (GIUGLIANI *et al.*, 2010). Uma série de processos de alteração a nível celular contribuem para a patogênese da doença, simplificados na figura 2.

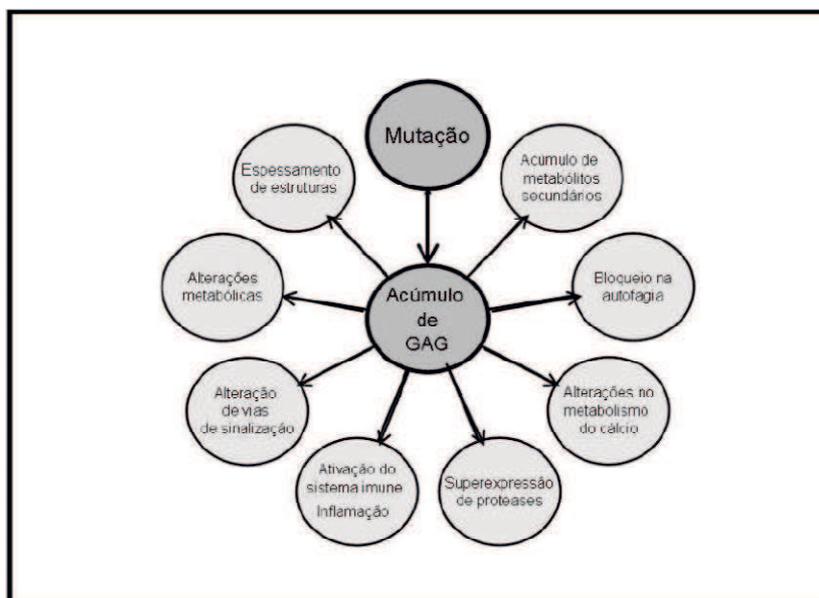


Figura 2. Mecanismo envolvido na patogênese das mucopolissacaridoses. A partir da perda de função em alguma enzima lisossômica que degrade GAG por uma mutação, o acúmulo de substrato leva a uma série de alterações em nível celular e tecidual. Os mecanismos patogênicos podem estar relacionados e estudos deverão ser conduzidos nos próximos anos para identificar tais relações. Fonte: Baldo (2012) mod.

O primeiro caso de MPS foi identificado por Hunter, no ano de 1917, porém a bioquímica molecular da doença só foi explicada entre as décadas de 50 e 60, seus subtipos foram identificados posteriormente (SANTANA, 2004). O diagnóstico é iniciado pela suspeita clínica, baseando-se no fenótipo característico e confirmado pelo exame laboratorial de urina, então, aplica-se um teste qualitativo para identificação de qual tipo de GAG está mais presente na urina (WRAITH e JONES, 2014). Apenas as características clínicas não são capazes de um diagnóstico preciso devido à semelhança fenotípica entre as síndromes (comunicação oral)¹.

Os diversos tipos de MPS têm uma incidência de aproximadamente 1,9-4,5:100.000 indivíduos recém-nascidos vivos (HAMARTZ, 2008). Até 2015 foram confirmados 3.099 casos de doenças de depósito lisossômico em brasileiros, as mais comuns foram doença de Gaucher (725 casos), MPS II (343 casos), MPS VI (238 casos), MPS I (225 casos), acid sphingomyelinase deficiency/ASMD (199 casos), MPS IVA (153 casos), GM1 gangliosidosis (176 casos), Niemann-Pick C (150 casos), Leucodistrofia Metacromática (150 casos), Doença de Tay-Sachs (122 casos), doença Fabry (104 casos), MPS IIIB (88 casos), doença de Krabbe (96 casos), MPS IIIA (53 casos) e MPS III C (52 casos) (GIUGLIANI *et al.*, 2017).

¹ Palestra sobre a incidência de Mucopolissacaridose no estado da Paraíba no HUAC, Campina Grande.

Tabela 1. Classificação das Mucopolissacaridoses

MPS	Outro nome	Enzima afetada	GAG afetado	Incidência*
I	Hurler Síndrome (H) Hurler-Scheie Síndrome (H/S) Scheie Síndrome (S)	α -L- iduronidase	Dermatan e heparan sulfato	1: 100 000
II	Hunter	Iduronato-2-sulfatase	Dermatan e heparan sulfato	1: 162.000
IIIA	Sanfilippo A	Heparan-N-sulfatase	Heparan Sulfato	1:128.000
IIIB	Sanfilippo B	α -N-acetilglicosaminidase	Heparan Sulfato	1:135.000
IIIC	Sanfilippo C	AcetilCoA: α -glicosamina acetiltransferase	Heparan Sulfato	1:1.407.000
IIID**	Sanfilippo D	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	Heparan Sulfato	1:1.056.000
IVA	Morquio A	N-acetilglicosamina-6-sulfatase	Queratan Sulfato	1:201.000
IVB	Morquio B	β - galactosidase	Queratan Sulfato	1:715.000
VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina-4-sulfatase	Dermatan Sulfato	1:248.000
VII	Sly	β -glicuronidase	Dermatan e Heparan Sulfato	1: 2.111,000
IX**	Natowicz	Hialuronidase	Ácido Hialurônico	4 casos

Fonte: Adaptado de Guarany (2015); CLARKE, 2008.

* Adaptado de Guarany *et al.* (2015).

** Não há diagnósticos de MPS IIID e IX no Brasil (GIUGLIANI *et al.*, 2017).

3.4.1. Mucopolissacaridose tipo I

Assim como a maioria dos outros tipos de MPSs, a MPS tipo I (OMIM #252800) é uma doença autossômica recessiva rara, crônica e progressiva, causada pela deficiência de uma enzima denominada α -L-iduronidase. Esta enzima é responsável pela degradação de dois tipos de GAGs: sulfato de dermatano e heparan sulfato (MOORE *et al.*, 2008; CAMPOS e MONAGA, 2012; BECK *et al.*, 2014) a partir da remoção de resíduos do terminal do ácido idurônico durante a degradação sequencial destes dois GAGs (NEUFELD, 2000). A α -L-iduronidase contém uma cadeia de 653 aminoácidos (AA) e sua deficiência é alusiva ao acúmulo dos dois GAGs citados anteriormente, acarretando, assim, uma ampla ocorrência de manifestações clínicas (PASTORES *et al.*, 2007).

