



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

YORRAN HARDMAN ARAUJO MONTENEGRO

**ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE MATERNA EM PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I DA PARAIBA**

CAMPINA GRANDE – PB
2018

YORRAN HARDMAN ARAUJO MONTENEGRO

**ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE MATERNA EM PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I DA PARAIBA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

**CAMPINA GRANDE – PB
OUTUBRO 2018**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

M772a Montenegro, Yorran Hardman Araujo.
Análise de ancestralidade materna em pacientes com Mucopolissacaridose tipo I da Paraíba (manuscrito) / Yorran Hardman Araujo Montenegro. - 2018.
100 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.
"Orientação : Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."
1. Doenças genéticas. 2. Ancestralidade materna. 3. DNA mitocondrial. 4. Mucopolissacaridose. I. Título
21. ed. CDD 572 86

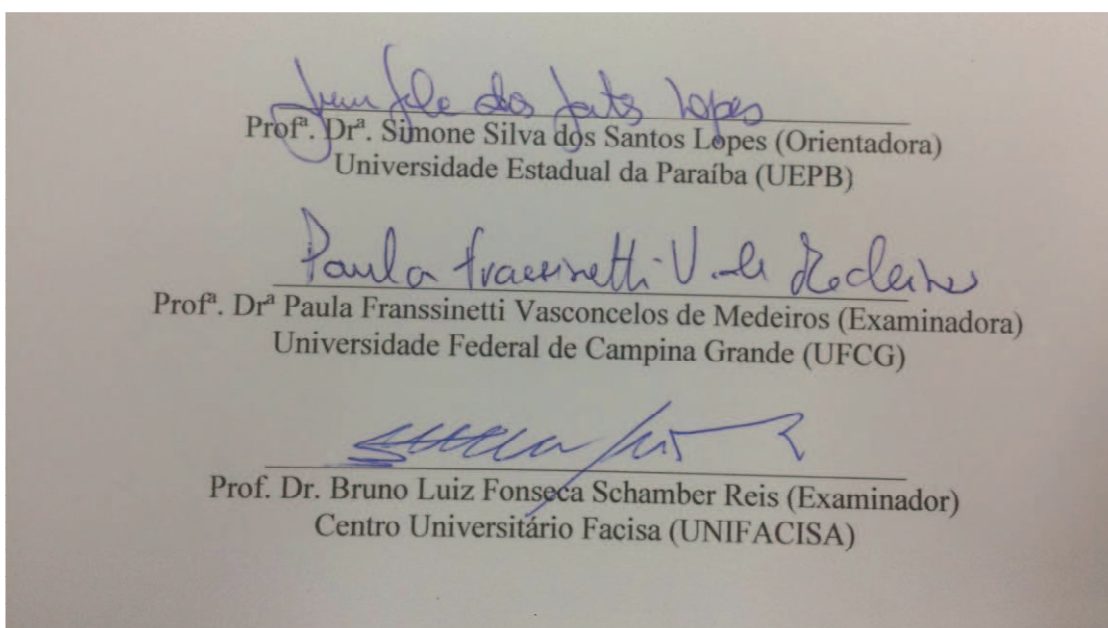
YORRAN HARDMAN ARAUJO MONTENEGRO

**ANÁLISE DE ANCESTRALIDADE MATERNA EM PACIENTES COM
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO I DA PARAIBA**

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

Aprovado em 30/10/2018

BANCA EXAMINADORA



A minha mãe e minha avó, primeiramente, pelo sonho realizado em mim. Aos meus pais por toda dedicação e paciência em todos esses anos de graduação. Aos meus avôs pelo suporte em momentos de crise. Aos meus colegas pelas maravilhosas experiências acadêmicas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos que colaboraram para o investimento científico, ao CNPq e a Universidade Estadual da Paraíba.

Ao Hospital Universitário Alcides Carneiro, na pessoa da Doutora Paula Franssineti por auxiliar no desenvolvimento da pesquisa; bem como aos pacientes que se disponibilizaram para doar o material genético contribuindo, desta forma, para o conhecimento científico.

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) pelo desenvolvimento deste e inúmeros outros trabalhos aos quais tive o prazer de fazer as minhas contribuições científicas.

A Universidade Estadual da Paraíba por me fazer ter desenvolvido o perfil profissional que hoje tenho, especialmente no enfrentamento das dificuldades, contribuindo para o desenvolvimento do Ser-Biólogo.

A professora Doutora Simone Lopes, por ser uma facilitadora na transmissão de seus conhecimentos científicos, no acolhimento quanto novo estagiário e nas oportunidades oferecidas para meu crescimento profissional. Por ter sido uma mãe científica encantadora e pela confiança depositada. Sempre tratarei todos esses momentos e sua pessoa com cordial e magnífico esforço em elucidar suas inúmeras qualidades.

As técnicas que passaram pela minha experiência acadêmica, Patrícia Rocha por me ensinar as primeiras instruções de Biosegurança e desenvolvimento de técnicas moleculares, Andeilma pelo cuidado em seu ambiente de trabalho, Silvana pelas conversas e pela motivação em períodos de insegurança. Além delas, não posso deixar de elucidar meus sinceros agradecimentos a todos os funcionários do Complexo Três Marias e técnicos dos laboratórios de pesquisas que auxiliaram no crescimento profissional.

Ao Criador, por me proporcionar todas as experiências de vida, todos os debates, todas as reflexões e toda a potencialidade de desenvolvimento pessoal. Sempre presente em minhas conversas e embates, dúvidas e desgastes, e, mais do que isso, atenuante em todo o meu desenvolvimento pessoal.

A meus pais, Adriana e Hardman Montenegro, por estarem sempre ao meu lado em minhas decisões profissionais, pela sua paciência, dedicação e auxílio em momentos

de angústia. Pela alegria de finalmente adquirir meu título e pelo estímulo por meu sucesso profissional.

Aos meus avós, Maria do Carmo e Pedro Rodrigues, pelo apoio em momentos de turbulência, pela benevolência de estarem presentes em todas as fases de sua vida, pelo cuidado e pelo amor em mim depositados.

Aos meus tios pelo alívio em momentos de tensão e pelas experiências e momentos que passamos juntos.

Aos meus colegas de laboratório que me auxiliaram em todos os momentos, Denise Queiroga, Eliene França, Mayla, Hugo Rêgo, Allisson Emanuel. Meus sinceros agradecimentos por todas as conversas, aprendizado e auxílio em momentos difíceis.

A Geilza Carla por todo o estímulo quanto ao meu lado acadêmico, por todas as publicações em congresso orientadas, por ter me dado a oportunidade de ser Coordenador do Curso Pré-Vestibular da Universidade Federal de Campina Grande, e por ser uma grande colega de auxílio em momentos bons e momentos turbulentos.

Aos meus amigos de caminhada acadêmica, Stephanie Evelyn, Estefany Gabriela, Laissa Karoline, Carlos Moreno, Matheus Gomes, Mary Help, Anderson. Muito obrigado por me proporcionarem uma caminhada acadêmica leve, divertida e compartilhada. Por todos os puxões de orelha, por todo o auxílio e por todas as risadas e choros.

Por chantagem emocional, dedico este parágrafo a Stephanie Evelyn por todos os momentos de fofocas e conversas.

A Yule Silva e Suellen Cavalcanti, por estarem comigo desde criança e me conhecendo tão bem. O sucesso de vocês é o meu sucesso também.

A Kevlyn Guedes, Rayssa Renaly e Maria Bárbara por estarem ouvindo todas as minhas conversas, pelos momentos de reflexão sobre minha vida profissional e pessoal, pela confiança depositada em mim e em meu sucesso.

A Doutora Vanessa Almeida, Doutor Thiago Fidelis, Doutor Marcos Lia Fook, Doutora Avany Gusmão, Doutor Joan Bruno, Doutora Shirley Rangel, Doutora Érika Caldas, Doutora Aline de Mamann, Doutor Thiago Oliveira, Doutora Karla Luna, por me presentarem com todos os conselhos no início da minha vida acadêmica. Meus sinceros agradecimentos.

Last but not least, a todos os que estiveram envolvidos comigo por todo o meu desempenho profissional, seja compartilhando um mesmo ambiente em sala de aula, seja contribuindo para minhas experiências acadêmicas, seja desenvolvendo meu lado

aguçado quanto ao conhecimento científico. A todos do passado e presente que contribuíram para o desenvolvimento científico e o desenvolvimento da genética. Muito obrigado.

E como sempre digo: PAZ, AMOR E BIOLOGIA.

“A VIDA SEM A CIÊNCIA É UM ESPÉCIE DE MORTE”

SÓCRATES.

RESUMO

As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças de depósito lisossômico (DL), caracterizadas pelo acúmulo intralisossômico de glicosaminoglicanos (GAGs), secundário à deficiência na atividade de uma enzima envolvida na degradação dessas moléculas. A mucopolissacaridose tipo I (Síndrome de Hurler) é uma doença recessiva bastante rara, autossômica. A doença é causada por um defeito no gene que codifica a enzima lisossomal-L -iduronidase (IDUA) que desempenha um papel importante em catalisar a degradação de sulfato de heparano (HS) e sulfato de dermatano (DS). Isto conduz ao acúmulo de GAG complexos não degradados ou parcialmente degradados em órgãos e tecidos do corpo, levando a diversas manifestações clínicas. O Brasil é conhecido como uma nação altamente diversa em etnias, com um nível acentuado de miscigenação, sendo a brasileira uma das populações mais heterogêneas do mundo por possuir a natureza tri-híbrida resultado de cinco séculos de intensa miscigenação entre europeus (os colonizadores), africanos (os escravos) e ameríndios (os habitantes nativos do Brasil). A heterogeneidade e a miscigenação dos brasileiros dentro e entre regiões geográficas tem importância clínica, e suas implicações contribuem para a concepção e interpretação de ensaios clínicos, na prática da genética clínica e medicina genômica, na implementação da farmacogenética, conhecimento na prescrição de medicamentos. Com intuito de responder questões sobre a presença de haplótipos de origem comum e ancestralidades dos pacientes com MPS I do estado da Paraíba. Identificou-se a ancestralidade dos pacientes com mucopolissacaridose I da Paraíba, através de marcador de linhagem materna (DNA mitocondrial). A ancestralidade materna observada nos pacientes apresentou 50% da contribuição ameríndia, 33,3% de contribuição europeia e 16,6% de contribuição africana. Estes dados são semelhantes aos encontrados na população brasileira em geral, refletindo o processo de formação do povo brasileiro, entretanto, não foi possível identificar um haplótipo fundador para estes pacientes associados a sua ancestralidade.

PALAVRAS-CHAVE: Mucopolissacaridose; MPS-I; População brasileira; Ancestralidade materna; DNA mitocondrial; IDUA.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidoses (MPS) are lysosomal storage diseases (DL), characterized by the intralysosomal accumulation of glycosaminoglycans (GAGs), secondary to deficiency in the activity of an enzyme involved in the degradation of these molecules. Type I mucopolysaccharidosis (Hurler syndrome) is a very rare, autosomal recessive disease. The disease is caused by a defect in the gene encoding the lysosomal-L-iduronidase (IDUA) enzyme that plays an important role in catalyzing the degradation of heparan sulfate (HS) and dermatan sulfate (DS). This leads to the accumulation of GAG complexes not degraded or partially degraded in organs and tissues of the body, leading to various clinical manifestations. Brazil is known as a highly diverse nation in ethnicities, with a marked level of miscegenation, with Brazil being one of the most heterogeneous populations in the world because it has the tri-hybrid nature resulting from five centuries of intense miscegenation among Europeans (colonizers) Africans (the slaves) and Amerindians (the native inhabitants of Brazil). The heterogeneity and the mixture of Brazilians within and between geographic regions is of clinical importance and its implications contribute to the design and interpretation of clinical trials, in the practice of clinical genetics and genomic medicine, in the implementation of pharmacogenetics, knowledge in the prescription of medicines. In order to answer questions about the presence of haplotypes of common origin and ancestralities of the patients with MPS I of the state of Paraíba. The ancestry of the patients with mucopolysaccharidosis I of Paraíba was identified through a maternal lineage marker (mitochondrial DNA). The maternal ancestry observed in the patients presented 50% of the Amerindian contribution, 33.3% of the European contribution and 16.6% of the African contribution. These data are similar to those found in the Brazilian population in general, reflecting the process of formation of the Brazilian people, however, it was not possible to identify a founding haplotype for these patients associated with their ancestry.

KEY-WORDS: mucopolysaccharidosis; MPS-I; Brazilian's population; Maternal ancestry; Mitochondrial DNA; IDUA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Movimentos migratórios dos grupos humanos.....	05
Figura 02 - Mapa do estado da Paraíba atual.....	08
Figura 03 - Mapa com a distribuição de haplogrupos do mtDNA.....	12
Figura 04 – Regiões do mtDNA.....	14
Figura 05 - Estrutura cristalizada da enzima α -L-iduronidase.....	21
Figura 06 – Pacientes com Síndrome de Hurler.....	25
Figura 07 - Localização dos pacientes e sua distribuição pelo estado da Paraíba.....	26
Figura 08 - Polimorfismo C150T no paciente MPS1.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Classificação das MPS de acordo com o subtipo, enzima afetada, gene e produto afetado.....	18
Tabela 02 - Níveis de expressividade da enzima α -L-iduronidase nos tecidos do corpo. O gráfito está demonstrado no eixo X os locais de extração das amostras e no eixo Y a expressividade da enzima.....	22
Tabela 03 – Quadro de mutações.....	24
Tabela 04 - Primers utilizados na pesquisa.....	28
Tabela 05 - Condições de amplificação das regiões HSV-I e HSV-II do mtDNA.....	29
.....	
Tabela 06 - Resultados referentes à quantificação das amostras de DNA por paciente.....	31
Tabela 07 - - Haplótipos encontrados na região HSV-I de cada paciente.....	32
Tabela 08 - Haplogrupos obtidos a partir dos polimorfismos encontrados associados às mutações em cada paciente.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
Acetil-CoA	Acetil coenzima-A
C	Citosina
EXO-I	Exonuclease I
G	Guanina
GAGs	Glicosaminoglicanos
H	Heavy
HSV-I	Região Hipervariável I
HSV-II	Região Hipervariável II
HSV-III	Região Hipervariável II
IPC	Instituto de Polícia Científica
L	Light
mM	MiliMol
min	Minuto
MPS-I	Mucopolissacaridose tipo I
MPS-II	Mucopolissacaridose tipo II
MPS-III	Mucopolissacaridose tipo III
MPS-IIIc	Mucopolissacaridose tipo III-C
MPS-IV	Mucopolissacaridose tipo IV
MPS-V	Mucopolissacaridose tipo V
MPS-VI	Mucopolissacaridose tipo VI
MPS-VII	Mucopolissacaridose tipo VI
MPS-VIII	Mucopolissacaridose tipo VIII
MPS-IX	Mucopolissacaridose tipo IX
mtDNA	DNA mitocondrial
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPKM	Leituras por milhões de quilobases (<i>Reads Per Kilobase Million</i>)
T	Timina
TBE	Tris/Borato/EDTA
U	Uracila
UV	Ultravioleta

V	Volts
v.	Versão

LISTA DE SÍMBOLOS

™	Trade Mark
μL	MicroLitro
nm	NanoMol
ng	NanoGramma
Kb	QuiloBase
Pb	Pares de Base
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Δ	Delta

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	17
2.0	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivo específico.....	19
3.0	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1	Evolução Humana.....	20
3.2	Povoamento da América.....	20
3.3	Formação do povo brasileiro.....	21
3.4	Colonização do Nordeste e formação da população paraibana.....	23
3.5	Marcadores Moleculares.....	24
3.5.1.	Marcadores de Linhagens.....	25
3.6	DNA Mitocondrial.....	27
3.7	Erros Inatos do Metabolismo.....	30
3.7.1	Doenças de depósito lisossômico.....	31
3.8	Mucopolissacaridoses.....	32
3.8.1	Mucopolissacaridose do tipo I.....	35
3.8.2	Aspectos epidemiológicos (MPS-I).....	36
3.8.3	Aspectos genéticos e moleculares (MPS-I).....	36
3.8.3.1	Gene <i>IDUA</i>	37
3.8.3.2	Mutações e frequências relativas.....	38
3.8.4	Aspectos clínicos (MPS-I).....	39
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	Local de estudo.....	42
4.2	Amostragem.....	42
4.2.1	Critérios de Inclusão e Exclusão.....	43
4.3	Aspectos Éticos.....	43
4.4	Extração do DNA.....	43
4.5	Quantificação.....	44
4.6	Amplificação do DNA.....	44
4.7	Sequenciamento das amostras.....	45
4.8	Análise de dados.....	46
5.0	RESULTADOS.....	47
5.1	Extração, amplificação e quantificação da região controle do mtDNA.....	47
5.2	Sequenciamento das Amostras.....	47
6.0	DISCUSSÃO.....	50
7.0	CONCLUSÃO.....	56
8.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
	APÊNDICE I.....	68
	APÊNDICE II.....	99

1. INTRODUÇÃO

A história evolutiva e de dispersão migratória humana a partir da África é um dos mais complexos caminhos ainda não compreendido em sua totalidade pela ciência moderna (QUINTANA-MURCI, 2016). Sabe-se que o mais recente território ocupado pelos hominídeos em suas peregrinações foi a América do Sul (SENE, 2013). Por volta do ano de 1500, novos processos migratórios voltaram a ocorrer nessa porção sul-americana, dando origem à caracterização tri-híbrida da nação brasileira – europeus, ameríndios e africanos (BONINI-DOMINGOS, 2009). Essa composição é um dos importantes indicativos da heterogeneidade genética da população brasileira, levando-se em consideração a caracterização de um padrão conspícuo de patologias genéticas associadas a esses processos migratórios (BONINI-DOMINGOS, 2009).

Os fatores genéticos associados à pré-disposição à herança de doenças complexas foi acentuada em pesquisas do último século. Esse interesse mescla-se entre a busca de fatores genéticos que tornam uma característica biológica distinta e o desenvolvimento de ferramentas necessárias na busca por polimorfismos pontuais (SMITHIES; WALKER, 1955; GUSELLA et al., 1983).

Nesse sentido, constata-se que a hereditariedade pressupõe um fator etiológico para a caracterização e determinação da natureza de enfermidades, sendo, pois, estas geralmente causadas por um ou poucos genes, muitas vezes associados a determinados perfis genéticos populacionais específicos quanto à sua composição gênica e polimórfica (LINS, 2007). Uma classe de patologias genéticas muitas vezes dependentes da composição genética populacional são os Erros Inatos do Metabolismo (EIM), que compreendem doenças geneticamente determinadas e costumeiramente herdadas de maneira autossômica recessiva (AR) – notamos sua ocorrência devido a um defeito enzimático específico. Elas caracterizam-se por um bloqueio em uma via metabólica, ocasionando o acúmulo de um substrato inicial, deficiência do produto da reação ou até mesmo o desvio da via metabólica com formação de outro produto final diferente do que deveria ser formado, gerando, assim, defeitos em pequenas ou grandes moléculas (ARAÚJO, 2004).

Dentre os EIM há um grupo de doenças denominadas doenças de depósitos lisossômicas (DDL) caracterizadas pelo acúmulo de produtos nos lisossomos, formando vários vacúolos intracelulares (GREINER-TOLLERSRUD; BERG, 2013). Neste grupo podemos encontrar a mucopolissacaridose (MPS), na qual ocorre um acúmulo

intra-lisossômico de Glicosaminoglicano (GAG), gerado pela deficiência na atividade em uma enzima envolvida na degradação desta molécula (WRAITH, 1995). Os fenótipos estabelecidos pela MPS variam de acordo com a enzima envolvida e o acúmulo de seu respectivo GAG, incluindo glicosidases e sulfatases similares (GREINER-TOLLERSRUD; BERG, 2013).

Dentre as classes de Mucopolissacaridoses (MPS), objetiva-se neste trabalho destacar a Mucopolissacaridose do tipo I (MPS-I), associada a mutações autossômicas recessivas em pelo menos 57 locais diferentes no gene IDUA (4p16.3), codificador da enzima α -L-iduronidase responsável por catalisar a reação que remove resíduos α -L-iduronato do sulfato de heparano e do sulfato de dermatano durante a degradação lisossômica (DUDEK; WILEY, 2009).