Na célula, a integridade da matriz extracelular é mantida devido ao processo natural de homeostase, mantê-la depende da composição de glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos sulfatados presentes no meio (BIELIK e ZAIA, 2010). Os glicosaminoglicanos sulfatados têm sua função alterada ao se ligar a proteínas específicas, modificando assim o desenvolvimento, modulação da angiogênese, ciclo celular, inflamação, apoptose, sinalização dos fatores de crescimento (YANG *et al.*, 2013).

A MPS tipo I denota heterogeneidade clínica considerável, sendo caracterizada por afetar múltiplas partes do corpo, porém pode apresentar diferentes graus de comprometimento esquelético, cardíaco, digestivo e respiratório ao organismo, causado pela deficiência da mesma enzima: α -L-Iduronidase (TERLATO e COX, 2003). Alguns polimorfismos funcionais não patogênicos pode também ter um papel na expressão de alelos mutantes no gene IDUA, contribuindo para a heterogeneidade fenotípica e clínica característica de MPS tipo I (D'ACO *et al.*, 2012). Estudos de mutações no gene serve para o aconselhamento genético de família e também como diagnóstico complementar (MATTE *et al.*, 2003).

Atualmente a base de dados do *The Human Gene Mutation* lista mais de 110 variantes patogênicas para o gene IDUA, incluindo mutações sem sentido (*nonsense*), missense (*sentido trocado*), pequenas deleções, inserções (PAGON *et al.*, 2016).

Indivíduos com MPS tipo I não apresentam sintomas da doença ao nascer, embora alguns tenham hérnia umbilical (pequena elevação do umbigo) ou hérnia inguinal (baixo abdome). As características clínicas da síndrome de Hurler incluem faces grosseiras, opacidade corneana, deficiência intelectual, hérnias e hepatoesplenomegalia (WRAITH *et al.*, 1987)

O gene referente à MPS tipo I denominado IDUA está presente no braço curto do cromossomo 4 (região 4p16.3) e possui cerca de 19kb em 14 éxons que codifica a enzima α -

L-Iduronidase (SCOTT *et al.*, 1990, 1992), MPS tipo I é causada por alterações neste gene. A MPS tipo I é uma síndrome dividida em três subtipos: Síndrome de Hurler (MPS IH – OMIM #607014) com expectativa de vida menor que 10 anos, síndrome de Huler-Scheie (MPS IHS – OMIM #607015) possui uma expectativa de vida abaixo dos 25 anos de idade e síndrome de Scheie (MPS IS – OMIM #607016) é a mais compatível com a vida e pode conceder ao afetado uma expectativa de vida normal; no entanto, a primeira determina o tipo mais severo, a segunda e terceira os tipos mais atenuados da doença (BECK *et al.*, 2014; VIJAY & WRAITH, 2005). Estas nomenclaturas foram sugeridas por McKusick *et al.* (1972).

Todas as formas de MPS tipo I podem afetar diferentes órgãos e tecidos, pessoas com o tipo mais severo tem por sua vez um declínio da função intelectual e uma progressão da doença mais rápida. Atraso no desenvolvimento é, em geral, apresentado no primeiro ano de vida, casos severos eventualmente perdem funções básicas funcionais do corpo. Indivíduos com tipos mais atenuados possuem dificuldades na aprendizagem, enquanto outros não apresentam sintomas de regressão intelectual. Problemas de coração e obstrução do trato respiratório são as maiores causas de morte em pessoas com MPS tipo I (PAGON *et al.*, 2016).

A incidência de MPS tipo I varia bastante entre as populações sendo estimada 1:100.000 nascidos vivos (BECK *et al.*, 2014), 0,63:100.000 na Tunísia (CHKIOUA *et al.* 2011); 1,22:100.000 no Brasil (GIUGLIANI, *et al.* 2012), 1,33:100.000 em Portugal (POUPETOVA *et al.*, 2010) e 1,7:100.000 no Reino Unido (MOORE, *et al.* 2008). A discrepância na incidência entre populações de diferentes etnias reflete a influência de fatores evolutivos, como efeito fundador no processo de transmissão da doença e consanguinidade já observada em outras doenças autossômicas recessivas, inclusive na MPS IV-A (KHEDHIRI *et al.* 2009). O Brasil é o país da América Latina com o maior número de pacientes com MPS I (BECK, *et al.* 2014).

4. METODOLOGIA

4.1. Local de estudo e amostragem

O presente estudo foi desenvolvido na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande – PB, no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) desta instituição, responsável pelas análises moleculares de ancestralidade. Para a realização desta pesquisa científica, o projeto foi submetido ao comitê de ética da própria instituição. CEP-UEPB: CAAE: 66503617.9.0000.5187.

Foram estudadas no total 6 (seis) amostras de pacientes com Mucopolissacaridose tipo I. A triagem dos pacientes e coleta de sangue periférico foi realizada pelo Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC), obtidas por colaboração de Dr^a Paula Frassinetti. A população é proveniente de diversos municípios do Estado da Paraíba, sendo um (1) de Campina Grande, um (1) de Patos, dois (2) de São João do Rio do Peixe e dois (2) de Pombal, descritos na Figura 3. No intuito de preservar as identidades dos pacientes do presente estudo, os mesmos foram nomeados de MS1 a MS6.

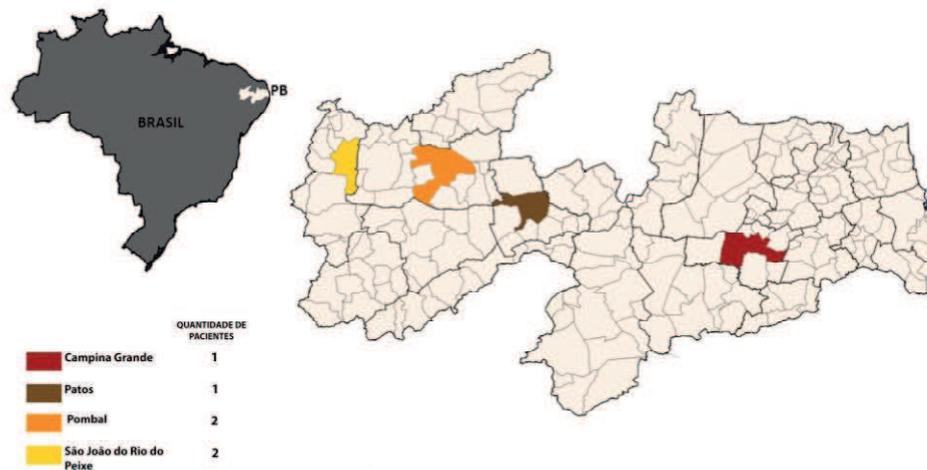


Figura 3. Mapa situando a localização das cidades de origem dos pacientes com MPS tipo I na Paraíba (PB) e a quantidade de pacientes diagnosticados nas respectivas cidades. (Fonte: *Google Maps* adaptado).