A MPS-I é uma desordem sistêmica progressiva, dividida clinicamente em três tipos de síndromes: Síndrome de Hurler, Síndrome de Hurler-Scheie e Síndrome de Scheie (CLARKE, 2008). Atualmente, a representação clínica voltou a dividi-la em apenas severa ou atenuada, dependendo da apresentação de sintomatologia clínica do paciente (PASTORES et al., 2017).

Para compreendermos como a heterogeneidade e a miscigenação do povo brasileiro pode alterar de forma concomitante a relação entre ancestralidade e perfis de mutações associados à MPS-I, se faz necessária à análise de marcadores genéticos herdados uniparentalmente, incluindo grupos não recombinantes do cromossomo Y e as sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) em populações atuais, objetivando-se entender o perfil de distribuição dessa patologia genética na população. A justificativa para o desenvolvimento deste trabalho é compreender a relação entre os genótipo-fenótipos dos pacientes com MPS-I associados à ancestralidade dos pacientes, para que dessa forma possamos compreender o mecanismo de manifestação da patologia com base na tríade genótipo-fenótipo-ancestralidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar a ancestralidade materna de pacientes com MPS-I do estado da Paraíba através da análise de marcadores moleculares (mtDNA) afim de determinar a sua origem ancestral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar os polimorfismos das regiões HSV-I e HSV-II do mtDNA dos pacientes para a verificação da ancestralidade materna dos mesmos;
- ✓ Estimar as frequências das linhagens mitocondriais ancestrais africanas, ameríndias e europeias dos pacientes com MPS-I;
- ✓ Verificar e determinar a frequência dos haplogrupos mitocondriais pertencentes ao grupo amostral estudado;
- ✓ Comparar os dados obtidos com os de outras populações.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Evolução Humana

A história evolutiva dos humanos modernos é muito mais complexa do que apenas um estudo do seu passado demográfico. Para compreendermos de forma intrínseca os processos migratórios dos nossos antepassados até a distribuição atual, faz-se necessário um entendimento a nível genético. A partir deste, as variações genotípicas das populações humanas servem de base para tentarmos conhecer os distintos processos de adaptação genética e sua relação com o meio circundante (QUINTANA-MURCI, 2016).

A partir da conquista de novos territórios pelo homem moderno desde a África – segundo teorias levantadas desde Seilstad e colaboradores (1999) –, expandindo-se territorialmente para a Ásia, Europa, Oceania e, por fim, Américas; houve uma diversificação morfológica e de caráter fenotípico resultante dos processos de adaptação às variações das condições climáticas, ambientais e tecnológicas, possibilitando, por exemplo, o estabelecimento da agricultura e abandono da cultura nômade (BARROS, 2006).

Um dos exemplos mais formidáveis quanto à caracterização do perfil genético populacional relacionado à constituição história no processo de colonização é o Brasil, localizado na América do Sul. E, mais curiosamente, como essa constituição é refletida no perfil genético dos brasileiros até mesmo na caracterização de determinadas patologias.

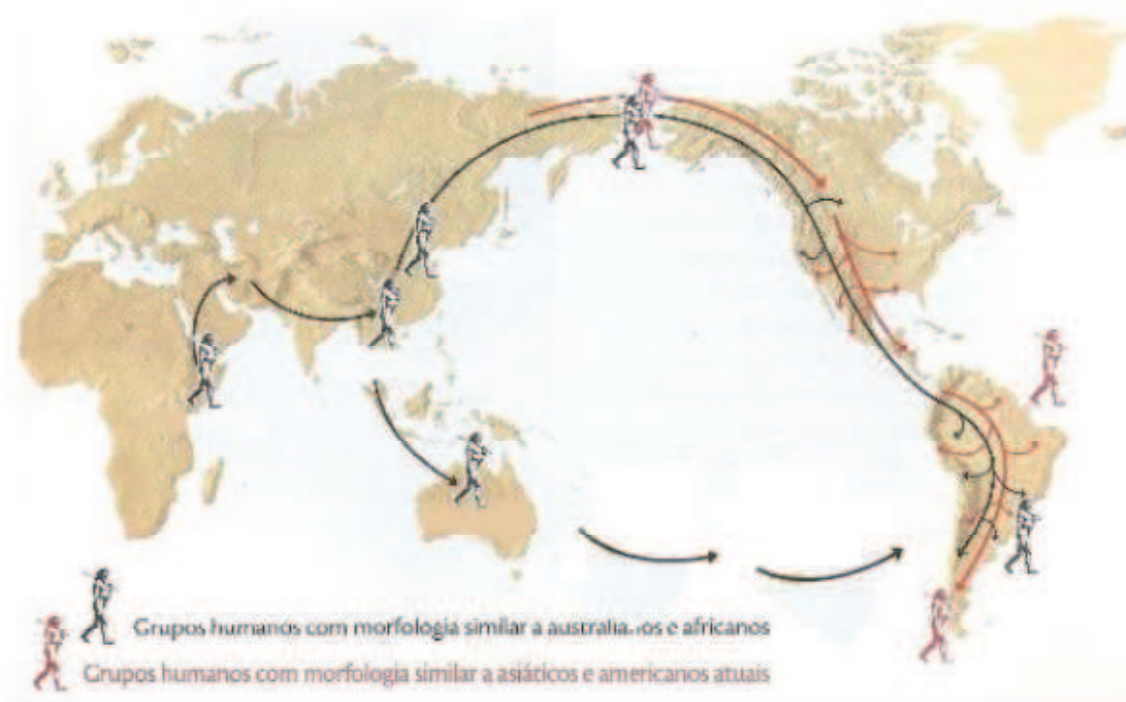
3.2. Povoamento da América

Para compreendermos como se deu o processo de formação do povo brasileiro, se faz necessário compreender, primeiramente, o processo de ocupação das Américas ocorrida por uma rota de dispersão feita pelos humanos a partir da África (Fig 01). Saindo da África, há uma dispersão de grupos humanos pelo continente asiático, estendendo-se em direção ao leste iberiano para, finalmente, alcançar a região do atual Estreito de Bering, podendo expandir-se nas Américas até então despovoadas. Um dos fatores que contribuíram para essa dispersão foi a última glaciação que ocorreu há cerca de 20 mil anos atrás, caracterizando perfis geológicos de captação de água pelas geleiras e baixa no nível global dos oceanos em cerca de aproximadamente 120 metros (REIS, 2008).

Uma enorme plataforma de gelo conectando a Sibéria e o Alasca foi formada; os baixos níveis oceânicos dos Beiring e Chukchi permitiram que houvesse as migrações para o Novo Mundo (VOLODKO et al., 2008).

Na Figura 01 podemos observar também rotas alternativas realizadas pelos homens modernos no processo de ocupação de novos territórios. Embora pouco discutidas, esses deslocamentos realizados pela costa do Oceano Pacífico e migrações provenientes da África via Oceano Atlântico também foram utilizados, comprovadas pelas evidências arqueológicas como uma ferramenta de compreensão a respeito desse processo (SENE, 2013).

Figura 1: Movimentos migratórios dos grupos humanos



(Fonte: adaptada de SENE, 2013)

3.3. Formação do povo brasileiro

Por volta do ano de 1500 d.C. com o advento das grandes navegações, Pedro Álvares Cabral desembarcou nas terras tupiniquins e deparou-se com uma população de aproximadamente 2,5 milhões de ameríndios. Após aproximadamente 34 anos pós-descoberta das terras brasileiras, imigrantes vindos da França, Holanda, espanhóis, e, principalmente, portugueses criaram uma rota migratória para o recém-descoberto Brasil (BARROS, 2006).

É sabido que o número aproximado de imigrantes alcançou um número expressivo de cinco milhões de novos imigrantes, com uma maior parte representada pelos portugueses, em segundo lugar encontravam-se os italianos, e seguido por estes as outras nações acima explanadas (PEDROSA, 2006; MACHADO 2012).

Com a residência fixa de alguns portugueses e imigrantes no Brasil, houve processos de miscigenação entre os povos, sendo um dos exemplos clássicos dos processos de miscigenação, a origem do chamado mameluco, uma mistura entre europeus e índios (FAUSTO, 1996).

Com os processos de exploração das novas terras, surge a necessidade de mão de obra. Como alternativa, os povos portugueses trouxeram da África uma nova constituição genética para o Brasil. No fim do período colonial houve uma significativa presença de africanos na colônia, representando cerca de 75% da população de Minas Gerais, utilizados na mão de obra para o garimpo, principalmente; 68% de Pernambuco, utilizados como mão de obra nos canaviais; 79% da Bahia e 64% do Rio de Janeiro – sendo Salvador e Rio de Janeiro os principais locais de ocupação territorial brasileiro no tempo colonial devido a sua representação como capital (FAUSTO, 1996; MACHADO, 2012). O encontro desses povos gerou novas miscigenações entre africanos e europeus, denominado mulato, e entre africanos e ameríndios, denominado cafuzo (FAUSTO, 1996). E então, finalmente, o Brasil atingiu seu ápice tri-híbrido conhecido hoje, com as três principais contribuições no seu perfil genético: Europeia, Africana e Ameríndia.

No século XIX houve um último grande evento imigratório com a abertura dos portos brasileiros às nações amigas. Outros fatos interessantes sobre essa heterogeneidade se dá pela inserção de judeus que habitavam Portugal por volta de 1509, trazendo consigo o cromossomo Y europeu (LOPES, 2007).

O primeiro grande trabalho realizado para a identificação desse perfil genético heterogêneo da população brasileira foi realizado por Pena (2002), identificando que a linhagem paterna dos indivíduos da população era quase que exclusivamente europeia, enquanto que a linhagem materna era constituída por africanos, europeus e ameríndios. Alves-Silva e colaboradores (2000) observaram que a linhagem materna da população brasileira é dividida principalmente em dois grupos: europeia (advinda dos processos de colonização portuguesa) e africana (advinda dos escravos africanos). Segundo, Carvalho-silva e colaboradores (2001), a linhagem paterna da população brasileira é constituída principalmente por uma contribuição europeia, e, distintas e ínfimas contribuições Italianas (parte sudeste do Brasil), Judeus marroquinos (Região

Amazônica), Holandeses (advinda das invasões do século 17 na costa Nordestina), e pequenas contribuições ameríndias e americanas.

A distribuição populacional foi interferida pelos processos migratórios, estendendo-se a área de ocupação nas terras brasileiras especialmente para o interior do país e povoando locais antes não habitados (MACHADO, 2012). Cada região brasileira foi marcada por distintos processos de povoamento, inferindo-se em diferentes momentos de colonização no território brasileiro (PENA et al., 2011).

3.4. Colonização do Nordeste e a formação da população paraibana

A instalação dos primeiros portugueses no Nordeste foi realizada nos Estados da Bahia (com a chegada das primeiras embarcações em Porto Seguro) e de Pernambuco, em 1516 sob a proteção de Cristóvão Jaques (MELLO, 2009). Como uma forma de melhorar a administração da colônia, Portugal dividiu o território brasileiro nas conhecidas capitanias hereditárias; sendo a Paraíba uma delas, entregue como um todo a Itamaracá em 1532 para o cultivo e exportação de cana-de-açúcar e algodão, conhecida como a capitania Rio Paraíba (PÁDUA, 2004; MELLO, 2009). Por volta do ano de 1585, com a fundação da cidade Filipéia da Nossa Senhora das Neves, o território paraibano foi oficialmente passado ao domínio português (MOREIRA et al., 2003).

Para que esse processo ocorresse, foi necessário um grande embate, especialmente pela presença de ameríndios que se familiarizaram com os franceses já presentes nas terras que hoje são pertencentes à Paraíba e permitiam a exploração de suas terras por estes (PÁDUA, 2004). Como forma de contornar esse episódio, os portugueses articularam conflitos entre os povos indígenas, especialmente entre os Potiguaras (familiarizados com os franceses) e os Tabajaras, a fim de conquistar o domínio das terras potiguaras e estabelecer residência. Os conflitos indígenas resultaram em uma expulsão dos potiguaras para as terras em que hoje está situado o Rio Grande do Norte e a baixa na presença francesa nas terras recém-conquistadas pelos povos portugueses (RIBEIRO, 1995).

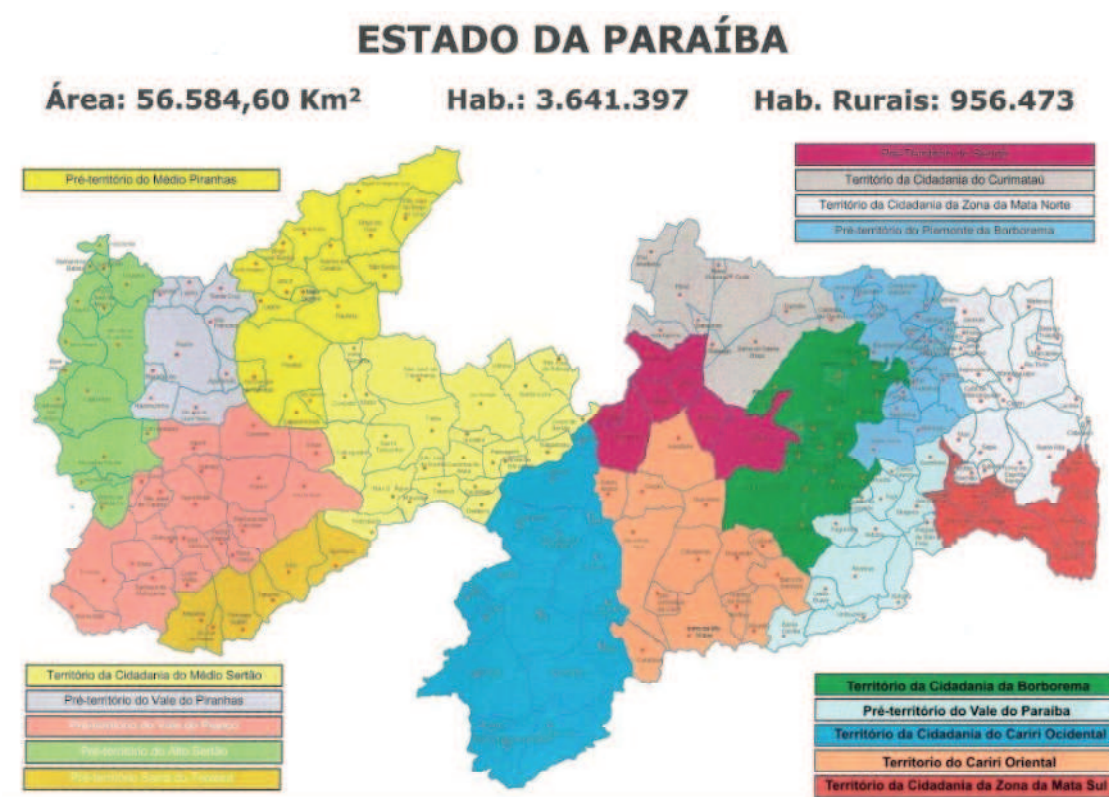
É sabido que as contribuições genéticas da Paraíba especialmente a materna são de nativas ameríndias e a paterna principalmente europeia, mais uma vez alinhando os padrões históricos e genéticos em uma formação de perfil genético característico para o território (DANTAS; 2016).

Com o passar dos anos, a cidade pioneira de Nossa Senhora das Neves recebeu novos nomes: Frederica (1634), Parahyba (1654), e, por fim, João Pessoa em 1930. Os

primeiros municípios criados com o ciclo agrícola foram: João Pessoa, Mamanguape, Areia, Brejo Paraibano, Piancó de Pombal (MOREIRA et al., 2003; GOVERNO DA PARAÍBA, 2016).

Atualmente, segundo o IBGE (2010), a Paraíba (Fig. 02) possuía uma população com 3.766.528 pessoas, com uma densidade demográfica de 66,70 habitantes por quilômetro quadrado até 2010. Hoje, o mesmo órgão estipula que a população paraibana tenha passado da margem de 4 milhões de pessoas. A distribuição da população é feita pelos mais de 223 municípios em uma área total de 56.584,6 km².

Figura 2: Mapa do Estado da Paraíba atual.



(FONTE: <https://ccaufpb.wordpress.com/2010/06/18/conselho-estadual-de-desenvolvimento-rural-sustentavel-homologa-novo-mapa-territorial-para-o-estado-da-paraiba/>)

3.5. Marcadores Moleculares

Para compreensão desses processos dentro da estrutura populacional foi essencial o advento dos marcadores clássicos baseados em perfis proteicos e sorológicos na década de 80 (LI et al., 2017).

Uma das maiores ferramentas utilizadas hoje na compreensão desses processos são os denominados SNP ou Polimorfismos de Nucleotídeo Único. Por ser o tipo mais

comum de variação genética dentro de uma população, acaba tornando-se um importante mecanismo para a compreensão genética, quer seja de doenças, quer seja histórica e evolutiva de um indivíduo. Para tanto, existe hoje uma associação denominada *Genome Wide Association Studies* (GWASs) responsável por montar um banco de dados sobre a correção de doenças e SNP (LI et al., 2017).

Nos últimos anos houve um maior enfoque para a identificação da frequência de SNPs nas populações humanas. Um dos maiores destaques quanto a reunião desses dados e caracterização desse perfil de frequências foi *International HapMap Project* que desenvolveu uma *database* com as variações e frequências de SNP dentro do genoma humana através de uma mapa de haplotipos.

A partir dessa reunião de informação em massa, pode-se perceber que as mutações dentro do genoma humano ocorriam por vários fatores, quer seja por seleção natural, ou pelo local demográfico que os indivíduos dessas populações encontravam-se, possibilitando modular a variabilidade local de uma população e proporcionar uma ferramenta para o estudo de tal (LEE, 2016).

Houve então o estabelecimento das frequências alélicas dentro das populações, inferindo sobre o possível ancestral comum destes. Hoje, temos uma diversidade imensa de marcadores utilizados na distinção entre as populações mundiais que auxiliam na compreensão da construção populacional, processos migratórios e, principalmente, uma melhor compreensão de patologias associadas às populações (KIDD et al., 2014).

Surgem, assim, as análises e correlações entre patologias e populações, susceptibilidade a doenças, e, sem dúvida, uma melhor compreensão a cerca destes processos migratórios, evolutivos e construção populacional: surge, então, o estudo com os Marcadores de Linhagem.

3.5.1. Marcadores de Linhagens

Para uma melhor compreensão dos processos de migração, colonização e ocupação geográfica, surgiu a necessidade de ferramentas que fossem utilizadas nessas análises, sendo selecionados os candidatos preferenciais: o cromossomo Y e o mtDNA, advindos, respectivamente, da patrilinearidade e matrilinearidade (PENA et al., 2000).

Uma das características que os evidenciaram como marcadores de linhagem foi a não-recombinação com outros segmentos genômicos, garantindo uma transmissão acurada dos chamados “blocos de genes”. Tais blocos são constituídos por haplótipos,

um conjunto de alelos ou sequências variantes de *locus*, utilizados para as designações geográfico-específicas a partir das análises de frequências do SNP (MORAIS, 2013).

Na Figura 03 podemos observar a distribuição dos haplótipos nas populações quanto às informações provenientes do mtDNA (CHARLES KERCHNER'S, 2006). Observa-se que o macrogrupo L ramificou-se em sete haplogrupos, onde o haplogrupo L0 é o mais próximo do mais recente ancestral comum, denominado de Eva Mitocondrial (KONG, 2011). A partir do haplogrupo L3 houve uma ramificação nos haplogrupos M e N presentes respectivamente na Ásia e na Europa. O haplogrupo N saiu da África e ramificou-se em nove outros haplogrupos, denominados H, I, J, K, T, U, V, W e X constituindo o super-haplogrupo R, ou seja, um haplogrupo que possui em sua constituição um grande número de ramificações (SANTOS et al., 2012a; SANTOS et al., 2012b). Este super-haplogrupo formado, possui três principais haplogrupos europeus denominados R0, JT e V que constituem cerca de 98% da população europeia (KONG, 2011). O haplogrupo M, por sua vez, ramificou-se nos haplogrupos C, D, E, G e Z característicos das populações Asiáticas e da Oceania (KONG, 2011). Observa-se que há um alinhamento entre a história contada pelos dados moleculares e os registros arqueológicos, corroborando de forma essencial com a distribuição histórica das populações (SENE, 2013).

É sabido que as populações asiáticas alcançaram o continente Americano antes da chegada dos europeus. Percebeu-se que, majoritariamente, a distribuição dos haplogrupos A, B, C, D e X para o continente americano. No entanto, vale ressaltar que, esses haplogrupos encontrados nas populações ameríndias sofreram processos de mutações adaptativas específicas da população, levando-os a diferenciação quanto ao perfil gênico dos haplogrupos asiáticos (KUMAR, 2011).

Quando atentamos a população sul-americana, pode-se observar um aumento gradativo das frequências predominantes dos haplogrupos C e D (KONG, 2011). Conquanto, o haplogrupo B está ausente nas populações norte-americanas, e constantemente presente nas demais regiões centro- e sul-americanas (PRADO, 2002).

A partir da identificação dos haplogrupos e sua distribuições entre as populações, foi possível traçar a rota evolutiva e migratória das populações modernas, uma vez que se estabeleceu um encontro corroborativo entre os estudos arqueológicos e os perfis polimórficos do mtDNA. Uma das grandes conquistas desse perfil populacional foi a maior compreensão acerca comportamento populacional de patologias genéticas (dentre elas, a MPS-I), uma vez que o maior entendimento dos

perfis de distribuição populacional de algumas mutações relacionadas a essas patologias pode auxiliar em medidas terapêuticas, com as chamadas terapias gênicas ou terapias de reposição enzimática (TER) (MONTENEGRO; LUNA, 2017).

3.6. DNA Mitochondrial

As mitocôndrias são organelas esféricas ou, mais frequentemente, alongadas, formadas por duas unidades de membrana constituídas por fosfolipídeos, uma interna mais fina formando uma série de invaginações denominadas de cristas e uma externa mais densa (ALBERTS et al., 2010). Há um espaço interno dentro da organela, denominado de matriz mitocondrial limitado pela membrana interna que contém as cópias do mtDNA, RNA transportadores, ribossomos mitocondriais e várias enzimas responsáveis pela quebra de moléculas de ácidos graxos e carboidratos para a produção de calor e ATP usados na célula para a realização de várias atividades (JUNQUEIRA&CARNEIRO, 2005).

Em 1981 houve o primeiro sequenciamento do genoma mitocondrial humano realizado por Anderson e colaboradores, o qual seu resultado é conhecido hoje como: Sequência Referência designada por *Cambridge Reference Sequence*. Em 1999, Andrews e colaboradores corrigiram onze nucleotídeos e alteraram o nome para *Revised Cambridge Reference Sequence* (MORAIS, 2013).

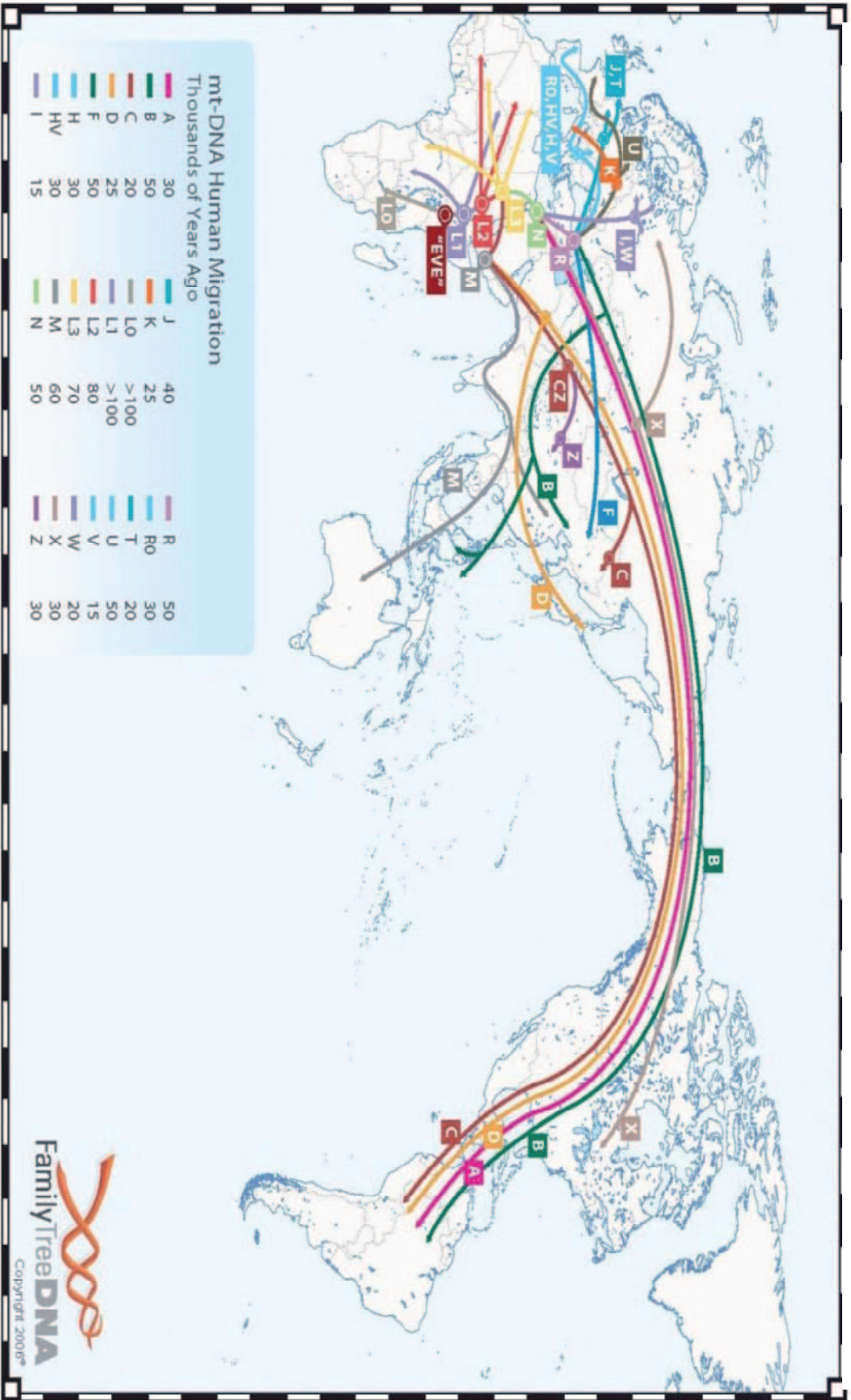


Figura 3 : Mapa com a distribuição de haplogrupos do mtDNA.

FONTE: CHARLES KERCHNER'S - mtDNA Haplogroup Descriptions & Information Links, 2006 <<http://www.kechmer.com/haplogroups-mtDNA.htm>>
Acessado em: 24/03/2018

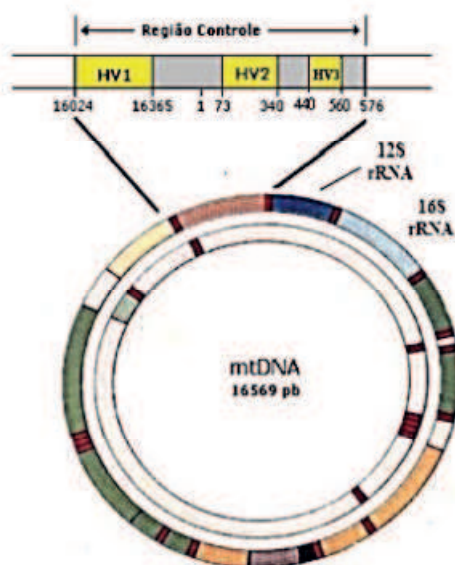
Entre as propriedades observadas pelos pesquisadores, o mtDNA foi caracterizado como uma herança estritamente materna. Dentre suas principais características relevantes podemos citar: i) elevada taxa de mutação; ii) ausência de recombinação, garantindo uma característica única a esse material genético; iii) é haploide, possuindo, dessa forma, uma taxa de mutação de aproximadamente 20 vezes maior que o DNA nuclear – especialmente por não possuírem um sistema de reparo tão eficiente quanto o nuclear, implicando dizer que as mutações ocorridas dentro deste material genético são acumuladas de forma cronológica dentro das linhagens maternas, tornando-se, assim, uma fonte de informações para o estudo de filogenia molecular, especialmente para informações relativas aos grupos humanos, sendo possível uma reconstrução de linhagens genealógicas com ênfase nos fatores históricos (BUTLER, 2011; MAGALHÃES&SILVA, 2006; PRADO&ALVES-SILDA, 2002).

O genoma mitocondrial é composto por uma molécula de fita dupla circular, com uma distribuição assimétrica de guaninas e citosinas, apresentando um total de 16.596 pares de bases (pb). Nessa distribuição, pode-se caracterizar a molécula de mtDNA em uma cadeia pesada (H-heavy) rica em purinas e uma cadeia leve (L-light) rica em pirimidinas. Uma das características mais interessantes desse material genético é a ausência de regiões de íntrons (BUTLER, 2011; SANTOS, 2012a).

O mtDNA pode ser subdividido em duas regiões principais: 1) A região codificadora, que constitui cerca de 90% da molécula, com um total de 37 genes. Destes genes, 13 deles codificam polipeptídeos envolvidos na fosforilação oxidativa, 2 genes que codificam o RNA ribossômico e 22 genes que codificam RNA de transferência; 2) A região não-codificadora, também conhecida como D-loop (*Displacement loop*), envolvida na replicação e transcrição do mtDNA (Fig. 04). Essa região corresponde a uma porção de 1122 pb e é o principal local de controle para a expressão do mtDNA, iniciando, como dito anteriormente, o processo de replicação pela cadeia pesada de forma bidirecional e assíncrona (DAUD et al., 2014; ANDERSON et al., 1981).

A numeração das cadeias do genoma mitocondrial inicia-se na região controle próximo da origem de replicação, nas posições 16024 a 16569, e posições 1 a 576. Nessas posições encontramos regiões denominadas de segmentos hipervariáveis (Fig. 03b). Esses segmentos são divididos em três: A região HSV-I que compreende as posições 16024 a 16365, a região HSV-II que compreende as posições 73 a 340, e, por fim, a região HSV-III que corresponde às posições 430 a 576 (ANDERSON et al., 1981).

Figura 4: A) Regiões do mtDNA. Com destaque, podemos ver a região não-codificadora denominada de D-loop e os segmentos codificadores do RNA ribossômico. Percebe-se que a maior parte das regiões codificam genes para a participação dos processos de fosforilação oxidativa.



(FONTE: <<https://3c1703fe8d.site.internapcdn.net/newman/gfx/news/hires/2015/mitochondria.png>>
Acessado em: 24/03/2018)

As mutações genéticas detectadas no mtDNA são susceptíveis aos efeitos de deriva genética em diferentes populações, sendo essencial o estudo das regiões controle, uma vez que nelas estão a maior ocorrência de mutações ao longo do tempo, caracterizando o seu nome como *hipervariável* (MAGALHÃES&SILVA, 2006).

3.7. Erros Inatos do Metabolismo

O termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM) foi proposto em 1908 por Sir Archibald Garrod a partir de estudos realizados em pacientes portadores de alcaptonúria, pentosúria, albinismo e cistenúria, com o intuito de caracterização dessas patologias. Uma das características primordiais que chamou a atenção do pesquisador foi a concentração irregular de metabólitos no organismo. Essa concentração alterada adivinha da inexistência ou até mesmo da não eficácia de uma enzima no ciclo metabólico (SAÍNZ&MONTEAGUDO, 2002; BICALHO, 2015).

Nos Estados Unidos da América, a ocorrência de nascimentos com este perfil EIM é menor de 1:100.000 indivíduos nascidos vivos. Entretanto, no Reino Unido, a ocorrência de nascidos vivos com esse perfil patológico alcança um quadro estimativo de 20:100.000 nascidos vivos (AHRENS-NICKLAS et al., 2015).

A maioria dessas patologias é caracterizada por um perfil AR geralmente incidente em famílias com histórico de união entre indivíduos consanguíneos, aumentando a susceptibilidade da prole com EIM (MENNI et al., 2012). Um perfil genético raro é o de característica autossômica dominante (AD), nos quais os pais possuem 50% de chance de transmitir o alelo multado a prole, no entanto, há casos de ocorrência de mutações *de novo* em alguns pacientes com perfis AD, resultando em uma perda de função, afetando diretamente a atividade proteica (WERTHEIM-TYSAROWSKA et al., 2015).

Os EIM são subdivididos em três grupos distintos: 1) EIMs que causam intoxicação devido aos defeitos em vias metabólicas intermediárias, resultando em uma acumulação de componentes tóxicos e posterior bloqueio metabólico; 2) EIMs que resultam em uma deficiência energética, especialmente as que causam defeitos na cadeia respiratória mitocondrial; e, por fim, 3) EIMs que resultam em defeitos na síntese ou catabolismo de moléculas complexas em certas organelas celulares como, por exemplo, as doenças de depósitos lisossômicos (DDL) (EL-HATTAB, 2015).

3.7.1. Doenças de Depósitos Lisossômicos

As DDL incorporam um grupo de EIM com mutações que podem estar presentes em mais de 50 genes diferentes, que caracterizam 50 doenças genéticas distintas, resultante de produtos defeituosos que se acumulam dentro da organela comprometendo o funcionamento da célula como um todo, bem como da atividade catalítica da própria organela (BELLETTATO et al., 2018).

Embora raras, a frequência de incidência de DDL variam em uma estimativa de 1 a cada 4.000 ou 9.000 indivíduos nascidos vivos, no entanto, estima-se que o número de casos pode ser ainda maior, especialmente porque os sintomas mais característicos do perfil patológico de DDL sejam percebidos quando a criança já está com uma média de 8 a 10 anos de idade (EL-HATTAB, 2015). Entre essas manifestações podemos citar, como exemplo, o declínio neurocognitivo, dismorfia e anormalidades musculoesqueléticas (KINGMA et al., 2015).

Faz-se necessário ressaltar que as manifestações clínicas são o resultado acúmulo do produto específico na organela, além dos locais de produção e degradação dos resíduos metabólicos, podendo, dessa forma, as DDL serem classificadas como: esfingolipidoses, oligossacaroses, mucopolisacaridoses, lipofuscinoses, glicoproteinoses e, finalmente, MPS (KADALI et al., 2004).

3.8. Mucopolissacaridose

Como objetivo do presente trabalho, destaca-se a MPS, um distúrbio que afeta a atividade enzimática utilizada na degradação de GAG. Esses GAG são polissacarídeos utilizados na constituição óssea, cartilágnea, epidérmica e diversos outros tecidos do corpo. Quando há um defeito enzimático em sua rota metabólica, não ocorre a degradação, resultando em um acúmulo lisossomático responsável pelas manifestações musculoesqueléticas dos pacientes com MPS (GURANY, 2011).

Em 1917, o doutor Charles D. Hunter diagnosticou pela primeira vez a MPS em dois irmãos que apresentavam baixa estatura, respiração ruidosa, mãos em garra, rostos infiltrados, hepatoespleniomegalia e hérnia inguinal (BICALHO, 2015). Mais tarde, por volta da década de 50, surge a inovação dos diagnósticos bioquímicos e moleculares, diagnosticando aquele caso passado no que hoje conhecemos como MPS tipo II ou Síndrome de Hunter, em homenagem ao seu descobridor (BICALHO, 2015).

Sabe-se que as MPS constituem um grupo heterogêneo de DDL, hereditárias, caracterizadas pelo funcionamento inadequado ou até mesmo a ausência de enzimas lisossomais necessárias para a hidrólise de GAG, anteriormente conhecido como mucopolissacarídeo (fato que levou a denominação da doença) (GURANY, 2011). Uma vez não efetuado a degradação de forma correta para esses substratos, há o acúmulo destes na organela celular influenciando o seu funcionamento e posteriormente o funcionamento da própria célula (VIEIRA et al., 2008).

Os GAG são importantes componentes do tecido conjuntivo conectivo, produzidos e estocados na superfície celular ou matriz extracelular, podendo estar associados a proteínas, formando uma molécula maior denominada proteoglicano ou moléculas livres em formas monoméricas (DANTAS, 2016). Essa macromolécula de proteoglicano controla o fluxo de água e nutrientes para a célula, uma vez que, quando em contato com a água, adquirem uma consistência diferenciada que auxilia na hidratação e união dos tecidos do corpo (LIMA, 2009).

Na matriz extracelular, essas macromoléculas de proteoglicanos são degradadas, gerando como produto: GAG (seus monômeros), e ácido hialurônico (GURANY, 2011). Os GAG são transportados aos lisossomos onde sofreram a digestão intracelular. Dentro da organela, são possíveis quatro rotas de digestão dependendo das moléculas que constituem os GAG, no entanto, para serem completamente digeridos é necessária a

ação enzimática de dez enzimas diferentes, entre elas estão a atividade catalítica de glicosidases, sulfatases e transferases (COUTINHO et al., 2011).

A classificação quanto às MPS ocorre a partir do defeito enzimático na rota de degradação e do produto acumulado no plasma lisossomal (MUENZER, 2011). Na Tabela 01 podemos ver a classificação quanto aos tipos de MPS e o acúmulo lisossomal pertinente.

As manifestações clínicas para MPS são variáveis e comprometem diversos órgãos. Os quadros crônicos e progressivos, especialmente o comprometimento músculo-esquelético, alterações na fisionomia facial, deficiência intelectual, displasia esquelética resultantes de mau funcionamento celular, dentição anormal, opacificação das córneas, retinoplastia, déficit auditivo, cardiopatia, infecções respiratórias recorrentes, mão em garra e diversas outras manifestações vistas na literatura, compõem um quadro totalmente heterogêneo (NEUFELD&MUENZER, 2001).

Segundo a rede MPS Brasil, coordenado pelo Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas em Porto Alegre (HCPA), até dezembro de 2012 foi registrado 1001 pacientes brasileiros diagnosticados com algum tipo de MPS, sendo 195 com MPS-I, 300 com MPS-II, 137 com MPS-III (subdividindo-se nas ramificações sendo: IIIa – 38 pacientes; IIIb – 70 pacientes, IIIc – 29 pacientes), 124 com MPS-IV (116 com MPS-IVa e 08 com MPS-IVb), 223 pacientes com MPS-VI e 12 com MPS-VII (BOCHERNITSAN, 2013).

Os pacientes diagnosticados com MPS podem ser submetidos a TRE que retardam a progressão da doença, melhorando as anormalidades sistêmicas e proporcionando uma melhor qualidade de vida para os pacientes (SCHUH et al., 2017). No Brasil, os únicos tipos que possuem TRE são as MPS I, II, IVa e VI (DANTAS, 2016).

Segundo Giugliani e colaboradores (2017), dentre as DDL mais comuns encontradas no Brasil, a MPS-I encontra-se em quarto lugar, com 225 casos diagnosticados no Brasil, ocupando o terceiro tipo mais frequente de MPS no território brasileiro com 19% dos casos diagnosticados no país. No Nordeste, do total de 572 diagnósticos de DDL, 55 encontra-se na Paraíba, o quarto estado com maior incidência no Nordeste, precedido por Ceara, Bahia e Pernambuco (GIUGLIANI et al., 2017).

Tabela 1: Classificação das MPS de acordo com o subtipo, enzima afetada, gene e produto afetado.

PATOLOGIA	SUBTIPO	ENZIMA DEFICIENTE	GENE	GAG AFETADO
MPS-I	Hurler (H)	α -L-iduronidase		
	Hurler-Schie (H/S)	α -L-iduronidase	IDUA 4p16.3	Dermatan e Heparan sulfato
	Schie (S)	α -L-iduronidase		
MPS-II	Hunter	Irudonato sulfatase	IDS Xq28	Dermatan e Heparan sulfato
MPS-III	A	Heparan-N-sulfatase	SGSH 17q25.3	
	B	α -N-acetilglicosaminidase	NAGLU 17q21	
	C	Heparan acetil-CoA α -glicosaminidase	HGSNAT 8q11.1	Heparan sulfato
	D	N-acetiltransferase N-acetilglicosamina 6-sulfatase	GNS 12q14	
MPS-IV	Morquio A	Galactose 6-sulfatase	GALGANS 16q24.3	Keratan e codoitrin sulfato
	Morquio B	β -galactosidase	GLB1 3p21.33	Keratan sulfato
MPS-V	A princípio Síndrome de Schie, depois descobriu-se uma deficiência na α -L-iduronidase e perfis de deficiência alélica como na Síndrome de Huler.			
MPS-VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilglicosamina-4-sulfatase	ARSB 5p11-q13	Dermatan sulfato
MPS-VII	Sly	β -glucuronidase	GUSB 7q21.11	Dermatan, keratan e codoitrin sulfato.
MPS-VIII	Utilizado para diagnosticar um paciente com deficiência de glicosamina-6-sulfato com características clínicas para a Síndrome de Morquio e Sanfilippo. O relatório foi posteriormente constatado e o termo não é mais utilizado.			
MPS-IX	Natowicz	Hialuronidase	HYAL 3p21.3	Ácido Hialurônico

(FONTE: DANTAS, 2016)

3.8.1. *Mucopolissacaridose tipo I*

A MPS-I é uma doença de herança AR, causada pela deficiência total ou parcial da enzima α -L-iduronidase (IDUA) que resulta em um comprometimento da degradação do heparan e dermatan sulfato, ocasionando um acúmulo desses substratos de forma intramembranar nos lisossomos. Como resultados fenotípicos e manifestações clínicas se podem citar as alterações multissistêmicas como opacificação da córnea, alterações musculoesqueléticas, contraturas musculares, hepatoesplenomegalia e padrão facial típico (CLARKE&HEPPNER, 2011).