4.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico de indivíduos com MPS tipo I, e, a partir delas iniciou-se o processo de extração de DNA. Este procedimento foi executado através do Kit de extração de DNA denominado *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, Promega seguindo as recomendações do fabricante.

4.3. Genotipagem das amostras

Foi realizada a reação em cadeia polimerase (PCR) (do inglês *Polimerase Chain Reaction*) nas amostras dos seis (6) pacientes a fim de amplificar a região de interesse utilizando os AIMs descritos na tabela 2.

Tabela 2. Marcadores moleculares utilizados neste estudo.

Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)		
Marcador	Primers utilizados	Tamanho do fragmento (pb)
PV92 ¹	5' AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT 3'	129 e/ou 443 pb
	5' TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTGTTAG 3'	
APO4 ²	5' AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG 3'	400 e/ou 110 pb
	5' AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA 3'	
Sb19.3 ³	5' TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG 3'	457 e/ou 157 pb
	5' AAGCACAATTGGTTATTTTCTGAC 3'	
CCR5 ⁴	5' ACCAGATCTCAAAAAGAA 3'	193 ou 225 pb
	5' CATGATGGTGAAGATAAGCTTCA 3'	
AT3-I/D ⁵	5' CCACAGGTGTAACATTGTGT 3'	572 e/ou 496 pb
	5' GAGATAGTGTGATCTGAGGC 3'	

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

Para a amplificação da maioria das amostras foi utilizado um volume total de 12,5µl em micro tubos de 0,2ml, no termociclador *Veriti (Applied Biosystems Thermo Fisher)*. Os parâmetros utilizados para cada marcador estão descritos nas tabelas presentes no Apêndice A.

4.4. Eletroforese em gel

A análise dos produtos de PCR para os marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) foram submetidos a gel de poliacrilamida a 8% e/ou 12% em cuba vertical com tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089M; Ácido Bórico 0,089M e EDTA 0,002M) por 2 (duas) horas e 30 (trinta) minutos aproximadamente, o *bivolt* foi regulado à uma voltagem de 120V e uma corrente de 36 mAh (miliampères-hora). Posteriormente os géis foram corados em nitrato de prata de acordo com o protocolo descrito em Crest *et al.* (2001). O tamanho dos fragmentos foi caracterizado utilizando um marcador padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb) Invitrogen™.

4.5. Análise dos resultados

A análise dos resultados obtidos se deu através da contagem direta dos alelos e tabulação dos resultados que foram analisados através do programa *Structure 2.3.4* (PRITCHARD *et al.*, 2000) e sua extensão online *Structure Harvester*² (EARL *et al.*, 2012) para o reconhecimento da estrutura populacional dos pacientes analisados a partir dos AIMs.

Os parâmetros utilizados para o programa foram $k=3$, onde k significa o número de populações, *burning period*: 20.000, por 200.000 interações Cadeia Markov e Monte Carlo (MCMC), esta cadeia é um algoritmo utilizado para realizar as aproximações, e o parâmetro *Admixture model*, utilizado para populações miscigenadas.

5. RESULTADOS

5.1. Análise dos marcadores informativos de Ancestralidade.

Os marcadores utilizados neste estudo foram PV92, APO4, Sb19.3, CCR5 e AT3id por possuírem alelos com alto diferencial de frequência (PARRA *et al.*, 1998); estes marcadores restringiram o estudo da variabilidade genética em três diferentes populações: africanas, ameríndias e europeias.

Houve uma contribuição maior europeia com uma ocorrência de 41,6%, sendo 30,7% de contribuição Africana e 27,7% Ameríndia (Figura 4).

As frequências alélicas, os genótipos encontrados e o número de amostras analisados estão descritos na tabela 3:

² Web v0.6.94 July 2014, Plot vA 1 November 2012, Core vA.2 July 2014.

Tabela 3. Frequências dos alelos observados para os AIMs.

Marcador	Genótipo	Número de amostras	Frequência Alélica (%)
PV92	0	1	18,8
	2	4	63,0
	1	1	18,2
APO4	1	6	100
AT3id	1	4	61,8
	0	1	19,7
	2	1	18,5
Sb19.3	1	6	100
CCR5	0	6	100

Legenda: O genótipo para os marcadores PV92, APO, AT3id e Sb19.3 são caracterizados da seguinte forma: 0 – homozigoto sem inserção; 1 – homozigoto com inserção; 2 – heterozigoto. O marcador CCR5 tem a seguinte caracterização: 0 – homozigoto sem deleção; 1 – homozigoto com deleção (Fonte: Autor).

Através da análise do *software structure*, foi obtida também a contribuição da variabilidade genética para cada indivíduo que está representado na tabela 4.

Tabela 4. Variabilidade individual dos pacientes deste estudo.

Indivíduo	Contribuição Individual (%)		
	Europeia	Ameríndia	Africana
MS1	41,5	27,7	30,8
MS2	41,6	27,7	30,6
MS3	41,5	27,7	30,8
MS4	41,6	27,7	30,7
MS5	41,6	27,8	30,6
MS6	41,6	27,7	30,7

Fonte: Autor.

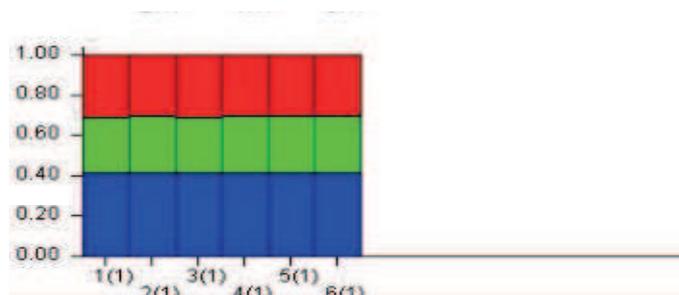


Figura 4. Contribuições individuais dos pacientes com MPS tipo I. As cores vermelho, verde e azul representam a contribuição africana, ameríndia e europeia respectivamente. Fonte: Autor.

6. DISCUSSÃO

Este estudo consistiu em analisar a ancestralidade genética de pacientes com MPS tipo I da Paraíba, para os componentes ancestrais africano, ameríndio e europeu, determinando as proporções alélicas e ancestralidade dos indivíduos em estudo.

No presente estudo pode-se observar uma contribuição total de 41,6% para a descendência Europeia, seguido de 30,7% e 27,7% para a Africana e Ameríndia respectivamente. Isto mostra uma predominância genotípica europeia que também está presente em outras regiões do Brasil. Embora a origem europeia seja predominante no sul, no Nordeste chega a 42,4% (JUSTINO, 2015). Em um estudo de pacientes com anemia falciforme na Bahia, Nascimento (2016) observou uma contribuição maior europeia com 44%.

Outro estudo desenvolvido em Salvador envolvendo pacientes com câncer de mama triplo-negativo, a análise genômica, de acordo com a estimativa de mistura populacional feita através dos AIMs, obteve-se uma maior contribuição africana (50%), seguida da Europeia (40%) e por último, ameríndia (8%) (CORRÊA, 2010), isto demonstra que a frequência varia de acordo com a região que está sendo estudada.

Neste caso a região sul do Nordeste brasileiro, na Bahia, durante o processo de exploração do território brasileiro, o grupo étnico populacional que mais se desenvolveu na região foi a africana como pode ser observado também nos estudos de Bonfim (2008), desenvolvido em Salvador, com uma contribuição africana de 48%.

Segundo Pinto (2004), Portugal apresenta uma frequência para mucopolissacaridose tipo I de 13% no norte do país e 35% no resto do país. A frequência mínima de MPS tipo I no Brasil é de 31%, de acordo com o total de casos diagnosticados em 14 anos (2000-2013) divididos pelo número total de nascimentos no mesmo período (GIUGLIANI, 2017). É provável que a Paraíba seja o estado do nordeste brasileiro com maior número de pacientes vivos com MPS tipo I diagnosticados até a presente data. Segundo Holanda (2010), em um estudo epidemiológico, o Rio Grande do Norte apresenta três pacientes com MPS tipo I. O Ceará apresenta 3 pacientes vivos (RIBEIRO, 2014) e neste estudo foram analisados 6 pacientes.

A distribuição genotípica bem como a ancestralidade de grupos humanos a partir de marcadores moleculares pode ser inferida em estudos populacionais, porém, embora os dados na literatura mostrem a formação da população a partir, principalmente, dessas três populações estudadas: ameríndios, africanos e europeus; a distribuição dos três grupos étnicos

mencionados não ocorreu homogeneamente, em outras palavras, a proporção da distribuição dessas populações imigrantes depende da região geográfica estudada (TELÓ, 2010).

Pode ser observada em amostra de Minas Gerais uma prevalência maior Africana e 47,3% (SILVA, 2011); diferentemente, as amostras deste estudo que apresentaram uma contribuição maior europeia 41,6%. Ferreira (2012) demonstra a partir de AIMs que na Bahia (região de Ilhéus e Itabuna) houve contribuição europeia de 51%, em outro estudo, a partir da análise dos AIMs, Campos-Sanchez (2013) mostrou uma ancestralidade europeia de 49,2% em uma população da Costa Rica.

Foi analisada a frequência do alelo *1 para cada *locus*, de acordo com a convenção descrita em Parra et al. (1998), para comparação e diferencial de frequências alélicas (Tabela 5)

Os parâmetros moleculares dos AIMs estudados mostraram-se, em grande parte, coerentes com os dados mostrados na literatura para as diferentes populações. O alelo PV92*1 é um marcador com frequência superior a 90% em ameríndios (LUIZON *et al.*, 2008), neste estudo ele se apresentou em 5 dos pacientes, sendo 1 homozigoto (18,8%) e 3 heterozigotos (63,0%). O alelo APO4*1 chegou a 100%, é encontrada entre europeus (94%) e Ameríndios (100%) (FERREIRA, 2012). O alelo AT3I/D*1 apresentou uma frequência de 61,8% (africano), mostrando-se mais elevado assim como nos estudos de Teló (2010) em Salvador 85,8% e Abe-Sandes *et al.* (2010) em uma amostra de Salvador 55%. O alelo Sb19.3*1 apresentou uma frequência de 100% para a ancestralidade europeia, encontrado em uma frequência de 67% por Abe-Sandes *et al.* (2010). CCR5 apresentou uma frequência de 100% para nativos americanos não ocorrendo à presença do alelo *1 nos pacientes estudados; embora esteja presente aproximadamente em 10% dos europeus, e ausente em Africanos sub-Sarianos (DEAN *et al.*, 1996; MARTINSON *et al.*, 1997). Contudo, os resultados mostram uma miscigenação na população analisada.

Tabela 5. Frequência do alelo *1 para cada *locus*.

Marcador	População	Frequência Global	Média dos Pacientes
PV92 *1	Ameríndia	90%	18,2%
APO4 *1	Europeia	94%	100%
AT3I/D *1	Africana	85%	61,8%
Sb19.3 *1	Europeia	93%	100%
CCR5 *1	Europeia	10%	0%

Frequências segundo: a. LUIZON *et al.* (2008); b. Ferreira (2012) e c. DEAN *et al.* (1996).