Geralmente, os sintomas aparecem numa idade relativa de dois e dez anos de idade, quando se inicia de forma acentuada o acúmulo de GAG (GREINER-TOLLESRUUD/ BERG, 2013). A MPS-I pode ser classificada em Síndrome de Hurler, Síndrome de Hurler-Scheie e Síndrome de Scheie, ou de acordo com sua manifestação clínica: formas atenuadas e graves. Na forma *atenuada*, os pacientes tem um desenvolvimento psicomotor normal nos primeiros dez anos de vida, demonstrando quadros progressivos de desabilidades cognitivas ao passo em que se tornam mais velhos. Os portadores da forma *grave* de MPS-I possuem desordens múltiplas, perda auditiva, desabilidade intelectual e desenvolvimento psicomotor anormal durante os primeiros anos, levando ao óbito na primeira década de vida (MELBOUCI et al., 2018).

A forma com que a doença progride se dá pelo substrato acumulado de GAG de forma intracelular (afetando os lisossomos e organelas do perímetro), estendendo o dano a matriz extracelular¹, e refletida fenotipicamente, por exemplo, na baixa estatura dos portadores, ocasionada pelos danos sistêmicos durante o crescimento esquelético (PECK et al., 2016).

As alterações na forma grave aparecem com cerca de seis meses de vida, dentre elas estão à macrocefalia, hérnias, mobilidade limitada do quadril, respiração ruidosa e infecções frequentes nas vias respiratórias. Nos outros casos atenuados, o início dos sintomas se dá aos cinco anos de idade e a maioria dos diagnósticos se dá entre os 10 e 20 anos de idade (SMITH, 1988).

Vale a pena mencionar que o diagnóstico precoce e acurado é um ponto crítico, especialmente no que se diz respeito a uma terapia eficaz específica para a doença.

¹ O acúmulo do substrato influencia em inúmeras vias metabólicas utilizadas nos padrões de distribuição dos fatores de crescimento durante os processos de diferenciação celular e resposta imune inata.

Quando não diagnosticado precocemente, as chances de uma boa sobrevida são críticas (GIUGLIANI et al., 2010)

3.8.2. Aspectos Epidemiológicos (MPS-I)

A MPS-I apresenta uma incidência variável: Em Portugal, por exemplo, a estimativa é de 2,7:100.000 nascidos vivos; na Irlanda apresenta uma incidência de 1,6:100.000 nascidos vivos, chegando próximo dos 1,7:100.000 no Reino Unido; na Alemanha, a incidência chega a 1:145.000 nascidos vivos – uma das frequências mais baixas, perdendo apenas para a Tunísia com uma incidência de 0,63:100.000; finalmente, no Brasil, a incidência para portadores de MPS-I chega a 1:106.000 nascidos vivos (GIUGLIANI et al., 2017).

A diferença da incidência da doença em algumas populações pode ser explicada pela composição do perfil genético populacional, uma vez que essa construção se deu através de eventos evolutivos distintos, demografia e processos migratórios. Em um trabalho realizado por Chkioua e colaboradores (2011) na Tunísia foi relatada a associação entre os pacientes com MPS-I e consanguinidade. Um dos principais fatores que garante, de certa forma, uma menor variabilidade genética dentro de uma população são os chamados casamentos endogâmicos que resultam em uma maior taxa de características recessivas dentro de um grupo, gerando um acúmulo de características – resultantes de baixas taxas de variabilidade genética – que podem resultar em doenças genéticas (MACHADO, 2012). Estudos recentes revelam uma associação, dependendo do grupo ou região geográfica específica, entre ancestralidade e a ocorrência de determinadas doenças genéticas, elevando o risco de susceptibilidade a determinadas doenças, sendo um dos exemplos mais comuns os EIM (MACHADO, 2012; HABER et al., 2011).

3.8.3. Aspectos Genéticos e Moleculares (MPS-I)

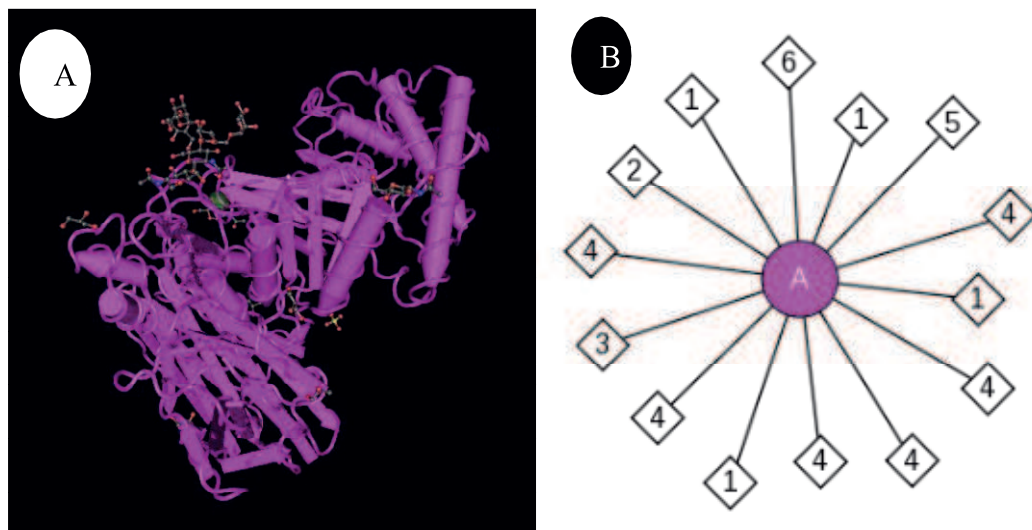
Para uma melhor compreensão dos efeitos causados pelas mutações que caracterizam o quadro patológico de MPS-I se faz necessária uma visão a nível gênico, especialmente no que diz respeito às mutações ocorridas no gene IDUA e, por fim, a expressividade dos sintomas clínicos através de uma caracterização fenotípica e fisiológica dos portadores (GIUGLIANI et al., 2010)

3.8.3.1. Gene *IDUA*

O gene *IDUA* está localizado no braço curto do cromossomo 4, *locus* 4p16.3 e possui cerca de 19Kb, constituído por 15 éxons que formam o mRNA da enzima α -L-iduronidase (HGMD, 2016), dentre os quais, os éxons 2 e 3 existe um íntron com um tamanho aproximado de 13kb, possivelmente o maior íntron encontrado no *IDUA* (LACOMBE&GERMAIN, 2014). A enzima codificada por este gene, a α -L-iduronidase (Fig. 12a), possui uma cadeia com 653 aminoácidos, em que, entre esses, 26 são imediatamente clivados na porção amino-terminal, resultando em uma proteína de tamanho aproximado a 74 kD, revelando uma estrutura enzimática com sítios de interação química com seis moléculas químicas diferentes (Fig. 12b) (MADEJ et al., 2013; LACOMBE&GERMAIN, 2014).

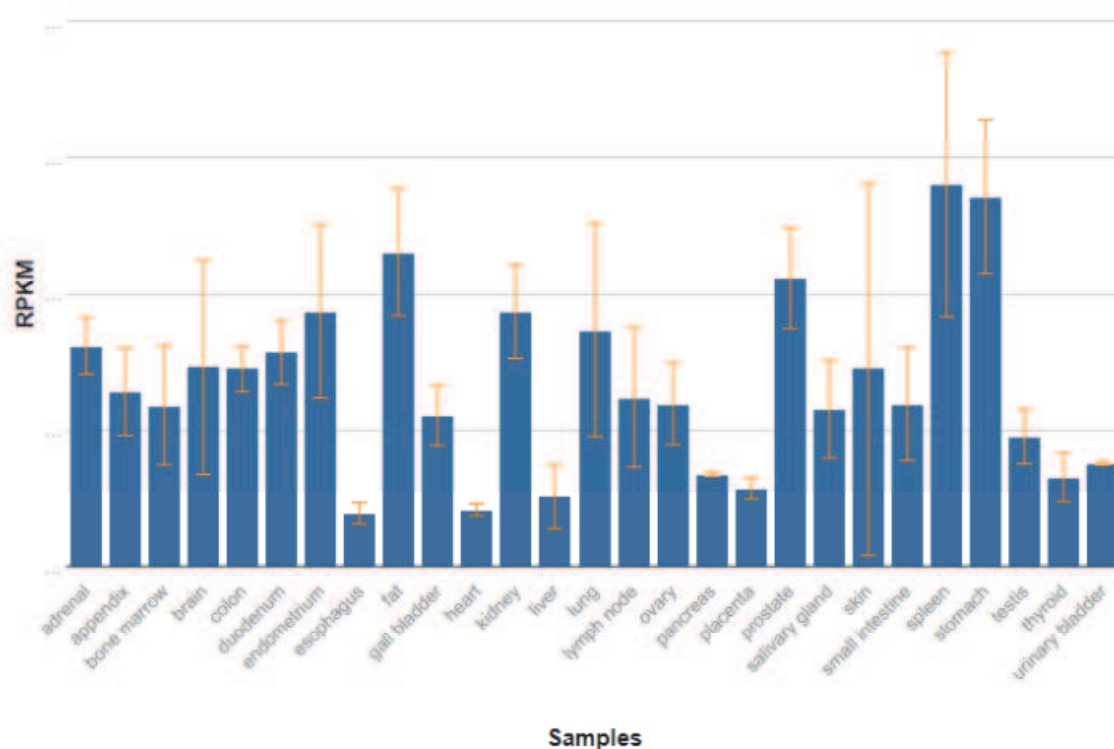
Uma das razões para que haja uma desordem sistêmica nos portadores da MPS-I se dá pela expressividade e atividade enzimática nas mais diversas partes do corpo humano (Tab. 02). Isso nos remete aos efeitos multissistêmicos ocasionados pela mutação, trazendo uma melhor compreensão da gravidade da MPS-I (FAGERBERG et al., 2014).

Figura 5: (a) Estrutura cristalizada da enzima α -L-iduronidase. (b) Sítios de interação química na molécula de α -L-iduronidase: (1) N-Acetil-D-Glicosamina; (2) β -D-Mannose; (3) α -D-Mannose; (4) Glicerol; (5) Íon Cloro; (6) Íon sulfato



(FONTE: NCBI < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4OBS> > Acessado em: 26/03/2018)

Tabela 2: Níveis de expressividade da enzima α -L-iduronidase nos tecidos do corpo. O gráfico está demonstrado no eixo X os locais de extração das amostras e no eixo Y a expressividade da enzima.



(FONTE: NCBI < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3425> > Acessado em: 26/03/2018).

3.8.3.2. Mutações e frequências relativas

Até 2016 foram relatadas mais de 222 mutações patogênicas para o gene IDUA (HGMD, 2016). Dentre esse total, encontramos as mutações *nonsense* mais recorrentes, seguidos por regiões de *splice*, deleções e inserções, totalizando um quadro bastante diversificado (Tabela 03) (KWAN et al., 2015).

As mutações p.W402X, p.Q70X e P533R associadas foram identificadas como sendo as mais comuns para pacientes de com uma ancestralidade europeia, dentro os quais a frequência na Itália para a mutação W402X chega a atingir 11% e 55% para descendência australiana; os britânicos apresentam uma frequência de 7% para a mutação Q70X, diferente do povo escandinavo que chegam a alcançar 65% de frequência (VOSKOBOEVA et al., 1998; AZAB et al., 2016). Segundo BREMER e colaboradores (2011), essas mutações podem ser frequentemente associadas ao diagnóstico das formas graves da MPS-I.

Mutações *nonsense* que inserem um *stop-codon* resultando numa enzima deficiente: a p.Trp402 – caracterizada mais frequentemente – e p.Gln70, podem ser observadas uma frequência relativa de 37% a 48% para a p.Trp402 e 19% a 35% nos

casos de p.Gln70 nas populações europeias; e nas populações nórdicas – como a Finlândia – a frequência alélica de p.Gln70 chega a 62% a 84%; diferentemente do perfil asiático, como o Japão, no qual as mutações mais frequentes são c.704ins5 (não encontrada na Europa) e p.Arg89Gln podendo ser associadas, frequentemente, numa relação genótipo-fenótipo com a Síndrome de Schie (LACOMBE&GERMAIN, 2014).

Na Tunísia, foram encontrados mutações p.P533R, p.R628X e p.F02X em pacientes com MPS-I (CHKIOUA et al., 2007). Observemos que a mutação p.P533R, por exemplo, afeta diretamente o domínio conservado da superfamília das glicosidases e substitui uma prolina por uma arginina na posição 533 da enzima α -L-iduronidase (ATÇEKEN et al., 2016). Possivelmente, a mutação p.P533R é provavelmente de origem africana (região Norte), e, pelos processos de ocupação territorial, pode ter se espalhado pela porção norte do continente europeu, explicando-se dessa forma a alta frequência citada anteriormente (BERTOLA et al., 2011).

Na população do Peru foram identificadas as frequências de 42% para a mutação W402X, seguidas por mutações em A327P, E404X, Arg48del (correlacionado a pacientes com a Síndrome de Hurler) e R89W (correlacionados aos pacientes com a Síndrome de Hurler-Schie (PINEDA et al., 2014).

Os *splices* no gene IDUA também podem resultar em mutações. Um dos exemplos mais comuns, relatados anteriormente quanto ao p.Q70X, em que ocorre uma mutação g.5862C>T que está frequentemente associada ao fenótipo da Síndrome de Hurler; outro *splice* alternativo comum em MPS-I é demonstrado na mutação g.21632G>C que altera o íntron 12, gerando um códon de terminação prematuro, ou mutação *nonsense* (1728insGTCC) (BREMER et al., 2011).

A partir das mutações supracitadas, há uma manifestação fenotípica e de caráter clínico que aliada ao diagnóstico molecular gera uma maior confiabilidade na designação de qual tipo de MPS-I (Hurler, Scheie, Hurler-Scheie) e qual a gravidade (leve ou grave) que ela se apresenta nos pacientes-portadores.

3.8.4. Aspectos Clínicos

Não existe padronização bioquímica para uma classificação tão específica, no entanto, vem sendo desenvolvidas continuamente teorias a cerca da relação fenótipo-genótipo associados à classificação para MPS-I, mesmo ainda não havendo um consenso quanto à constituição dessa forma padrão de classificação clínico-molecular (NEUFELD&MUENZER, 2001).

Tabela 03: Mutações identificadas por ancestralidade e frequência populacional

MUTAÇÃO	ANCESTRALIDADE	FREQUÊNCIA
p.W402X p.Q70X P533R	EUROPEIA	Relacionadas as manifestações fenotípicas grave e intermediária
W402X	AUSTRALIANA	11%-55%
Q70X	INGLESES ESCANDINAVOS	7% 65%
p.Trp402	EUROPEIA	37% e 19%
p.Gln70	NÓRDICA	48% e 35%
c.704ins5 p.Arg89Gln	ASIÁTICA	Associação a síndrome de Scheie
W402X	PERUANA	42%

(FONTE: Autor)

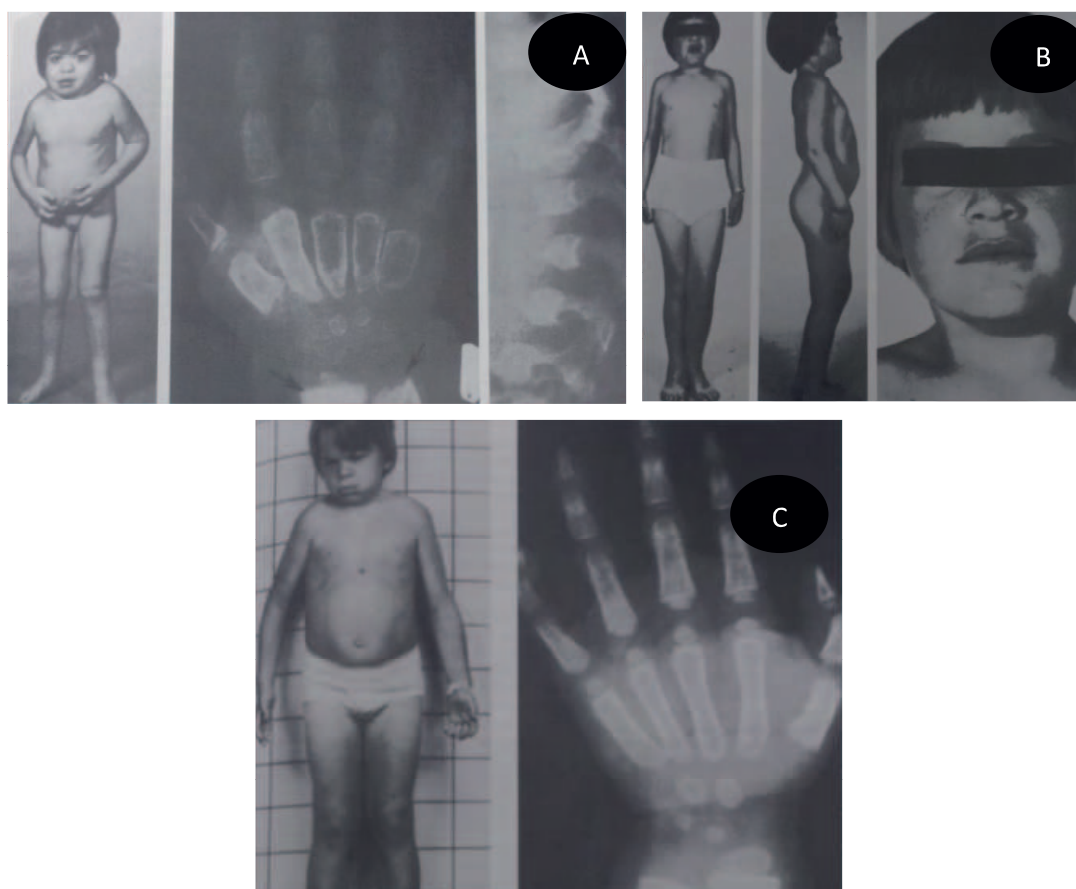
A Síndrome de Hurler (Fig. 6a) foi descrita pela primeira vez em 1919, no qual se caracterizou como um crescimento mais rápido que o habitual nos primeiros anos de vida com um retardo posterior (PASTORES et al., 2007). Aos seis meses de idade começam a surgir alterações sutis na face, macrocefalia, hérnias, mobilidade limitada dos quadris, respiração ruidosa e infecções das vias respiratórias; com o acumulado do substrato, há uma obstrução das vias aéreas superiores podendo levar a apnéia do sono e graves comprometimentos respiratórios; podendo-se também presenciar uma hipoplasia odontóide com ou sem luxação de C1-C2 (Fig. 6a) (NEUFELD; MUENZER, 2001). No segundo semestre de vida há um período quase estacionário da progressão do desenvolvimento físico e mental, podendo ocorrer o óbito dos portadores decorrente de complicações respiratórias ou cardíacas, gerando uma expectativa de vida de até 10 anos (PASTORES et al., 2007).

Na Síndrome de Scheie (Fig. 6b), o início dos sintomas ocorre frequentemente após os cinco anos de idade, dos quais, na maioria dos casos, o diagnóstico só é feito com em média 10 e 20 anos de idade (PASTORES et al., 2007). A sintomatologia inclui micrognatia (queixo e mordida retraídos), opacidade córnea, disostose múltipla, contraturas articulares, complicações auditivas, hérnia umbilical e ingual; agravadas pelo diagnóstico tardio, realizado apenas quando os problemas cardíacos e respiratórios que o acúmulo do substrato ocasiona, o diagnóstico é realizado numa faixa etária dos 10 e 20 anos (SMITH, 1998). Ocasionalmente, pode-se ter a presença de um aumento de volume do disco óptico, estreitamento do túnel do carpo que pode causar compressão do

nervo mediano, deterioração mental e psicoses, discreto comprometimento do crescimento, perda da audição, hepatomegalia, macroglossia, glaucoma, miopia, apnéia do sono e lesões císticas, justa-articulares, progressivas nas mãos e nos pés (SMITH, 1998).