7. CONCLUSÃO

Os pacientes com MPS tipo I da Paraíba apresentam uma maior frequência europeia, seguida por uma frequência Africana e Ameríndia, respectivamente. As frequências estimadas para as contribuições ancestrais desses pacientes são similares, contudo, os AIMs utilizados mostraram-se bons marcadores de ancestralidade para os pacientes com MPS tipo I. Comparando as frequências observadas, podemos observar que os valores para os AIMs são em sua maioria intermediária, o que reflete o processo de miscigenação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ADE, C.; ROY-ENGEL, A. M.; DEININGER, P. Alu elements: Na intrinsic source of human genome instability. **Curr Opin Virol.** 3 (6) 639-645. 2013.
- AKEY, J.M.; EBERLE, M.A.; RIEDER, M.J.; CARLSON, C.S.; SHRIVER, M.D.; NICKERSON, D.A.; KRUGLYAK, L. Population History and Natural Selection Shape Patterns of Genetic Variation in 132 Genes. **PLoS Biol.** 2, e286. 2004.
- ARCOT, S.S.; ADAMSON, A.W.; RISCH, G.W.; LAFLEUR, J.; ROBICHAUX, M.B.; LAMERDIN, J.E.; CARRANO, A.V.; BATZER, M.A.; High resolution cartography of recently integrated human chromosome 19-specific Alu fossils. **J Mol Bio.** V. 281, p. 843-856, 1998.
- BALDO, G. Mucopolissacaridoses: mecanismos patogênicos e abordagens terapêuticas baseadas em terapia gênica e reposição enzimática. UFRGS, Porto Alegre, 2012.
- BAMSHAD M. J. Human Population Genetic Structure and Inference of Group Membership. **Am J Hum Genet.** 72: 578-589, 2003.
- BATZER M.A, DEININGER P.L. Repeats of *Alu* and Human Diversity of Genomic. **Genetics** 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. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 91, n 25, p. 12288-12294, 1994.
- BATZER, M.A.; ARCOT, S.S.; PHINNEY, J.W. *et al.* Genetic variation of recent *Alu* insertions in human population. **J of Mol Evo**, v. 42 p. 22-29, 1996a.
- BATZER, M.A.; DEININGER, P.L.; HELLMANN, U. *et al.* Standardized nomenclature of *Alu* repeats. **J of Mol Evo**, v.42, n.1, p. 3-6, 1996b.
- BECK, M.; ARN, P.; GIUGLIANI, R.; MUENZER, J.; OKUYAMA, T.; TAYLOR, J.; FALLET, S. The natural history of MPS I: global perspectives from the MPS I Registry. **Genetic in Medicine.** V.15. n. 10. October, 2014.
- BONFIM, T.F. **Ancestralidade genômica em uma amostra de portadores de HIV-1 do estado da Bahia.** Dissertação de mestrado. Fiocruz. 2008.
- BONILLA, C.; PARRA, E. J.; DIOS, S.; MARSHALL, J.A.; HAMMAN, R.F.; FERREL, R.E.; HOGGART, C.L.; McKEIGUE, P. M.; SHRIVER, M.D. Admixture in the Hispanics of the San Luis valley, Colorado, and its implication for complex trait gene mapping. **The American Journal of human genetics.** V. 68, p 139-153, 2004.

- BIELIK, A. M.; ZAIA, J. Extraction of chondroitin/dermatan sulfate glycosaminoglycans from connective tissue for mass spectrometric analysis. **Methods Mol Biol.** 600:215-25. 2010
- CALLEGARI-JACQUES, S.M.; SALZANO, F.M. Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v.51, p. 166-174, 1999.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F.M. et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, 15: 824- 834. (2003).
- CAMPOS, D.; MONAGA, M. Mucopolyscharidosis type I: current knowledg on its pathophysiological mechanisms. Review Article. **Metab Brain Dis**, 27:121-129. 2012.
- CAMPOS-SANCHEZ,R.;RAVENTOS, H.; BARRANTES, R. Ancestry Informative Markers clarify the regional admixture variation in the Costa Rican Population. **Hum Bio.** 85 (5): 721-40. 2013.
- CARROLL M.L, ROY-ENGEL A.M, NGUYEN S.V, SALEM A.H, VOGEL E, VINCENT B, MYERS J, AHMAD Z, NGUYEN L, SAMMARCO M, WATKINS W.S, HENKE J, MAKALOWSKI W, JORDE L.B, DEININGER P.L, BATZER MA. Large-scale analysis of the *Alu* Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity. **J Mol Biol.** Aug 3; 311(1): 17-40, 2001.
- CAVALLI-SFORZA, L. L. The DNA revolution in population genetics. **Trends in Genetics**, v. 14, n. 2, p. 60-65, 1998.
- CHAKRAVARTI, A. Kinship: race relations. Essay. *Nature*. Vol 457. 22 Jan 2009.
- CHKIOUA *et al.* Hurler disease (mucopolysaccharidosis type IH): clinical features and consanguinity in Tunisian population. **Diagnostic Pathology.** 6:113. 2011.
- CLARKE, L. A. The mucopolyscharidoses: a success of molecular medicine. **Expert reviews in molecular medicine.** Vol. 10, e1, January 2008.
- CLARK, A.G.; HUBISZ, M.J.; BUSTAMANTE, C.D.; WILLIAMSON, S.H.;NIELSEN, R. Ascertainment bias in studies of human genome-wide polymorphism. **Genome Res.** 15, 1496–1502.2005.
- CLEROT, L. **Distribuição dos grupos indígenas.** In: Atlas Geográfico da Paraíba. João Pessoa, FAFI/UFPB. p. 39/40. 1965.
- CORACH, *et al.* Relevant Genetic contribution of Amerindian to the extant population of Argentina. **Elsevier B. V.** p. 397-399. 2006.
- CORDAUX, R.; BATZER, M.A.The impact of retrotransposons on human genome evolution. **Nature Reviews/Genetics.** v. 10. p. 691-903. 2009.
- CORRÊA, P.B. **Associação entre câncer de mama triplo-negativo e ancestralidade africana.** Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Dissertação de Mestrado. Salvador. 2010.

CRESTE,S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of a single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Mol Biol Rep**, v. 19, p. 299-306, 2001.

DANIEL, R.; SANCHEZ, J.J.; NASSIF, N.T.; HERNANDEZ, Q. *et al.* SNPs associated with physical traits-A valuable tool for the inference of biogeographical ancestry. **Forensic Sci. Int.** 1: 538-540. 2008.

D'ACO, K, UNDERHILL, L., RANGACHARI, L.; ARN, P.; COX, G.F.; GIUGLIANI, R. *et al.* Diagnosis and treatment trends in mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. **European Journal of Pediatrics**. 171(6):911–9.2012.

DEAN, M. *et al.* Genetic retraction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of CKR5 structural gene. **Science**. 273 (5283):1856-62. 1996.

EARL, D.A.; vonHOLDT, BM. Structure Haverster: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, v. 4, p. 359-361, 2012.

FERREIRA, L.B. *et al.* Genomic Ancestry of a sample population from the state of São Paulo, Brazil. **Am J of Hum Biology**, v. 18, p. 702-705, 2006.