Em 1976 ocorreu a definição da Síndrome Hurler-Scheie (Fig. 6c) por Stevenson e colaboradores (1976). A progressão dos aspectos clínicos ocorre de forma a interagir de forma intermediária entre a Síndrome de Hurler e a de Scheie, na qual os sintomas ocorrem entre os 3 e 8 anos de idade, com uma sobrevida para além dos 20 anos de idade, dos quais os primeiros aspectos clínicos surgem principalmente no final da infância e início da adolescência com uma opacificação da córnea, limitações articulares, anormalidades valvulares cardíacas e comprometimento auditivo (SMITH, 1998).

Figura 6: A) Criança com 3 anos de idade apresentando a Síndrome de Hurler. As radiografias mostram ossos largos e irregulares, principalmente nas metáfises. As vértebras torácicas e lombares são curtas com um acunhamento anterior. B) Síndrome de Scheie. Criança com 9 anos e nove meses de idade e estatura de 9 anos. Limitações moderadas dos movimentos dos ombros, cotovelos e mãos. C) Síndrome de Hurler-Scheie. Menino apresentando face discretamente alterada e limitações articulares que são mais evidentes nos cotovelos e dedos. À direita discretas alterações do tipo da disostose múltipla nas mãos.



(FONTE: SMITH, 1988)

4. METODOLOGIA

4.1. Local de Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da Universidade Estadual da Paraíba, campus I, Campina Grande (Paraíba).

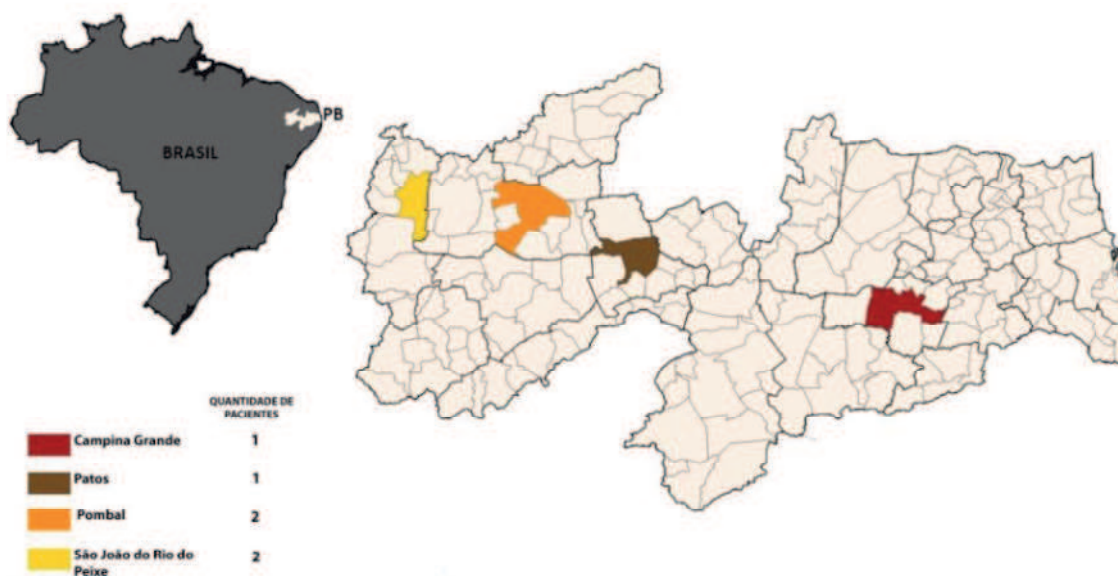
4.2. Amostragem

Foram analisadas seis pacientes com diagnóstico clínico confirmado para MPS-I oriundos da Paraíba, acompanhados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) da Universidade Federal de Campina Grande. Os mesmos assinaram um Termo Livre e Esclarecido (quando menor de idade, a autorização foi proveniente dos responsáveis legais) autorizando a utilização das amostras do material biológico para a pesquisa científica.

Os pacientes são originados de quatro municípios paraibanos, em que 02 pacientes pertencem a São João do Rio do Peixe, 02 de Pombal, 01 de Patos e 01 de Campina Grande (Fig. 7).

Para identificação laboratorial, os pacientes foram enumerados por MS1 a MS6 a fim de preservar a identidade dos mesmos. Dentre estes, 02 são homens e 04 são mulheres.

Figura 7: Localização dos pacientes e sua distribuição pelo Estado da Paraíba.



(FONTE: Modificado de SILVA, 2017)

4.2.1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico confirmado. Os critérios de exclusão se deram a pacientes que não fossem diagnosticados com MPS-I. A triagem dos pacientes, bem como a coleta do material biológico, foi realizada pelo Serviço de Genética do HUAC, obtidas com a colaboração da Doutora Paula Frassinetti.

4.3. Aspectos éticos

Foi apresentado aos familiares dos pacientes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no qual constam as informações que identificam a participação voluntária dos mesmos nesta pesquisa, bem como esclarece a utilização de informações e imagem, bem como material biológico, exclusivamente para o uso científico. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Estadual da Paraíba – Pró Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa com o CAAE 66503617.9.0000.5187.

4.4. Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras de sangue periférico dos pacientes. Para extração do DNA foi utilizada a metodologia de extração orgânica e Kit de extração e purificação de DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual, PROMEGA©). Foi utilizado 50µl de sangue total adicionado a 100 µl de tampão de lise (NaCl 0,4M, EDTA 2mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,0), proteinase K (150 mg/ml) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1,5%. Incubação por 4-6 horas a 56° C em banho-maria. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min a 4° C. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de isopropanol; e a mistura mantida a -20° C por 1 h, para precipitação do DNA. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 20 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspendido em 50 µl de Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). A extração com Kit de extração e purificação foi realizada de acordo com especificação do fabricante. O DNA isolado foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1%, submetido à eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA/TBE (Tris 0,089 M; Ácido bórico 0,0089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) corado com *SYBR® Green* (Thermo Fisher Scientific), e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta, utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb plus (25 mg/µl, Invitrogen).

4.5. Quantificação das Amostras

As amostras foram quantificadas utilizando o protocolo operacional do Qubit® 3 Fluorometer da invitrogen (*Thermo Fisher Scientific*).

4.6. Amplificação do DNA

Foi realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) nas amostras dos seis pacientes para amplificar a região controle do mtDNA. As regiões HSVI e HSVII da região controle do mtDNA foram amplificadas utilizando dois pares de nucleotídeos específicos (primers) (L15996/H16401 e L29/H389). O par de primers L15996 (*foward*) e H16401 (*reverse*) permitiu a amplificação da região HSVI, enquanto os primers L29 (*foward*) e H389 (*reverse*) permitiu a amplificação da região HSVII (Tabela 4). As letras L e H correspondem à cadeia leve e pesada do genoma mitocondrial, respectivamente.

Tabela 4: Primers utilizados na pesquisa.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS	REGIÃO AMPLIFICADA	REFERÊNCIA
L15996	5'CTCCACCATTAGCACCCAAAGC3'	HSV-I	IPCC-JP¹
H16401	5'TGATTTACGGAGGATGGTG3'		
L29	5'GGTCTATCACCTATTAACCAC3'	HSV-II	IPCC-JP¹
H389	5'CTGGTTAGGCTGGTGTAAGG3'		

(FONTE: AUTOR. ¹Instituto de Polícia Científica da Capital – João Pessoa)

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

Tabela 5: Condições de amplificação das regiões HSV-I e HSV-II do mtDNA.

ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
Ativação da Taq	95°C	05 minutos	
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Anelamento	55°C (HSV-I)	90 segundos	35 ciclos
	57°C (HSV-II)	90 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	68°C	10 minutos	

(FONTE: Adaptado do Instituto de Polícia Científica, João Pessoa – PB)

Para a análise dos produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com *SYBR® green* (Thermo Fisher Scientific) em cuba vertical com tampão 1X Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089M; Ácido bórico 0,089M e EDTA 0,02M) por aproximadamente 90 minutos, voltagem de 120V e 36 miliAmperes e visualizados através de transiluminador de luz UV. O tamanho dos fragmentos amplificados foram quantificados utilizando um marcado padrão de peso molecular de 1Kb (Amresco®) em cada gel, para análise da qualidade das amostra amplificadas.

4.7. Sequenciamento das amostras

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

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

sequenciados bidireccionalmente em sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 3500XL).

4.8. Análise de dados

Para verificar a qualidade das sequências geradas pelo sequenciamento direto das regiões HSV-I e HSV-II foram utilizados os softwares *Genetic Analyzer 3.0* (*Applied Biosystems*) e *Sequencing Analysis v.5.1*. Para a adesão (contig) das sequências *forward* e *reverse* de cada amostra, foi utilizado o programa Standen (pregap4 e gap 4) (BONFIELD et al., 1995). Os programas online Mitomaster descrito por Brandon e colaboradores (2009), disponível no endereço eletrônico (<http://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>) foi utilizado para detecção dos polimorfismos mitocondriais. Para isto, as sequências dos pacientes foram comparadas com a *Revised Cambridge Reference Sequence*, primeira sequência do genoma mitocondrial humano, revisada por Andrews e colaboradores (1999).

Em seguida os polimorfismos identificados foram submetidos ao programa online, HaploGrep descrito por Kloss-Brandstaetter e colaboradores (2010) (<https://haplogrep.uibk.ac.at/>) para identificação dos haplogrupos de cada indivíduo. Após a identificação dos polimorfismos e haplogrupos, as sequências foram submetidas à um alinhamento múltiplo com a rCRS pelo programa Bioedit v.7.0 (*Biological sequence alignment editor*) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). O alinhamento teve o objetivo de identificar os sítios de mutação. As frequências dos haplogrupos obtidos foram feitas por estatística direta.

5. RESULTADOS

5.1. Extração, amplificação e quantificação da região controle do mtDNA

A região de controle do mtDNA de todos os pacientes foi amplificada através dos oligonucleotídeos para a HSVI: L15996 e H16401 e para a HSVII: L29 e H389. A região HSVI originou fragmento de 500pb, do mesmo modo, a amplificação da região HSVII gerou um fragmento de 500pb. O produto obtido foi de boa qualidade sem bandas inespecíficas e com o fragmento de interesse nítido, com bons números referentes à quantificação de DNA (Tab. 6).

Tabela 6 – Resultados referentes à quantificação das amostras de DNA por paciente.

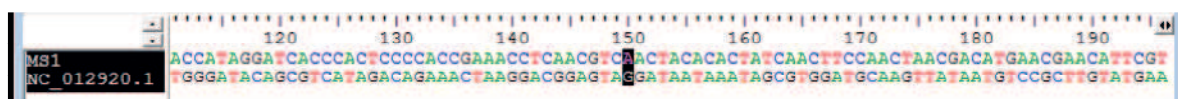
PACIENTE	QUANTIFICAÇÃO
MS1	84,41ng\µL
MS2	60,29 ng\µL
MS3	105,54 ng\µL
MS4	99,15 ng\µL
MS5	70,36 ng\µL
MS6	127,88 ng\µL

(FONTE: Autor)

5.2. Sequenciamento das amostras

O sequenciamento das amostras permitiu a caracterização dos haplótipos presentes das regiões HSV-I e HSV-II do mtDNA dos pacientes. Os eletroferogramas gerados das sequencias nucleotídicas foram de boa qualidade com picos bem estabelecidos, sem ruídos e valores de confiança igual ou superior a 25 (Apêndice II). Na Figura 08 pode-se observar um exemplo do polimorfismo C150T no paciente MS1.

Fig. 08: Polimorfismo C150T no paciente MS1.



(FONTE: Autor)

A análise no programa *Mitomaster* gerou 57 haplótipos dos seis pacientes. Dos haplótipos gerados, cinco (G16129A, T16189C, C16223T, T16249C, T16311C) destacam-se por repetirem-se nos indivíduos na região HSV-I, enquanto quatro (A73G,

T195C, A263G, 310.1C) repetiram-se nos indivíduos na região HSV-II. Os polimorfismos foram separados por paciente e região hipervariável, podendo ser analisados na Tabela 07, com destaque haplótipos encontrados na maioria dos indivíduos separados por HSV.

A análise do software *Haplogrep* mostrou que os pacientes pertencem a 04 haplogrupos diferentes (L3e2a1, M1, M1a1, B4). Apesar do número pequeno de pacientes devido a raridade e baixa frequência da doença na população brasileira (1:106.000 nascidos vivos) especialmente por ser uma doença genética rara, foram encontradas linhagens de duas etnias (africana e ameríndia) constituídas por fundadores da população brasileira.

Tabela 7 – Haplótipos encontrados na região HSV-I de cada paciente.

PACIENTE	HAPLÓTIPOS HSV-I	HAPLÓTIPOS HSV-II
MS1	<u>C16223T</u> , C16320T	<u>A73G</u> , C150T, <u>T195C</u> , C198T, <u>A263G</u> , 310.1C
MS2	C16056G, <u>G16129A</u> , <u>T16189C</u> , <u>C16223T</u> , <u>T16249C</u> , <u>T16311C</u>	<u>A73G</u> , <u>T195C</u> , <u>A263G</u> , 310.1C
MS3	<u>G16129A</u> , <u>T16189C</u> , <u>C16223T</u> , <u>T16249C</u> , <u>T16311C</u> , T16359C	<u>A73G</u> , <u>T195C</u> , <u>A263G</u> , 310.1C
MS4	<u>T16189C</u> , T16217C, A16241G	<u>A73G</u> , G92A, T152C, <u>A263G</u> , 309.1C, 309.2C, 309.3T
MS5	<u>T16189C</u> , T16217C, A16241G	<u>A73G</u> , G92A, T152C, <u>A263G</u> , 309.1C, 309.2C, 309.3T
MS6	T16178C, A16183C, <u>T16189C</u> , T16217C	<u>A73G</u> , <u>A263G</u> , 309.1C, 209.2T, T310C

(FONTE: Autor)

Dos pacientes analisados, possuem ancestralidade materna ameríndia os pacientes MS4, MS5 e MS6 enquanto os pacientes MS1, MS2 e MS3 possuem ancestralidade materna africana (Tabela 8).

Ad momentum, de acordo com as observações realizadas pela pesquisa em questão, verifica-se que a ancestralidade dos pacientes com MPS-I possui origem mitocondrial ameríndia (49,80%) e africana (49,80%). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado no programa *Bioedit*. Para fins de comparação foi adicionada a sequência controle do genoma mitocondrial (rCRS) revisada por Andrews e colaboradores em 1999. A partir deste alinhamento foram estabelecidos sítios de mutações entre as sequências. As contribuições das linhagens mitocondriais dos

pacientes com MPS-I revelou a presença de 4 haplogrupos representantes de dois grupos populacionais fundadores da população brasileira. Foi percebida a contribuição ameríndia a partir dos haplogrupos B4 (49,8%), enquanto a contribuição Africana foi representada pelos haplogrupos M1 (16,6%), M1a1 (16,6%) e o haplogrupo L3e2a1 (16,6%).

A genotipagem dos pacientes quanto a mutação foi realizada pela Rede MPS Brasil, com sede em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Tabela 8 – Haplogrupos obtidos a partir dos polimorfismos encontrados associados às mutações em cada paciente.

AMOSTRA	HAPLOGRUPO	ANCESTRALIDADE	MUTAÇÃO IDENTIFICADA
MS1	L3e2a1	AFRICANA	c.1598C>G (p.P533R) em homozigose c.1598C>G (p.P533R)
MS2	M1	AFRICANA	c.1262T (p.L421P) Heterozigose composta
MS3	M1a1	AFRICANA	c.1598C>G (p.P533R) em homozigose
MS4	B4	AMERÍNDIA	c.1598C>G (p.P533R) em homozigose
MS5	B4	AMERÍNDIA	c.1598C>G (p.P533R) em homozigose
MS6	B4	AMERÍNDIA	c.1598C>G (p.P533R) em homozigose

(FONTE: Autor)

6. DISCUSSÃO

A Mucopolissacaridose e a divulgação acadêmica

Com o desenvolvimento do presente trabalho, observou-se que não haviam revisões na literatura que dessem todo o respaldo inerente à tríade: genótipo-fenótipo-ancestralidade, observando-se a necessidade de desenvolver uma revisão na literatura apropriada para que nosso acervo bibliográfico viesse a contribuir com o presente estudo. A revisão na literatura encontra-se no Apêndice I.

A inferência da Ancestralidade do mtDNA e os padrões de distribuição das mutações no gene IDUA

De acordo com os resultados da ancestralidade materna dos pacientes com MPS-I, observaram-se a predominância do genótipo p.P533R do gene IDUA, apenas com um paciente em heterozigose. A mutação p.P533R apresenta uma origem africana, predominante na região Norte onde possivelmente iniciaram os processos de migração das populações em direção a Europa, onde hoje está presente em uma frequência aproximada de 0.9% (VOSKOBOEVA et al., 1998; AZAB et al., 2016; BERTOLA et al., 2011), prevalente em todos os indivíduos com essa ancestralidade presente neste estudo.

As mutações no gene IDUA podem ser associadas á classificação da doença, uma vez que se pode supor uma íntima relação entre a mutação p.P533R com os a manifestação clínica para a síndrome de Huler, e comprovada nos pacientes deste estudo que apresentam um estágio intermediário da doença, com a manifestação da Síndrome de Schie-Huler (SILVA, 2017; LACOMBE; GERMAIN, 2014).

Observamos grande predominância dos haplótipos B4 para populações ameríndias (50% dos pacientes no presente estudo) e uma frequência dos haplótipos europeus M1 (16,60%), M1a (16,60%) e L3e2a1 (16,60%), no entanto, Pena e colaboradores (2002) realizaram um estudo a respeito do DNAmT da população brasileira na qual os resultados divergem dos dados presentes. Os haplogrupos europeus mais comuns encontrados no Brasil dividem-se em H com representação em 44% da população, seguido por T (14%) e J (21%). Os haplogrupos L3 e L1c constituem significativamente um percentual de 49% da constituição africana do Brasil. Os haplogrupos dos ameríndios (A, B, C e D) foram encontrados em brasileiros brancos, no qual o haplogrupo A foi o mais frequente com representação percentual de 30% - indo

de encontro com os valores encontrados na presente pesquisa – seguido por haplogrupos B (29%), C (24%) e D (16%).

Os trabalhos anteriores apresentando Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) nestes pacientes, realizadas por Alves (2017) todos possuem um percentual de 41,50% de ancestralidade europeia, seguida por 30,70% africana e 27,70% ameríndia. Estes resultados fazem correlação com aqueles estipulados pelas frequências de mutações correspondentes a p.533R indicando uma possível linhagem à frequência da mutação na Europa.

Em trabalhos paralelos realizados pela equipe de pesquisa do laboratório com relação à patrilinhagem dos pacientes neste estudo, encontramos de forma análoga uma predominância africana (MS1, MS2, MS3 e MS4), seguidas pela ancestralidade europeia (MS5 e MS6). A partir destes dados, podemos novamente inferir sobre a possível associação da mutação p.533R em populações africanas, e baixas frequências, mas existentes, em populações europeias, podendo-se inferir sobre uma possível associação entre mutação-ancestralidade e fenótipo (VOSKOBEOVA et al., 1998; AZAB et al., 2016; BERTOLA et al., 2011).

No paciente MS2, o único caso de heterozigoto composto do grupo, apresenta a mutação p.L421P, encontrada com uma proporção de 0.9% em pacientes com MPS-I na China (WANG et al., 2011). Uma das possíveis explicações para este fato pode se dar através de uma ancestralidade compartilhada entre africanos e asiáticos pela árvore de evolução do mtDNA, no retorno asiático.

A provável história da inserção desses alelos na população brasileira pode ser observada nos processos migratórios corroborados com os dados genéticos, podendo-se dessa forma levantar hipóteses.

O haplogrupo L3e2b1

Em nossa pesquisa, observamos uma frequência de 16,50% em nossos pacientes para o haplogrupo L3e2b1. Recentes estudos apontam que o grupo L subdividiu-se pelo continente africano em diferentes frequências. Salas e colaboradores (2004) observaram que a incidência do grupo L3e2 está mais presente na região norte e estendendo-se progressivamente para a região oeste na África Ocidental. Segundo os pesquisadores, o grupo L3e2 é frequentemente encontrado na América e difunde-se pelas regiões com subgrupos encontrados unicamente neste continente.

O haplogrupo L3e2b encontra-se em grande prevalência (7.33%) na República de Gana (África). Nas Américas, observa-se uma grande prevalência deste haplogrupo no Caribe, inferindo-se, desta forma, uma possível entrada na América do Sul deste haplogrupo pelas regiões caribenhas. Outra possível porta de entrada na América do Sul se dá pela rota de escravos, em que um dos locais de aquisição da mão de obra escrava foi Gana (FRENDET et al., 2012; RIBEIRO; SÁ, 2015).

O haplogrupo M

Encontramos, de forma equivalente, uma frequência de 16,60% para os haplogrupos M1 e M1a. Sabe-se que o haplogrupo M é originado da parte oriental da África e expandiu-se pela Ásia, adentrando o continente a sudoeste. Esses processos migratórios foram realizados pela rota do Golfo Persa/Arábico à cerca de 50 mil anos (DERENKO et al., 2007).

Esse macro-haplogrupo subdivide-se e dentre estas há o haplogrupo M1. Este haplogrupo é específico da África e representa uma forte contradição evolutiva, podendo apresentar duas hipóteses específicas quanto a sua origem: i) este haplogrupo representa uma subdivisão do macro-haplogrupo M surgido dos processos migratórios a leste da África; ou ii) pode representar um retorno ao Leste Africano por populações asiáticas. A hipótese desse retorno à África é suportada pela filogeografia do cromossomo Y a partir dos haplogrupos K2 e R1b* observados em alta frequência apenas na África; estes por sua vez, subdivisões do macro-haplogrupo asiático K, (OLIVIERI et al., 2012).

A incidência geográfica quanto às frequências relativas ao haplogrupo M1 é pela parte sub-equatorial africana, especialmente pela Etiópia e leste africano. Há três principais irradiações quanto a este haplogrupo: i) M1a encontrado em grande frequência por toda a região leste africana e em particular frequência pela África sub-saariana; ii) M1b encontrado em diferentes frequências entre elas Etiópia com frequências ocasionais a leste da África e região Nordeste da África; e iii) M1c apresentando uma alta frequência pelas regiões Nordeste da África, especialmente as regiões Mediterrâneas e áreas do Oeste Sub-saariano (GONZÁLEZ et al., 2007).

A presença dos clados M1a na região sub-saariana, especialmente em uma distribuição leste, é devida aos processos de radiação das populações caracterizadas pelo haplogrupo M1. Há um verdadeiro *continuum* que se inicia a Oeste da Ásia e de forma homogênea alcança o Leste Africano. A partir desses processos migratórios, as

irradiações dão origem a subclados caracterizados por diferentes frequências pelas regiões leste-africanas (GONZÁLEZ et al., 2007).

Dentre os subclados, há o M1a1, encontrado em um dos pacientes do presente estudo (MS3). Esse subclado é caracterizado por um perfil distinto da posição 16359C da HVS-I, podendo ocorrer também pequenas transições nas posições 16260 e 16182. Este haplogrupo é frequentemente encontrado nas regiões da Etiópia e Leste Africano, acreditando-se que as migrações destas populações originaram-se do retorno asiático ao continente (WINTERS, 2010).

O Haplogrupo B4

A maior frequência de haplogrupos encontradas em nossos pacientes é para o haplogrupo B4, correspondendo a um total de 49,80%.

O Haplogrupo B4 é um dos ramos do super-haplogrupo N. Acredita-se que a introdução desse haplogrupo nas Américas tenha se dado a partir das ilhas do Pacífico há cerca de 20 mil anos atrás, durante o último período glacial. O haplogrupo representado para essas populações é o B4a1a1a (FENDT et al., 2012; OLIVIERI et al., 2006).

O grupo mais próximo ao encontrado hoje nas Américas é o B4a1 do leste asiático que surgiu há cerca de 8500 anos atrás (SALAS et al., 2004). Os últimos representantes desse haplogrupo encontram-se restritos ao território ocidental de Taiwan. Esse fato vem a corroborar com a nossa teoria da presença da mutação no paciente MS5 em heterozigose, uma vez que há uma íntima associação entre as rotas migratórias dos povos asiáticos para as américas, podendo-se dessa forma observar a predominância desse haplogrupo em Taiwan (China) e na América do Sul. A presença desse haplogrupo está de acordo com a arqueologia, uma vez que com os processos migratórios dos povos vindos da Sibéria foram responsáveis por povoar a América do Norte e, posteriormente, América do Sul (DERENKO et al., 2007).

Consanguinidade e EIM

Uma das maiores características associadas aos EIM, em especial às DDL, é a endogamia presente no histórico de vida dos portadores. Khedhiri e colaboradores (2009) encontraram em seus estudos uma associação forte entre portadores de MPS-I e a consanguinidade. Nas observações realizadas com os pacientes participantes deste

estudo também foi encontrado essa relação intrínseca entre a endogamia e a expressividade da doença (SILVA, 2017).

Segundo SILVA (2017), os dados sobre esta população apresentam um Coeficiente Médio de Endogamia de $F=0,0281$ que nos informa a probabilidade dos indivíduos herdarem dois alelos idênticos por descendência. Para se ter ideia, o Coeficiente Médio de Endogamia no Sul do país é extremamente baixo em comparação com o observado nesta população de estudo ($F=0,0003$) (SILVA, 2017). Se observarmos esse mesmo coeficiente refletido pela população brasileira ($F=0,0023$), podemos inferir na influência intrínseca entre consanguinidade e EIM (SANTOS et al., 2010). Ou seja, a partir dessa análise podemos inferir que neste estudo há uma forte relação endogamia-mutação, confirmando hipóteses apresentadas nos estudos sobre o tema (SOARES, 2011; SHAKY et al., 2013).

Leva-se em consideração que a endogamia na Região Nordeste do Brasil apresenta uma elevada taxa, especialmente nas regiões rurais. Não apenas os fatores demográficos acabam contribuindo para os casamentos entre indivíduos de uma mesma família, como também fatores culturais, status socioeconômico, densidade populacional e isolamento geográfico (WELLER et al., 2012; MACHADO et al., 2013).

Essas características foram percebidas por SILVA (2017) no perfil de distribuição da população de estudo: 83% presentes na mesorregião do Sertão, com um alto índice de regiões isoladas geograficamente e populações reduzidas resultando num agrupamento de famílias com baixos índices de diversidade genética.

Esses baixos índices de diversidade genética acabam contribuindo para os altos índices de frequências alélicas específicas dentro de uma determinada população. Essas frequências, evolutivamente falando, podem conter genes deletérios que ao invés de baixar sua frequência na população, como deveria ocorrer, pelo contrário, acabam aumentando e sendo expressos em maior número. Para tanto, isso pode ser observado nas populações de pacientes com MPS no Rio Grande do Sul, onde apresenta o maior índice de portadores com MPS-I no Brasil (SCHWARTZ et al., 2000).

Essas observações instigam, de certa forma, a compreensão real entre a expressão alélica e suas frequências relativas expressas na população, e como o gene IDUA distribui-se na população. Na tentativa de compreender essa distribuição e sua susceptibilidade entre as diferentes ancestralidades, infere-se sobre a relação entre a ancestralidade dos portadores e as mutações.

Como visto anteriormente, algumas mutações estão fortemente associadas às populações, especialmente pela frequência em que elas aparecem nestas. SILVA (2017) relatou quais foram as mutações encontradas nesta população de estudo, e a partir de suas observações pode-se inferir os resultados encontrados no presente trabalho e os resultados clínicos estão correlacionados.

Até o presente momento, não se encontra disponível quaisquer publicações referentes à região controle do mtDNA da população paraibana de pacientes com MPS-I, tornando este trabalho pioneiro na análise de ancestralidade desta população.

O presente trabalho acaba contribuindo para um melhor entendimento dos perfis populacionais do Estado da Paraíba quanto a sua constituição ancestral e, potencialmente, estes resultados podem contribuir para um melhor entendimento da incidência de doenças relacionadas aos fatores endogâmicos tão intrinsecamente relacionado à cultura do interior da Paraíba.

7. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos, pode-se inferir que a ancestralidade materna dos pacientes paraibanos com MPS-I possui frequência compatível com ancestralidade Ameríndia e Africana, de acordo com as frequências encontradas no país, devido aos processos de povoamento do Brasil.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de ancestralidade resgatada pela presente pesquisa incutiu e corroborou com a análise história dos processos migratórios do território brasileiro, uma vez que se pode observar como todos os processos puderam se desenvolver e como através desta análise se pôde observar as frequências relativas dos indivíduos portadores de MPS-I com base em sua ancestralidade.

Espera-se que novas pesquisas possam ser desenvolvidas para uma maior coerência quanto aos dados da mutação e a ancestralidade dos indivíduos, resgatando dessa forma o histórico da doença com base no seu progresso evolutivo ancestral. A partir deste resgate, espera-se conquistar novos caminhos para o desenvolvimento de tecnologias aplicáveis ao cuidado e tratamento de pacientes de MPS-I como as novas terapias gênicas e de edição gênica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRENS-NICKLAS, Rebecca C.; SLAP, Gail; FICICIOGLU, Can. Adolescent Presentations of Inborn Errors of Metabolism. **Journal Of Adolescent Health**, [s.l.], v. 56, n. 5, p.477-482, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jadohealth.2015.01.008>.

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

ALVES-SILVA, Juliana et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. The **American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.444-461, ago. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/303004>.

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

ARAÚJO, Alexandra Prufer de Q. C.. Doenças Metabólicas com manifestações psiquiátricas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, [s.l.], v. 6, n. 31, p.285-289, out. 2004.

ARN, Pamela et al. High rate of postoperative mortality in patients with mucopolysaccharidosis I: findings from the MPS I Registry. **Journal Of Pediatric Surgery**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.477-484, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2011.09.042>.

ATÇEKEN, N. et al., Evaluation and identification of IDUA gene mutations in Turkish patients with mucopolysaccharidosis type I. **Tubitak**, v.46, p.404-408, 2016.

AZAB, Belal et al. Novel frameshift variant in the IDUA gene underlies Mucopolysaccharidoses type I in a consanguineous Yemeni pedigree. **Molecular Genetics And Metabolism Reports**, [s.l.], v. 12, p.76-79, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.06.001>.

BARROS, J. E. X. S. **Diversidade haplotípica de microssatélites do cromossomo Y humano na população de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. UFPE: Recife, 2006.

BELLETTATO, Cinzia Maria et al. Inborn Errors of Metabolism Involving Complex Molecules. **Pediatric Clinics Of North America**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.353-373, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.011>.

BERTOLA F., FILOCAMO M., CESATI G et al., IDUA mutational profiling of a cohort of 102 European patients with mucopolysaccharidosis type I: Identification and characterization of 35 novel α -L-iduronidase (IDUA) alleles. **Hum Mutat**. V.6,p.2189-2210, 2011

BICALHO, C. **Avaliação do comprometimento auditivo em pacientes com Mucopolissacaridose**. FIOCRUZ: Salvador, 2015.

BOCHERNITSAN, A. N. **Distribuição geográfica de Mucopolissacaridose tipo IV no Brasil através de estudos moleculares para identificação de mutações patogênicas e polimorfismos no gene ARSB**. 2013. 34f. Trabalho de conclusão de curso – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. As hemoglobinopatias e a diversidade genética da população brasileira. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.401-401, jan. 2009.

BREMER, Sara et al. A novel mucopolysaccharidosis type I associated splice site mutation and IDUA splice variants. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 104, n. 3, p.289-294, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.07.012>.

BUNGE, Susanna et al. Genotype–phenotype correlations in mucopolysaccharidosis type I using enzyme kinetics, immunoquantification and in vitro turnover studies. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1407, n. 3, p.249-256, set. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0925-4439\(98\)00046-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0925-4439(98)00046-5).

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

CARVALHO-SILVA, D. R. et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 1, p. 281-286, 2001.

CHKIOUA et al. Hurler diseases (mucopolysaccharidosis type IH): clinical features and consanguinity in Tunisian population. **Diagnostic Pathology**, v.6, p.113, 2011.

CHKIOUA, L. et al. La mucopolysaccharidose de type I: identification des mutations du gène alpha-L-iduronidase dans des familles tunisiennes. **Archives de Pédiatrie**, [s.l.], v. 14, n. 10, p.1183-1189, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcped.2007.06.018>.

CLARKE, L. A. The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. v.10. e.1, 2008.

CLARKE, L.A., HEPPNER. Mucopolysaccharidosis type I. **Gene Reviews** (online). University of Washington, Seattle, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1162>> Disponível em: Acesso em 21/11/16

COUTINHO et al., Glycosaminoglycan Storage Disorders: A review. **Biochemistry Research International**, 2011.

DANTAS, Mayla Aracelli Araújo. **Ancestralidade de pacientes com mucopolissacaridose tipo III-c com marcador de linhagem: Análise do cromossomo Y**. 2016. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

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

DERENKO, Miroslava et al. Phylogeographic Analysis of Mitochondrial DNA in Northern Asian Populations. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 81, n. 5, p.1025-1041, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/522933>.

DUDEK, Ronald W.; WILEY, John E.. **Genética Humana Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

DULIK, Matthew c. et al. Mitochondrial DNA and Y Chromosome Variation Provides Evidence for a Recent Common Ancestry between Native Americans and Indigenous Altaians. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 90, n. 2, p.229-246, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.014>.

EL-HATTAB, Ayman W.. Inborn Errors of Metabolism. **Clinics In Perinatology**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.413-439, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2015.02.010>.

FAN, Long; YAO, Yong-gang. MitoTool: A web server for the analysis and retrieval of human mitochondrial DNA sequence variations. **Mitochondrion**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.351-356, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.013>

FAUSTO, B. História do Brasil: Cobre, um período de mais de quinhentos anos, desde as raízes da colonização portuguesa até nossos dias. São Paulo: **Edusp**. 1996

FENDT, Liane et al. MtDNA diversity of Ghana: a forensic and phylogeographic view. **Forensic Science International: Genetics**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.244-249, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.05.011>.

GALLEGOS-ARREOLA, Martha et al. Linkage Disequilibrium Between IDUA kpnI-VNTR Haplotype in Mexican Patients with MPS-I. **Archives Of Medical Research**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.375-379, set. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0188-0128\(99\)00049-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0188-0128(99)00049-4).

GEPPERT, Maria et al. Hierarchical Y-SNP assay to study the hidden diversity and phylogenetic relationship of native populations in South America. **Forensic Science International: Genetics**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.100-104, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.08.016>.

GIUGLIANI R. et al., Mucopolysaccharidosis I, II and VI: brief review and guidelines for treatment. **Mol Gen Biol**, v. 33, n.4, p. 589-604, 2010.

GIUGLIANI, Roberto et al. Relative frequency and estimated minimal frequency of Lysosomal Storage Diseases in Brazil: Report from a Reference Laboratory. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.31-39, 16 mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0268>.

GONZÁLEZ, Ana M et al. Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.223-235, 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-223>.

GREINER-TOLLERSRUD, Ole Kristian; BERG, Thomas. **Lysosomal Storage Disorders**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6177/>>. Acesso em: 17 maio 2016.

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

GUSELLA, J. F. et al.. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. **Nature**. [s.l.], v. 306, n. 5940, p. 234-238, 1983.

HABER, Marc et al. MtDNA Lineages Reveal Coronary Artery Disease-Associated Structures in the Lebanese Population. **Annals Of Human Genetics**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.1-8, 20 out. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1809.2011.00682.x>.

HALLATSCHEK, O. et al. Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 104, n. 50, p.19926-19930, 4 dez. 2007. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0710150104>.

HEPPNER, Jonathan M.; ZAUCKE, Frank; CLARKE, Lorne A.. Extracellular matrix disruption is an early event in the pathogenesis of skeletal disease in mucopolysaccharidosis I. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 114, n. 2, p.146-155, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.09.012>.

HGMD, The Human Gene Mutation Database. Disponível em: <<http://www.hgmd.org>>. Acesso em 30/11/2016.

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

KAMADA, T. et al., Diversidade Genética de Populações Naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.

KHEDHIRI, S. et al. Mucopolysaccharidoses type I and IVA: Clinical features and consanguinity in Tunisia. **Pathologie Biologie**, [s.l.], v. 57, n. 5, p.392-397, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.005>.

KIDD, Kenneth K. et al. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. **Forensic Science International: Genetics**, [s.l.], v. 10, p.23-32, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.002>.

KINGMA, S.D. et al., Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders; challenges of screening. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.29, p.145-157, 2015.

- KWAK M.J. et al., Report of 5 novel mutations of the α -L-iduronidase gene and comparison of Korean mutations in relation with those of Japan or China in patients with muco/polysaccharidosis I. **BMC Medical Genetics**. 2016.
- LAHAYE, Christelle et al. Human occupation in South America by 20,000 BC: the Toca da Tira Peia site, Piauí, Brazil. **Journal Of Archaeological Science**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.2840-2847, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2013.02.019>.
- LEE, Chang-yong. A model for the clustered distribution of SNPs in the human genome. **Computational Biology And Chemistry**, [s.l.], v. 64, p.94-98, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.06.003>.
- LEITE, T. K. M. **Variabilidade genética na população brasileira: ancestralidade genômica e fenótipos de capacidade cardiovascular**. Tese de Doutorado. Brasília, 2012.
- LI, Wan et al. Identification of susceptible genes for complex chronic diseases based on disease risk functional SNPs and interaction networks. **Journal Of Biomedical Informatics**, [s.l.], v. 74, p.137-144, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2017.09.006>.
- LIMA, N. O. **Monitoramento da Excreção de Glicosaminoglicanos em Pacientes com Mucopolissacaridoses Submetidos a Terapia de Reposição Enzimática**. Dissertação. Universidade Federal do Pará, 2009.
- LINS, Tulio Cesar de Lima. **Impacto da Miscigenação na aplicação do HapMap para a População Brasileira Avaliado nos genes PTPN22 e VDR**. 2007. 196 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2007.
- 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.
- MACHADO, T. M. B. et al. **Migração, estrutura populacional, tipos de casamentos e doenças genéticas em Monte Santo – BA**. Tese de Doutorado. 2012.
- MADEJ, Thomas et al. MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.297-303, 6 dez. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1208>.
- MAGALHÃES, I. M.; SILVA, D. M. Informações acerca de marcadores moleculares uniparentais: DNA mitocondrial e cromossomo Y. **Estudos de Biologia**, v.28, n. 63, p.81-88, abril/junho, 2006.
- MATTE, Ursula et al. Identification and characterization of 13 new mutations in mucopolysaccharidosis type I patients. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 78, n. 1, p.37-43, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1096-7192\(02\)00200-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1096-7192(02)00200-7).

MELBOUCI, Melodie et al. Growth impairment in mucopolysaccharidoses. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], p.100-140, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.03.004>.

MENNI, Francesca et al. Vaccination in children with inborn errors of metabolism. **Vaccine**, [s.l.], v. 30, n. 50, p.7161-7164, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.012>.

MITCHELL, John et al. Unique medical issues in adult patients with mucopolysaccharidoses. **European Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 34, p.2-10, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2016.05.017>.

MONTENEGRO, Yorrán Hardman Araújo; LUNA, Karla. Nanobiotecnologia e Câncer. [s.l.]: Novas Edições Acadêmicas, 2017.

MORAIS, P. J. S., **Estudo do DNA mitocondrial de um grupo de imigrantes oriundos de Cabo Verde residentes em Lisboa**. Eganás Moniz: Portugal, 2013.

MOREIRA et al., **Estruturação do território municipal paraibano: na busca das origens. Cadernos do Lagepa**. V. 2, p.81-93, 2003.

MOUNACH, J. et al. Syndrome dysmorphique lié à une mucopolysaccharidose de type I. **Archives de Pédiatrie**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.415-417, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcped.2014.01.006>.

MUENZER, Overview of the Mucopolysaccharidoses. **Reumatology**, v.50, p.4-12, 2011.

NEUFELD, E. F.; MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. In: **The online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill Companies, 2011, p. 3421-3452.

OLIVIERI, A. et al. The mtDNA Legacy of the Levantine Early Upper Palaeolithic in Africa. **Science**, [s.l.], v. 314, n. 5806, p.1767-1770, 15 dez. 2006. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1135566>.

O'ROURKE, Dennis H.; RAFF, Jennifer A.. The Human Genetic History of the Americas: The Final Frontier. **Current Biology**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.202-207, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.051>.