FERREIRA, R.S. **Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) em mulheres do sul da Bahia**. Dissertação de mestrado. UESC. Iléus – BA. 2012.

FREIRE-MAIA, N. Inbreeding in Brazil. **Am J Hum Genet** 9:284-298. 1957.

FUNAI – SITE DA FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO. Disponível em: <<http://www.funai.gov.br/>>. Acesso em: Abril de 2017.

GALVANI, A.P.; NOVEMBRE, J.; SLATKIN, M. The Geographic Spread of the CCR5 Δ 32 HIV-Resistance Allele. **PLoS Biol** 3(11): e339. doi:10.1371/journal.pbio.0030339. 2005.

GIUGLIANI, R *et al.* Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: brief review and guidelines for treatment. **Genet. Mol. Biol.** vol.33 no. 4 São Paulo. 2010 Epub Nov 12, 2010

GIUGLIANI, R. Newborn screening for lysosomal disease: current status and potential interface with population medical genetics in Latin America. **J Inherit Metab Dis**, v. 35:871-877. 2012.

GIUGLIANI, R *et al.* Relative frequency and estimated minimal frequency of Lysosomal Storage Diseases in Brazil: Report from a Reference Laboratory. **Genet and Mol Biol**. 2017.

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

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

GOVERNO DA PARAÍBA. História da Paraíba. Disponível em: <http://www.pm.pb.gov.br/arquivos/Historia_da_Paraiba.pdf>. Acesso em: 02/04/2017.

HARMATZ, P. Entering a new treatment age for mucopolysaccharidosis VI disease: a search for better markers of disease progression and response to treatment. **J Pediatr (Rio J)**. 84:2, 103106. 2008.

HOLANDA, G.B.M.; FERNANDES, V.J.J.; PERES, R.A.; MORORÓ, D.D.S.; AMARAL, V.S.; COSTA, M.I.F. Perfil Epidemiológico das Mucopolissacaridoses no Estado do Rio Grande do Norte. **62 Reunião anual da SBPC**. 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **IBGE**. 2017a. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?lang=&sigla=pb>>. Acesso em: 30/03/2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Brasil 500 anos. 2017b. **IBGE**, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://brasil500anos.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 30/03/2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Censo Demográfico 2010. **IBGE**, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/>>. Acesso em: 30/03/2017

JUSTINO, G. Análise genética traz dados inéditos sobre miscigenação brasileira. UFMG. (2015). Disponível em: <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/noticias/planeta-ciencia/noticia/2015/08/analise-genetica-traz-dados-ineditos-sobre-a-miscigenacao-brasileira-4830108.html>>. Acesso em: Abril de 2017.

KARATHANASIS, S. K.; ZANNIS, V. I.; BRESLOW, J. L. Characterization of the apolipoprotein A-I-C-III gene complex. **Methods Enzymol**, 128:712-26, 1986.

KHEDHIRI, S.; CHKIOUA, L.; BOUZIDI, H.; DANDANA, A.; BEN TURKIA, H.; MILED, A.; LARADI, S. Mucopolysaccharidoses type I and IVA: **Clinical features and consanguinity in Tunisia**. **Pathologie Biologie**. 57:392-397.2009.

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

LIU, Y.; SAHA, N.; LOW, P.S.; TAY, J.S. Linkage disequilibrium between two loci (5' untranslated exon 1 and intron 5-DdeI) of the antithrombin III gene in three ethnic groups in Singapore. **Hum Hered**, 45: 192-198. 1995.

LIU, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 correceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell** 86(3): 367-377. 1996.

LUIZON, M. R.; MENDES-JUNIOR, 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.

MACEDO, A.K.V. **Determinação do polimorfismo de Δ CCR5e comparação com a distribuição de frequências encontradas em indivíduos infectados com HIV-1 na população de Pernambuco**. UFPE. Recife. 2003.

- MACHADO, T. M. B. **Migração, estrutura populacional, tipos de casamentos e doenças genéticas em Monte Santo – Ba.** Tese de Doutorado, 2012.
- MACHADO, T.M.B. **Ancestralidade em Salvador.** FIOCRUZ. Salvador. 2008.
- MARTINSON, J.J.; CHAPMAN, N.H.; REES, D.C.; LIU, Y.T.; CLEGG, J.B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet** 16 (1):100-3. 1997
- MATTE, U; YOGALINGAM, G.; BROOKS, D.; LEISTNER, S.; SHWARTZ, I.; LIMA, L.; NORATO, D. Y. *et al.* Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. **Mol Genet Metab.** 78 (1): 37-43. 2003.
- McKUSICK, V. A.; HOWELL, R. R.; HUSSELS, I. E.; NEUFELD, E. F., STEVENSON, R. E. Allelism, nonallelism and genetic compounds among the mucopolysaccharidoses. **Lancet** 299: 993-996, Note: Originally Volume I. 1972.
- MOAMMAR, H.; CHERIYAN, G.; MATHEW, R.; AL-SANNAA, N. Incidence and patterns of inborn errors of metabolism in the Eastern Province of Saudi Arabia, 1983-2008. **Ann Saudi Med** 30:271. 2010.
- MOORE, D.; CONNOCK, M.; WRAITH, E.; LAVERY, C. The prevalence of and survival in Mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes in the UK. Orphanet Journal of rare Disease. **BioMed Central.** 3:24. 2008.
- MORAIS, P.J.S. **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de Cabo verde residentes de Lisboa.** Eganias Moniz: Portugal, 2013.
- MUNIZ, Y.C. et al. Genomic ancestry in urban Afro-Brazilians. **Annals of Human Biology,** v.35, n.1, p.104-11, Jan-Feb. 2008.
- NASCIMENTO, A.F.; OLIVEIRA, J.S.; JUNIOR, J.C.S.; BARBOSA, A.A.L. Genomic ancestry evaluated by ancestry informative markers in patients with sickle cell disease. **Genet Mol Res,** 15 (1): gmr. 15017604. 2016.
- NEEL, J.V.; WEISS, K.M. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. XII. Biodmographic studies. **Am J Phy anthropol** 42 (1) >25-51. 1975.
- NEUFELD, E.F.; MUENZER, J. The mucopolysaccharidoses. In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Edited by: **Scriver** CR, Sly WS. New York: McGraw-Hill; 3421-3452. 2000
- NIELSEN, R.; HUBISZ, M.J.; HELLMAN, I. et al. Darwinian and demographic forces affecting human protein coding genes. **Genome Res.** 19, 838– 849. 2009.
- 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.
- OLIVEIRA, P. C. **Ancestralidade genética e genes de susceptibilidade em portadores de câncer de próstata do Estado da Bahia.** FIOCRUZ: Bahia, 2014.