OU, Li; PRZYBILLA, Michael J.; WHITLEY, Chester B.. Phenotype prediction for mucopolysaccharidosis type I by in silico analysis. **Orphanet Journal Of Rare Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-14, 4 jul. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13023-017-0678-1>.

PÁDUA, José Augusto. A OCUPAÇÃO DO TERRITÓRIO BRASILEIRO E A CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS NATURAIS. In: MILANO, M.; TAKAHASHI, L.; NUNES, M.. **Unidades de Conservação: Atualidades e Tendências**. Curitiba: Fundação O Boticário, 2004. p. 134-140

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.

PEDROSA, M. A. F., **Composição genética de quatro populações remanescentes de quilombos do Brasil com base em Microsatélites e Marcadores de Ancestralidade.** Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, 2006.

PEISCHL, Stephan et al. Genetic surfing in human populations: from genes to genomes. **Current Opinion In Genetics & Development**, [s.l.], v. 41, p.53-61, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2016.08.003>.

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

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

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.

PIERRE, Michelle de Saint. Antiquity of mtDNA lineage D1g from the southern cone of South America supports pre-Clovis migration. **Quaternary International**, [s.l.], v. 444, p.19-25, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.quaint.2017.05.054>.

PINEDA, Tatiana et al. Genotypic and bioinformatic evaluation of the alpha-1 -iduronidase gene and protein in patients with mucopolysaccharidosis type I from Colombia, Ecuador and Peru. **Molecular Genetics And Metabolism Reports**, [s.l.], v. 1, p.468-473, 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2014.10.001>.

PRADO, V. F.; ALVES-SILVA, J. Linhagens mitocondriais em populações nativas das américas. In: Pena (org.). **Homo brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro.** Ribeirão Preto: Funpec. P. 63-71, 2002.

QUINTANA-MURCI, Lluís. Genetic and epigenetic variation of human populations: An adaptive tale. **Comptes Rendus Biologies**, [s.l.], v. 339, n. 7-8, p.278-283, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2016.04.005>.

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/CCPSE2010/18627/1/PROCILCAR2009.00079.pdf>>. Acessado em: 23/03/2018.

REIS, R.P. **O tempo de pedra.** Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2008.

- RIBEIRO, Ester Tomás Natal; SÁ, Lucilene Antunes Correia Marques de. MAPEAMENTO HISTÓRICO SOBRE TRÁFICO DE ESCRAVOS EM ÁFRICA. **Revista Brasileira de Cartografia**, [s.l.], v. 4, n. 67, p.905-911, jul. 2015.
- SAINZ CM, MUÑOZ CZ, MONTEAGUDO AGQ. Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. **Rev Cubana de Pediatría**; v.74, n.1, p.68-76, 2002.
- SALAS, Antonio et al. The African Diaspora: Mitochondrial DNA and the Atlantic Slave Trade. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.454-465, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/382194>.
- SANTOS, S. S. B., **Estudo da Ancestralidade materna da população do Rio de Janeiro: análise do DNA mitocondrial**. UERJ: Rio de Janeiro, 2012a.
- SANTOS, Silvana et al. Inbreeding levels in Northeast Brazil: strategies for the prospecting of new genetic disorders. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.220-223, 12 mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572010005000020>.
- SANTOS, L. G. et al., A utilização do DNA mitocondrial para elucidação dos processos de evolução e variabilidade genética humana. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1720-1729, 2012b.
- SCALLY, Aylwyn. The mutation rate in human evolution and demographic inference. **Current Opinion In Genetics & Development**, [s.l.], v. 41, p.36-43, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.008>.
- SCHUH, Roselena Silvestri et al. **Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers**. European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics, [s.l.], v. 122, p.158-166, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.017>.
- SEIELSTAD, M. et al., 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://www.revistadehistoria.com.br/secao/artigos/caminhos-pre-colombianos>>. Acessado em: 03/02/2016.
- SHAWKY, Rabah M. et al. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. **Egyptian Journal Of Medical Human Genetics**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.157-164, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2013.01.002>.
- SIMONTI, Corinne N; A CAPRA, John. The evolution of the human genome. **Current Opinion In Genetics & Development**, [s.l.], v. 35, p.9-15, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2015.08.005>.
- SILVA, Rhaisa Farias da. **Mucopolissacaridose tipo I**: Perfil genético-epidemiológico e análise de consanguinidade de pacientes no Estado da Paraíba. 2017. 50 f. TCC

(Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SKOGLUND, Pontus; REICH, David. A genomic view of the peopling of the Americas. **Current Opinion In Genetics & Development**, [s.l.], v. 41, p.27-35, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2016.06.016>.

SMITH, Lachlan J. et al. Effect of neonatal gene therapy on lumbar spine disease in mucopolysaccharidosis VII dogs. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 107, n. 1-2, p.145-152, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.013>.

SMITHIES, O.; WALKER, N. F.; Genetic control of some serum proteins in normal humans. **Nature**. [s.l.], v. 176, n. 4496, p. 1265-1266, Dez 31, 1995.

STAPLETON, Molly et al. **Clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidoses**. [s.l.]: Simd, 2018. 47 p.

SUAREZ-GUERRERO, Jorge Luis et al. Mucopolisacaridosis: características clínicas, diagnóstico y de manejo. **Revista Chilena de Pediatría**, [s.l.], v. 87, n. 4, p.295-304, jul. 2016. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT). <http://dx.doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.10.004>.

TREJAUT, J. et al. Modern human migrations in insular Asia according to mitochondrial DNA and non-recombining Y chromosome. **Isbt Science Series**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.361-365, 20 out. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-2824.2011.01516.x>.

VAN OVEN, Mannis; KAYSER, Manfred. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Human Mutation**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.386-394, fev. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20921>.

VIEIRA, T. et a., Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From birth to biochemical diagnosis? **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 146A, n. 13, p.1741-1747, 2008.

VOLODKO, Natalia V. et al. Mitochondrial Genome Diversity in Arctic Siberians, with Particular Reference to the Evolutionary History of Beringia and Pleistocenic Peopling of the Americas. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 82, n. 5, p.1084-1100, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.03.019>.

VOSKOBOEVA, Elena Y. et al. Molecular Genetics of Mucopolysaccharidosis Type I: Mutation Analysis among the Patients of the Former Soviet Union. **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.174-180, out. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mgme.1998.2745>.

XU, Ke et al. The evolution of lineage-specific clusters of single nucleotide substitutions in the human genome. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.276-285, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2013.06.003>.

WANG, X et al. Mucopolysaccharidosis I mutations in Chinese patients: identification of 27 novel mutations and 6 cases involving prenatal diagnosis. **Clinical Genetics**, [s.l.], v. 81, n. 5, p.443-452, 16 maio 2011. Wiley-Blackwell.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01680.x>.

WATERS, M.R., STAFFORD, T.W., 2007. Redefining the age of Clovis: implications for the peopling of the Americas. **Science** 315, 1122e1126.

WERTHEIM-TYSAROWSKA, Katarzyna et al. GENETIC ANALYSIS IN INHERITED METABOLIC DISORDERS FROM DIAGNOSIS TO TREATMENT. OWN EXPERIENCE, CURRENT STATE OF KNOWLEDGE AND PERSPECTIVES. **Developmental Period Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 19, p.413-431, 2015.

WRAITH, J e. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management.. **Archives Of Disease In Childhood**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.263-267, 1 mar. 1995

APÊNDICE I

EVOLUTIVE, CLINICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF PATIENTS WITH MUCOPOLISSACARIDOSE TYPE I

Yorran Hardman A. Montenegro^{1*}; Simone Silva dos Santos Lopes¹

1 – Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e Saúde; *yorran_montenegro@hotmail.com

ABSTRACT: Mucopolysaccharidoses (MPS) are lysosomal storage diseases (DL), characterized by the intra-lysosomal accumulation of glycosaminoglycans (GAGs), secondary to deficiency in the activity of an enzyme involved in the degradation of these molecules. Mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome) is a rare autosomal recessive disease with pathological manifestations in multiple organ and tissue systems. The disease is caused by a defect in the gene encoding the lysosomal-L-iduronidase (IDUA) enzyme that plays an important role in catalyzing the degradation of heparan sulfate (HS) and dermatan sulfate (DS). This leads to accumulation of non-degraded or partially degraded complex glycosaminoglycans in organs and tissues of the body, leading to various clinical manifestations. Brazil is known as a highly diverse nation in ethnicities, with a marked level of miscegenation, with Brazilians being one of the most heterogeneous populations in the world because of its tri-hybrid nature as a result of five centuries of intense miscegenation among Europeans (colonizers), Africans (the slaves) and Amerindians (the native inhabitants of Brazil). It is necessary to have a better understanding about the distribution profiles of the mutations in the world's populations so that, finally, we can draw a better profile of the pathology and infer about appropriate treatments for each distinct population.

KEY-WORDS: Population Gene Profile; Distribution Of Mutations; Phenotype-Genotype Inference.

INTRODUCTION

The evolutionary and human-dispersed history of migration from Africa is one of the most complex paths yet to be fully understood by modern science (QUINTANA-MURCI, 2016). It is known that the most recent territory occupied by the hominids in their pilgrimages was South America (SENE, 2013). Around 1500, new exploratory processes occurred again in this part of South America, giving rise to the tri-hybrid

characterization of the Brazilian nation - Europeans, Amerindians and Africans (BONINI-DOMINGOS, 2009). This composition is one of the important indications of the genetic heterogeneity of the Brazilian population, taking into account the characterization of a conspicuous pattern of genetic pathologies associated with these migratory processes (BONINI-DOMINGOS, 2009).

Genetic factors associated with the pre-disposition to the inheritance of complex diseases have been attenuated in researches of the last century. This interest merges between the search for genetic factors that make a distinct biological characteristic and the development of tools necessary in the search for punctual polymorphisms and in the better understanding of the structure of deoxyribonucleic acids (DNA) (SMITHIES; WALKER, 1955; GUSELLA et al. ., 1983).

In this sense, it is verified that heredity proposes an etiological factor for the characterization and determination of the nature of diseases, being, therefore, these usually caused by one or a few genes, often associated to certain genetic profiles population as to its genetic composition and polymorphism (LINS, 2007). A class of genetic pathologies often dependent on the population genetic composition are the Inborn Errors of Metabolism (EIM), which comprise genetically determined and inherited autosomal recessive (AR) diseases - we note its occurrence due to a specific enzymatic defect. They are characterized by a blockage in a metabolic pathway, causing the accumulation of an initial substrate, deficiency of the reaction product or even the deviation of the metabolic pathway with formation of another final product different from what should be formed, defects in small or large molecules (ARAÚJO, 2004).

Among the EIMs, a group of diseases called lysosomal deposits diseases (DDL) characterized by the accumulation of lysosomes products, forming several intracellular vacuoles (GREINER-TOLLERSRUD; BERG, 2013). In this group we can find mucopolysaccharidosis (MPS), in which there is an intralysosomal accumulation of Glycosaminoglycan (GAG), generated by the deficiency in the activity in an enzyme involved in the degradation of this molecule (WRAITH, 1995). The phenotypes established by MPS vary according to the enzyme involved and the accumulation of their respective GAG, including similar glycosidases and sulfatases (GREINER-TOLLERSRUD; BERG, 2013).

Mucopolysaccharidoses (MPS), the aim of this study is to highlight Mucopolysaccharidosis type I (MPS-I), associated with autosomal recessive mutations in at least 57 different sites in the IDUA gene (4p16.3), encoding the enzyme α -L-

iduronidase responsible for catalyzing the reaction that removes α -L-iduronate residues from heparan sulfate and dermatan sulfate during lysosomal degradation (DUDEK; WILEY, 2009).

MPS-I is a progressive systemic disorder, divided clinically into three types of syndromes: Hurler Syndrome, Hurler-Scheie Syndrome and Scheie Syndrome (CLARKE, 2016). Currently, the chemical representation has again divided it into only severe or attenuated, depending on the presentation of the patient's clinical symptoms (PASTORES et al., 2017). In severe MPS-I, babies do not appear to have problems at birth, however they may have nonspecific manifestations (SMITH, 2012). At the age of three years the symptoms are remarkable, especially the deep and progressive intellectual disability, hearing problems, and death due to cardiorespiratory problems in the first 10 years of life (PASTORES et al., 2017). In the attenuated form, deaths usually occur only at 20-30 years of age, and, unlike the severe form, there are no problems related to psychomotor development in childhood (CLARKE, 2016).

To understand how the heterogeneity and miscegenation of nations can change the relationship between ancestry and mutation profiles associated with MPS-I, it is necessary to analyze the mutations found in the present populations; aiming to understand the distribution profile of this genetic pathology in the population.

METHODOLOGY

The systematic review gathered articles from two major databases: ScienceDirect and PUBMED from the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The search was done by means of the combination of keywords: Mucopolysaccharidosis type I, Populational mutations, mutations, shown in Table 01. As inclusion criteria, articles were selected that referred to profile of association between populations and mucopolysaccharidosis type I. Any other data or articles that did not live up to these inclusion criteria were excluded, totally avoiding the theme proposed in the present study or not directly related to the Mucopolysaccharidosis.

From the total articles, a selection was made selecting those that demonstrated information with relevance to the experimental and scientific scope, excluding duplicates related to the same line of research, removing the excess of complementary

information and attenuating to the complementarity of information that concerned. The surveys were conducted on December 12, 2017 to January 24, 2018.

Table 1: Words combination

DATABASE	SEARCH STRATEGY
SCIENCEDIRECT	“MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I”
	“MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I” AND “POPULATIONAL MUTATIOS”
	“MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I” AND “MUTATIONS”
NCBI	“MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I”
	“MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I” AND “POPULATIONAL MUTATIOS”
	“MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE I” AND “MUTATIONS”

(SOURCE: Autor)

RESULTS

A total of 87 articles from the ScienceDirect platform and 76 from the NCBI platform were initially found and selected, subsequently revised resulting in the total described below. We selected a total of 63 articles involving research and reviews related to the topic, distributed as follows: 18 articles of the ScienceDirect platform and 45 articles of the NCBI platform, distributed in the categories described in the table below.

The articles selected to compose the results and discussion of the present study were classified according to the established criteria and the content present in its development, being able to be evaluated in 12 different categories, being the number 1 indicative of the "presence" and the number 0 indicative of the "Absence" of a certain pre-established characteristic (GREENHALGH, 1997; MCDERMID et al., 2009). The twelve criteria used were: 1. Thorough review of the literature to define the research question; 2. Specific inclusion/exclusion criteria; 3. Specific assumptions; 4. Appropriate scope of psychometric properties; 5. Sample size; 6. Follow-up; 7. The authors referred specific procedures for administration, punctuation and interpretation of procedures; 8. Measurement techniques were standardized; 9. Data were presented for each hypothesis; 10. Appropriate statistics-timely estimates; 11. Appropriate statistical error estimates; 12. Valid conclusions and clinical recommendations.

MENNI et al., 2012	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
MUENZER, 2011	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	87,50%
NEUFELD&MUENZER, 2001	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	87,50%
O'ROURKE&RAFF, 2010	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	87,50%
PASTORES et al., 2017	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
PEDROSA, 2006	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	87,50%
PEISCHL et al., 2016	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
PENA et al., 2010	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
PENA; 2002	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	87,50%
PIERRE, 2017	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	87,50%
PINEDA et al., 2014	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
QUINTANA-MURCI, 2016	1	NA	NA	NA	1	NA	1	1	1	1	1	100%
REIS, 2008	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1	1	100%
SAÍNZ&MONTEAGUDO, 2002	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	100%
SCHUH et al., 2017	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
SENE, 2013	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	1	1	100%
SILVA, 2017	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
SKOGLUND&REICH, 2016	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	88%
SMITH, 2012	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
SMITHIES; WALKER, 1955;	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	87,50%
VIEIRA et al., 2008	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
VOLODKO et al., 2008	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
VOSKOBOEVA et al., 1998	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
WATERS&STAFFORD, 2007	1	NA	NA	NA	1	NA	1	1	1	1	1	100%
WERTHEIM-TYSAROWSKA et al., 2015	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	100%
WRAITH, 1995	1	NA	NA	NA	0	NA	1	1	1	1	1	100%

Abbreviations: NA, not applicable to paper; 1, presence; 0, absence.

* Evaluation criteria: 1. Thorough review of the literature to define the research question; 2. Specific inclusion / exclusion criteria; 3. Specific assumptions; 4. Appropriate scope of psychometric properties; 5. Sample size; 6. Follow-up; 7. The authors referred specific procedures for administration, punctuation and interpretation of procedures; 8. Measurement techniques were standardized; 9. Data were presented for each hypothesis; 10. Appropriate statistics - timely estimates; 11. Appropriate statistical error estimates; 12. Valid conclusions and clinical recommendations.

DISCUSSION

Human Evolution

The evolutionary history of modern humans is much more complex than just a study of their demographic past. In order to understand in an intrinsic way the processes that led our ancestors to the present moment, an understanding at the genetic level is

necessary. From this, the phenotypic and genotypic variations of the human populations serve as a basis to try to know the different processes of genetic adaptation and their relation with the surrounding environment (QUINTANA-MURCI, 2016).

From the conquest of new territories by modern man from Africa - according to the theories raised since Seilstad and collaborators (1999) -, expanding territorially to Asia, Europe, Oceania and, finally, the Americas; there was a morphological diversification and phenotypic character of the resulting processes of adaptation to changing climatic, environmental and technological conditions, allowing, for example, the establishment of agriculture and abandonment of nomadic culture (BARROS, 2006).

One of the main genetic characteristics of this territorial conquest was genetic fluctuation. We call genetic fluctuation the process by which alleles of certain populations are lost or fall into decline in comparison to others in a given population (Fig. 01). When we turn to population observation, certain profiles allelic frequencies are set at different continental areas, which can finally be used for evolutionary and historic building a particular location by analyzing these characteristics and allele frequencies within that particular population (Peischl et al ., 2016).

It is possible to verify the genetic profile of a given population, thus making a characteristic constitution of the world's populations and studying its territorial expansion based on the characterization of the genetic profile of interest (QUINTANA-MURCI et al., 2016).

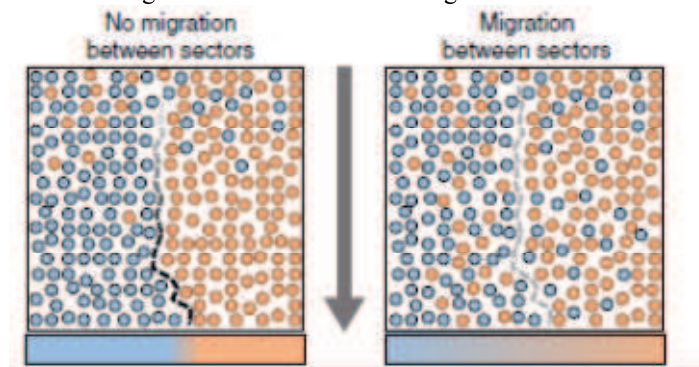
One of the most formidable examples regarding the characterization of the population genetic profile related to the history constitution in the colonization process is Brazil, located in South America. And, more interestingly, how this constitution is reflected in the genetic profile of the inhabitants of the Brazilian population even in the characterization of certain pathologies.

Settlement of America

In order to understand how the process of formation of the Brazilian people took place, it is necessary to understand, firstly, the process of occupation of the Americas by a dispersal route made by humans from Africa (Fig. Leaving Africa, there is a dispersion of human groups across the Asian continent, stretching eastward to finally reach the region of the present Strait of Beiring, and can expand in the then uninhabited Americas. One of the factors that contributed to this dispersal was the last glaciation that occurred about 20 thousand years ago, characterizing geological profiles of water

catchment by glaciers and low in the global level of the oceans by approximately 120 meters (REIS, 2008).

Figure 1: Population processes. The two-dimensional pictures expound the population processes in a direction from top to bottom. In areas where migratory processes occur at low frequency (left panel) territorial expansion leads to the establishment of an allele within the population. Dashed lines indicate the intensity of allelic differentiation between sectors. In the right panel, where the migration index is more accentuated with new colonization areas, there is a greater genetic variety presenting a low rate of genetic differentiation among the sectors.