OZAND, P. T.; GASCON, G.; AQEEL, A. al.; ROBERTS, G.; DHALLA, M.; SUBRAMANYAM, S. B. Prevalence of Different Types of Lysosomal Storage Diseases in Saudi Arabia. **J Inherit Metab Dis** 13 (6): 849-861. 1990.

PAGON, R.A.; ADAM, M.P.; ARDINGER, H.H. *et al.* Mucopolysaccharidosis type I. **Gene Reviews [internet]** – NCBI BookShelf. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 2016.

PARRA, E. J.; KITTLES, R. A.; ARGYROPOULOS, G.; PFAFF, C. L.; HIESTER, K.; BONILLA, C.; SYLVESTER, N.; et al. Ancestral proportions and admixture dynamics in geographically defined African Americans living in South Carolina. **Am J Phys Anthropol**, v. 114, n. 1, p. 18-29, 2001.

PARRA, E. J.; MARCINI, A.; AKEY, J.; MARTINSON, J.; BATZER, M. A.; COOPER, R.; FORRESTER, T.; et al. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. **Am J Hum Genet**, v. 63, n. 6, p. 1839-51, 1998.

PASSOS, J.A.; PICANÇO, V.P. Frequency of the delta ccr5 deletion allele in the urban Brazilian population. **Immuno Lett** 61 (2-3): 205-7. 1998.

PASTORES, G. M.; ARN, P.; BECK, M.; CLARKE, J. T.; GUFFON, N.; KAPLAN, P.; MUENZER, J.; NORATO, D. Y.; SHAPIRO, E.; THOMAS, J.; VISKOCHIL, D.; WRAITH, J. E.; The MPS I registry: design, methodology, and early findings of a global disease registry for monitoring patients with Mucopolysaccharidosis Type I. **Mol Genet Metab**. 91 (1): 37-47. Epub, 2007.

PENA, S. D. J. **Raça, genética, identidade e saúde**. V. 12, n. 2, p. 321 – 46, maio-ago, 2005.

PENA, S. D. J. *et al.*, **The genomic ancestry of individual from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected**. V.6. n. 2. P. 1706, 2011.

PINTO, R.; CASEIRO, C.; LEMOS, M. *et al.* Prevalence of lysosomal storage disease in Portugal. **European J of Hum Genet** 12, 87-92. 2004.

POUPETOVÁ, H.; LEDVINOVÁ, J.; BERNÁ, L.; DVORAKOVÁ, L.; KOZICK, V.; ELLEDER, M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in Czech Republic: comparison with data in different populations. **J inherit Metab Dis** 33: 387-396. 2010.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.. DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

REDE MPS BRASIL. Sobre MPS. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/redempsbrasil/>>. Acesso em: 04/04/2017.

REICHE, E.M.V.; WATANABE, MAE.; BONAMETTI, A.M; MORIMOTO, H.K.; MORIMOTO, A.A.; WIECHMANN, S.L.; MATSUO, T.; OLIVEIRA, J.C.; REICHE, F.V.; Frequency of CCR5Δ32 deletion in human immunodeficiency virus type I (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1 exposed seronegative and HIV-1 seropositive individuals of Southern

Brazilian population. **International Journal o Molecular Medicine**, v. 22, p. 669-675, 20088.

REICH, D.; PATTERSON N.; JAGER, P.L. *et al.* A whole-genome admixture scan finds a candidate gene for multiple sclerosis susceptibility. **Nat Genet.**;37:1113–1118. 2005

RIBEIRO, E.M. **Estudo genético-clínico de mucopolissacaridoses no Estado do Ceará.** Tese de Doutorado. 2014.

ROYAL, C.D.; NOVEMBRE, J.; FULLERTON, S.M.; GOLDSTEIN, D.B.; LONG, J.C.; BAMSHAD, M.J.; CLARK, A.G. Inferring genetic Ancestry: opportunity, challenges, and Implications. **The Ame J Hum Genet** 86, 661-673, 14 May 2010.

SALDANHA, C. J. P. **Avaliação da mutação ccr5 Δ 32 do receptor da b-quimiocina 5 como marcador genético histórico na população de Triunfo-PE.** Dissertação de mestrado. Recife. 2008.

SALZANO, F.M.; FREIRE-MAIA, N. Populações Brasileiras. **Copanhia Editora Nacional.** São Paulo – SP. 1967.

SAMSON, M.; SOULARUE, P.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3 – p24 region of the chromosome 3. **Genomics.** 36:522-6. 1996.

SANTANA, P. M. Lesmucopoliscaridosis: The mucopolyscharidosis. **Children Nutrition.** V. 31, n. 1, p 8-15. 2004.

SANTOS, F.R.; TARAZONA-SANTOS, E. **A história do povoameno pré-colombiano das Américas e o cromossomo Y humano.** In: “*Homo brasiliis*: Aspectos genéticos, linguísticos, históricos e culturais da formação do povo brasileiro”. Editor: Sergio D. J. Pena. Editora: FUNPEC. 2002.

SANTOS, R.V. *et al.* No fio da navalha: raça, genética e identidades. **Revista USP.** São Paulo. N. 86. P. 22-35, 2006.

SANTOS, S.; KOK, F.; WELLER, M.; PAIVA, F.R.L.; OTTO, P. A. Inbreeding levels in Northeast Brazil: strategies for prospecting of new genetic disorders. **Gen Mol Bio.** 2010.

SCOTT, H. S.; ASHTON, L. J.; EYRE, H. J.; BAKERr, E.; BROOKS, D. A.; CALLEN, D. F.; SUTHERLAND, G. R.; MORRIS, C. P.; HOPWOOD, J. J. **Chromosomal localization of the human alpha-L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3.** Am. J. Hum. Genet. 47: 802-807, 1990.

SCOTT, H. S.; GUO, X.-H.; HOPWOOD, J. J.; MORRIS, C. P. **Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene.** Genomics 13: 1311-1313, 1992.

SHEN, M.R./ BATZER, M.A./ DEININGER, P.L. Evolution of the master *Alu* gene(s). **J Mol Evol.** 22?211-320. 1991.

- 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.
- SHRIVER, M. D.; SMITH, M. W.; JIN, L.; MARCINI, A.; AKEY, J. M.; DEKA, R.; FERRELL, R. E. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 4, p. 957-64, 1997.
- SILVA, H.P.; CARVALHO, C.R. Nossa Origem: o povoamento das Américas: visões multidisciplinares. Rio de Janeiro. Viera e Lent, p. 14, 2006.
- SILVA, M.C.F. Miscigenação e doença falciforme em Minas Gerais. **J. Hemominas** 26: 6. 2011.
- TELÓ, E.P. **Estimativa da mistura étnica avaliada por marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) e Microsatélites (STRs)**. Dissertação de mestrado. Ministério da saúde. FioCruz. Salvador. 2010.
- TERLATO, N. J.; COX, G. F. Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? A comprehensive review of the literature. **Genet Med**. 5 (4): 286-94. Review. 2003.
- VIEIRA, T. A. **História natural das mucopolissacaridoses: uma investigação da trajetória dos pacientes desde o nascimento até o diagnóstico**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre. 2007.
- VIEIRA, T.; SCHWARTZ, I.; MUÑOZ, V. Mucopolysaccharidoses in Brazil: what happens from birth to biochemical diagnoses. **American J of Med Genet**. V. 146. P. 1741-1747. 2008.
- VIJAY, S.; WRAITH, J. E. Clinical presentation and follow-up of patients with the attenuated phenotype of mucopolysaccharidosis type I. **Acta Paediatr**. 94 (7): 872-7. Julho, 2005.
- WATKINS, W. S.; HENKE, J.; MAKALOWSKI, W.; JORDE, L. B.; DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. Large-scale analysis of the Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity. **J Mol Biol**, v. 311, p. 17-40, 2001.
- WAUGH, R. Native Americans arrived in three great migrations across land bridge from Siberia 15,000 years ago. 2012 Disponível em: <<http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2172522/The-First-Americans-Humans-arrived-THREE-great-migrations-land-bridge-Siberia--DNA-differences-detected-today.html>>. Acesso em: 02/04/2017.
- WEBER, J.L.; DAVID, D.; HEIL, J.; FAN, Y.; ZHAO, C.; MARTH, G. Human diallelic Insertion/Deletion polymorphisms. **Am J Hum Genet** 71: 854-862. 2002.
- WIEZEL, C.E.V.; LUIZON, M.R.; SIMÕES, A.L. Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) em remanescentes de quilombos do Estado do Piauí. 54º Congresso Brasileiro de Genética. ISBN: 978-85-89109-06-2. 2008

WRAITH, J. E.; ROGERS, J. G.; DANKS, D. M. The mucopolysaccharidoses. **Aust. Paediat. J.** 23: 329-334, 1987.

WRAITH, J.E. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. **Arch of disease in childhood.** v. 72, p 263-267, 1995.

WRAITH, J.E; JONES, S. Mucopolysaccharidosis type I. **Pediatr Endocrinol Rev.** Sep;12 Suppl 1:102-6. 2014.

YANG, X.Y.; LI, Y.X.; LI, M.; ZHANG, L.; FENG, L.X.; ZHANG, N. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Lett.** 334(2):338-45. 2013.

APÊNDICE A – PARÂMETROS PARA PCR

Condições de PCR do marcador PV92:

Desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94°C a 40 segundos, anelamento a 55°C a 50 segundos, e alongação a 72°C a 1 minuto; com extensão final a 72°C a 7 minutos.

	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para 1 amostra
Água			8,67µl
Tampão IB	10x	1x	1,15 µl
dNTP	2,5mM	0,25mM	0,92 µl
Primer foward	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Primer reverse	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Taq	10U	1U	0,2 µl
DNA			1 µl
	volume final		12,5 µl

Condições de PCR do marcador APO4:

Desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida por 32 ciclos de: desnaturação a 94°C a 1 minuto, anelamento a 50°C a 2 minutos, e alongação a 72°C a 2 minutos; com extensão final a 72°C a 5 minutos.

	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para 1 amostra
Água			8,67µl
Tampão IB	10x	1x	1,15 µl
dNTP	2,5mM	0,25mM	0,92 µl
Primer foward	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Primer reverse	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Taq	10U	1U	0,2 µl
DNA			1 µl
	volume final		12,5 µl

Condições de PCR do marcador Sb19.3:

Inicia-se com 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 6 minutos e anelamento a 66°C por 2 minutos; seguida por 35 ciclos de: extensão a 72°C a 1 minuto, desnaturação a 94°C a 30 segundos, anelamento a 66°C a 1 minuto; com extensão final a 72°C a 10 minutos.

	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para 1 amostra
Água			6,45µl
Tampão IB	10x	1x	1,40 µl
dNTP	2,5mM	0,25mM	1,25 µl
Primer foward	10pmol	0,5mM	1,5 µl
Primer reverse	10pmol	0,5mM	1,5 µl
Taq	10U	1U	0,2 µl
DNA			1 µl
	volume final		13,3 µl

Condições de PCR do marcador CCR5:

Desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 94°C a 1 minuto, anelamento a 58°C a 1 minuto, e elongação a 72°C a 1 minuto; com extensão final a 72°C a 10 minutos.

	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para 1 amostra
Água			8,67µl
Tampão IB	10x	1x	1,15 µl
dNTP	2,5mM	0,25mM	0,92 µl
Primer foward	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Primer reverse	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Taq	10U	1U	0,2 µl
DNA			1 µl
	volume final		12,5 µl

Condições de PCR do marcador AT3-I/D:

Inicia-se com 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 6 minutos e anelamento a 54°C por 2 minutos; seguida por 35 ciclos de: extensão a 72°C a 1 minuto, desnaturação a 94°C a 30 segundos, anelamento a 54°C a 1 minuto; com extensão final a 72°C a 10 minutos.

	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume para 1 amostra
Água			8,67µl
Tampão IB	10x	1x	1,15 µl
dNTP	2,5mM	0,25mM	0,92 µl
Primer foward	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Primer reverse	10pmol	0,5mM	0,28 µl
Taq	10U	1U	0,2 µl
DNA			1 µl
	volume final		12,5 µl