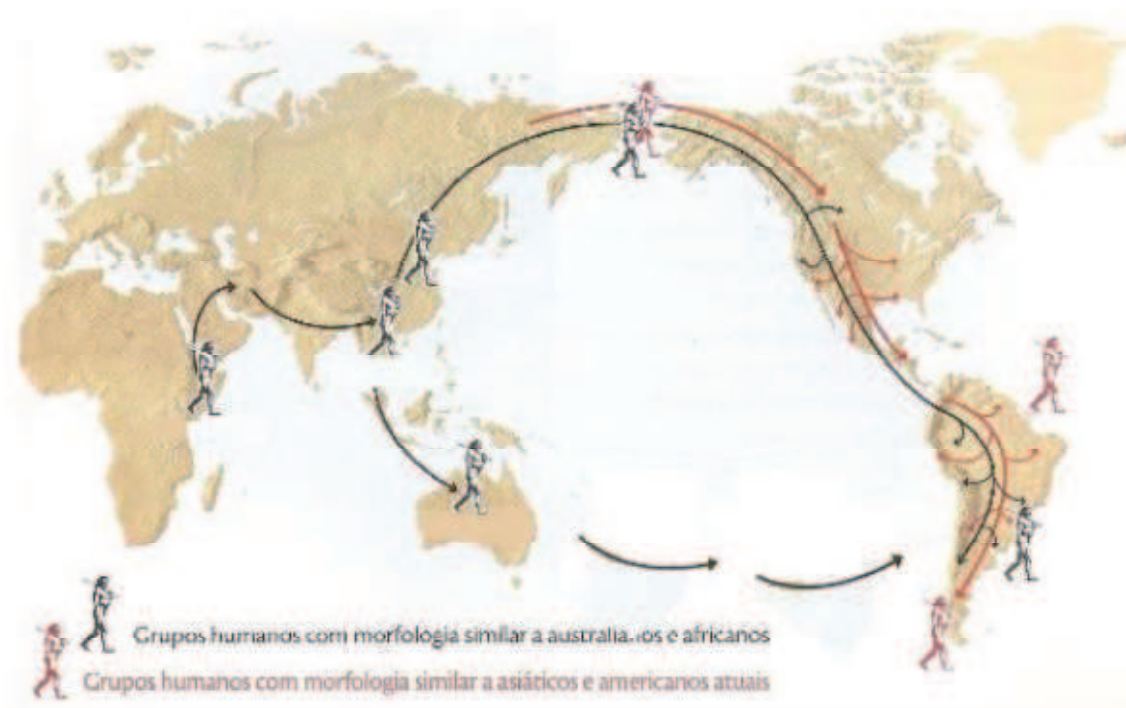


(Source: Peischl et al., 2016).

A huge ice platform connecting Siberia and Alaska was formed; the low oceanic levels of the Bering and Chukchi allowed the migrations to the New World (VOLODKO et al., 2008).

In Figure 02 we can also observe alternatives made by modern humans routes in the new territories occupation process. Although little discussed, such displacements by the Pacific Ocean coast and migrations from Africa via the Atlantic Ocean were also used, as evidenced by archaeological evidence as a tool for understanding this process (SENE, 2013).

Figure 2: Migratory movements of human groups



(Source: modified from SENE, 2013)

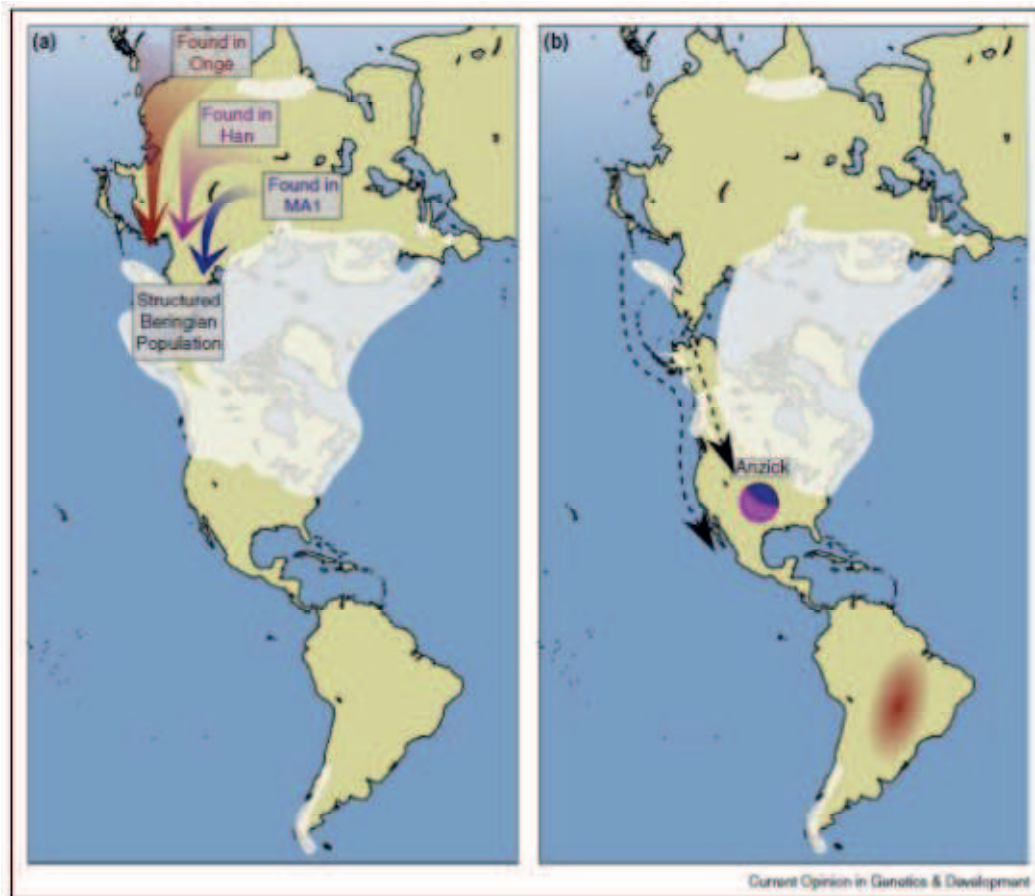
When we refer to the period of colonization of the Americas dating from the Pleistocene, we observe that the origin of the Amerindians came from an Asian origin. With the use of the genetic profiles of the populations studied through the analysis of the so-called molecular markers, a close relationship can be observed between these two characteristic peoples (O'ROURKE & RAFF, 2010).

One of the most accepted hypotheses today about the processes of colonization is by the Native American ancestry derived from a single population separated from the Eurasian populations. One of the strongest evidences of this hypothesis was the genomic sequence of a child (Anzick-1) dated in more than 12,600 years. This finding was consistent with the genetic profile of the findings of the populations of Central and South America (Fig. 03) (SKOGLUND & REICH, 2016).

In the scientific community are officially accepted two hypotheses of colonization of South America: 1) The Clovis hypothesis; and 2) the pre-Clovis hypothesis. Knowing that the colonization of the New World occurred from the passage of the Beiring Strait, being first reached the lands in which today the United States of America is located, passing quickly by a migratory population advance towards Central America and South America, some archaeological sites that do not date the age of the

Clovis findings emerged by making theoretical contrasts, separating the two theories (Waters & Stafford, 2007).

Figure 3: Populations of the first Asian American Euro-Asian source. (a) Genetic evidence suggests that these lineages of populations were present in Northeast Asia and contributed to the ancestry of present-day Native Americans. These comprise people with ancestry related to the current Andamanese and Austral-Melanesians (red), people related to the East Asian present, such as the Chinese Han (pink), and people related to Mal'ta son of 24 thousand years buried near the Lake Baikal (dark blue). For 12,600 years, the forefathers of Mal'ta-Buret 'culture and Eastern Asiático were present in the proportions found in Native Americans today. (b) There is an ancestry related to the Andamanese and the current Amazonian



(Source: SKOGLUND&REICH, 2016).

The model of the Clovis hypothesis evidences the movements initiated in the Amazonian vicinity and extending throughout the South American continent in a progression from the dating of the archaeological sites dated to the Anzick-1 evidence (Fig. 04) (LAHAYE et al. ., 2013).

Figure 4: Map of South America showing the archaeological sites found in support of the Clovis hypothesis.



(Source: LAHAYE et al., 2013).

In 1989 Dillehay reported an archaeological find in Monte Verde, Chile, with an older dating of the findings of Clovis, bringing up the question of the reliability of the inhabitants of Clovis were the first to populate the Americas. This alternative theory suggested the hypothesis that the first settlements came for an alternative route through the Pacific Ocean for more than 14,100 years ago (PIERRE, 2017).

Apart from the main questions of the colonization of the first peoples of America, there are finally modern processes of colonization that contributed to the construction of the genetic profile of the Brazilian population.

Formation of the Brazilian people

Around the year 1500 A.D. with the advent of the great navigations, Alvares Cabral landed in Pedro Brazilian lands and was faced with a population of approximately 2.5 million Amerindians. After approximately 34 years after the discovery of Brazilian lands, immigrants from France, Holland, Spain, and, mainly, Portuguese created an immigration route for the newly discovered Brazil (BARROS, 2006).

It is well known that the approximate number of immigrants reached an expressive number of five million new immigrants, with a greater proportion

represented by the Portuguese, secondarily the Italians, and followed by the other nations mentioned above (PEDROSA, 2006; MACHADO, 2012).

With the fixed residence of some Portuguese and immigrants in Brazil, there were processes of miscegenation among the peoples, one of the classic examples of the processes of miscegenation: the origin of the so-called Mamluk, a mixture between Europeans and Indians (FAUSTO, 1996).

With the processes of exploration of the new lands, the necessity of manpower appears. As an alternative, the Portuguese peoples brought from Africa a new genetic constitution for Brazil. At the end of the colonial period there was a significant presence of Africans in the colony, representing about 75% of the population of Minas Gerais, mainly used for labor in the garimpo; 68% of Pernambuco, used as labor in the cane fields; 79% of Bahia and 64% of Rio de Janeiro - Salvador and Rio de Janeiro being the main places of Brazilian territorial occupation in colonial times due to their representation as capital (FAUSTO, 1996; MACHADO, 2012). The meeting of these peoples generated new miscegenations between Africans and Europeans, called mulatto, and between Africans and Amerindians, called cafuzo (FAUSTO, 1996). And then, finally, Brazil reached its apex tri-hybrid known today, with the three main contributions in its genetic profile: European, African and Amerindian.

In the nineteenth century there was a last great immigration event with the opening of Brazilian ports to friendly nations. Other interesting facts about this heterogeneity are the insertion of Jews who lived in Portugal around 1509, bringing with them the European Y chromosome (LOPES, 2007).

The first large work carried out to identify this heterogeneous genetic profile of the Brazilian population was carried out by Pena (2002), identifying that the paternal lineage of the individuals of the population was almost exclusively European, while the maternal lineage was composed of Africans, Europeans and Amerindians. Alves-Silva et al. (2000) observed that the maternal lineage of the Brazilian population is divided mainly into two groups: European (from Portuguese colonization) and African (from African slaves). According to Carvalho-silva and collaborators (2001), the paternal lineage of the Brazilian population consists mainly of a European contribution, and distinct and insignificant Italian contributions (southeastern part of Brazil), Moroccan Jews (Amazon Region), Dutch 17th century invasions on the Northeastern coast), and small Amerindian and American contributions.

The population distribution was interfered by migratory processes, extending the area of occupation in Brazilian lands especially to the interior of the country and populating previously uninhabited places (MACHADO, 2012). Each Brazilian region was marked by distinct settlement processes, inferring at different times of colonization in the Brazilian territory (PENA et al., 2010).

Molecular Markers

In order to understand these processes within the population structure, the advent of classical markers based on protein and serological profiles was essential in the 80's. One of the greatest tools used today to understand these processes is the so-called Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), justified for being the most common type of genetic variation within a population, becoming an important mechanism for the understanding of population studies, whether of diseases, or historical and evolutionary of an individual. To this end, there is now an association called Genome Wide Association Studies (GWASs) responsible for setting up a database on disease correction and SNPs (LI et al., 2017).

In recent years there has been a greater focus for the identification of the frequency of SNPs in human populations. One of the main highlights of the collection of these data and the characterization of this frequency profile was the International HapMap Project which developed a database with the variations and frequencies of SNP within the human genome through a haplotype map.

From this mass information meeting, it can be seen that mutations within the human genome occurred by several factors, either by natural selection, or by the demographic location that the individuals of these populations were, making it possible to modulate the local variability of and provide a tool for the study for it (LEE, 2016).

There was then the establishment of allelic frequencies within the populations, inferring about the possible common ancestral of these. Today, we have an immense diversity of labels used to distinguish between global populations that assist in understanding the building population, migration processes and especially a better understanding of pathologies associated with populations (Kidd et al., 2014).

Thus, analyzes and correlations between pathologies and populations, susceptibility to diseases, and, undoubtedly, a better understanding of these migratory, evolutionary and population-based processes arise: the study with the Line Markers appears.

The characterization of these genetic profiles among populations is made possible by the presence of conserved genetic information (MACHADO, 2012). Recent studies reveal an association, depending on the specific geographic group or region, between ancestry and the occurrence of certain genetic diseases, raising the risk of susceptibility to certain diseases depending on these characteristics previously mentioned (HACHER et al., 2011).

Inborn Errors of Metabolism

The term "Inborn Errors of Metabolism" was proposed in 1908 by Sir Archibald Garrod from studies carried out on patients with alcaptonuria, pentosuria, albinism and cystenuria, in order to characterize these pathogenesis. One of the primary characteristics that caught the researcher's attention was the irregular concentration of metabolites in the body. This altered concentration guesses that there is no or even no enzyme in the metabolic cycle (SAÍNZ & MONTEAGUDO, 2002; BICALHO, 2015).

In the United States of America, births with this EIM profile are less than 1: 100,000 live births. However, in the United Kingdom, the occurrence of live births with this pathological profile reaches an estimated 20: 100,000 individuals (AHRENS-NICKLAS et al., 2015).

Most of these pathologies are characterized by an autosomal recessive (RA) profile that is usually present in families with a history of inbreeding among inbreeding individuals, increasing the susceptibility of offspring with EIM (MENNI et al., 2012). A rare genetic profile is the autosomal dominant trait, in which the parents have a 50% chance of transmitting the fined allele to offspring, however, there are cases of de novo mutations occurring in some patients with dominant autosomal profiles, resulting in a loss of function, directly affecting protein activity (WERTHEIM-TYSAROWSKA et al., 2015).

The EIMs are subdivided into three distinct groups: 1) EIMs that cause intoxication due to defects in intermediate metabolic pathways, resulting in an accumulation of toxic components and subsequent metabolic blockade; 2) EIMs that result in an energy deficiency, especially those that cause defects in the mitochondrial respiratory chain; and, finally, 3) EIMs that result in defects in the synthesis or catabolism of complex molecules in certain cellular organelles such as lysosomal deposits (DDL) diseases (EL-HATTAB, 2015).

Lysosomal Deposits Diseases

DDL incorporates an EIM group with mutations that may be present in more than 50 different genes, which characterize 50 distinct genetic diseases, resulting from defective products that accumulate within the organelle compromising the functioning of the cell as a whole, as well as the activity catalytic activity of the organelle itself (BELLETTATO et al., 2018).

Although rare, the frequency of DDL incidence varies by an estimated 1 in 4,000 or 9,000 live births, however, it is estimated that the number of cases may be even higher, especially since the symptoms most characteristic of the pathological profile of DDL are perceived when the child is already with an average of 8 to 10 years of age (EL-HATTAB, 2015). Among these manifestations we can cite, for example, neurocognitive decline, dysmorphism and musculoskeletal abnormalities (KIGMA et al., 2015).

It is necessary to emphasize that the clinical manifestations are the result of accumulation of the specific product in the organelle, besides the production sites and degradation of the metabolic residues, being able, therefore, the DDL to be classified as: sphingolipidoses, oligosaccharoses, mucopolipidoses, lipofuscinoses, glycoproteinoses and finally MPS (KADALI et al., 2004).

Mucopolysaccharidosis

As an objective of the present study, MPS stands out. A disorder that affects the enzymatic activity used in the degradation of GAG. These GAGs are polysaccharides used in the bone, cartilage, epidermal and various other body tissues. When there is an enzymatic defect in its metabolic pathway, degradation does not occur, resulting in a lysosomal accumulation responsible for the musculoskeletal manifestations of patients with MPS (GURANY, 2011).

In 1917, Dr. Charles D. Hunter first diagnosed MPS in two siblings who had short stature, noisy breathing, clawed hands, infiltrated faces, hepatospleniomegaly, and inguinal hernia (BICALHO, 2015). Later, around the 1950s, the innovation of biochemical and molecular diagnoses emerged, diagnosing that past case in what we now know as MPS type II or Hunter's Syndrome, in honor of its discoverer (BICALHO, 2015).

It is known that the MPS constitute a heterogeneous group of DDL, hereditary, characterized by the inadequate functioning or even the absence of lysosomal enzymes

necessary for the hydrolysis of GAG, previously known as mucopolysaccharide (fact that led to the denomination of the disease) (GURANY, 2011). In the absence of the degradation of these substrates, there is an accumulation of these in the cellular organelle influencing its functioning and later the functioning of the cell itself (VIEIRA et al., 2008).

GAGs are important connective tissue components, produced and stored on the cell surface or extracellular matrix, and may be associated with proteins, forming a larger molecule called proteoglycan or free molecules in monomeric forms (DANTAS, 2016). This proteoglycan macromolecule controls the flow of water and nutrients to the cell, since when in contact with water, they acquire a differentiated consistency that assists in the hydration and union of body tissues (LIMA, 2009).

In the extracellular matrix, these macromolecules of proteoglycans are degraded, generating as product: GAG (their monomers), and hyaluronic acid (GURANY, 2011). GAGs are transported to lysosomes where they undergo intracellular digestion. Within the organelle, four digestion routes are possible depending on the molecules that constitute GAG, however, to be completely digested, the enzymatic action of ten different enzymes is necessary, among them are the catalytic activity of glycosidases, sulfatases and transferases (COUTINHO et al. al., 2011).

The classification for MPS occurs from the enzymatic defect in the route of degradation and the accumulated product in lysosomal plasma (MUENZER, 2011). Table 3 shows the classification of MPS types and the relevant lysosomal accumulation.

The clinical manifestations for MPS are variable and compromise several organs. Chronic and progressive frames, especially the musculoskeletal impairment, changes in facial physiognomy, intellectual disability, skeletal dysplasia resulting from poor cell function, abnormal dentition, clouding of the cornea, retinoplastia, hearing loss, heart disease, recurrent respiratory infections, claw hand and several other manifestations seen in the literature, make up a totally heterogeneous picture (NEUFELD & MUENZER, 2001).

According to the MPS Brazil network, coordinated by the Medical Genetics Service of the Hospital das Clínicas in Porto Alegre, up to December 2012, 1001 Brazilian patients diagnosed with some type of MPS were registered, 195 with MPS-I, 300 with MPS-II, 137 MPS-III (if subdividing the branches being: IIIa - 38 patients; IIIb - 70 patients, IIIc - 29 patients), 124 MPS-IV (116 MPS-IVa and 08 MPS-IVb), 223 patients with MPS-VI and 12 with MPS-VII (BOCHERNITSAN, 2013).

Patients diagnosed with MPS can undergo ERT that slow the progression of the disease, improve systemic abnormalities and provide a better quality of life for patients (Schuh et al., 2017). In Brazil, the only types that have ERT are MPS I, II, IVa and VI (DANTAS, 2016).

According to Giugliani and collaborators (2017), among the most common DDL found in Brazil, MPS-I is in fourth place, with 225 cases diagnosed in Brazil, occupying the third most frequent type of MPS in the Brazilian territory with 19% of cases diagnosed in the country.

Table 3: Classification of MPS according to subtype, affected enzyme, gene and affected product.

PATOLOGIA	SUBTIPO	ENZIMA DEFICIENTE	GENE	GAG AFETADO
MPS-I	Hurler (H)	α -L-iduronidase		
	Hurler-Schie (H/S)	α -L-iduronidase	IDUA 4p16.3	Dermatan e Heparan sulfato
	Schie (S)	α -L-iduronidase		
MPS-II	Hunter	Irudonato sulfatase	IDS Xq28	Dermatan e Heparan sulfato
MPS-III	A	Heparan-N-sulfatase	SGSH 17q25.3	
	B	α -N-acetilglicosaminidase	NAGLU 17q21	
	C	Heparan acetil-CoA α -glucosaminidase	HGSNAT 8q11.1	Heparan sulfato
	D	N-acetiltransferase N-acetilglucosamina 6-sulfatase	GNS 12q14	
MPS-IV	Morquio A	Galactose 6-sulfatase	GALGANS 16q24.3	Keratan e codoitrin sulfato
	Morquio B	β -galactosidase	GLB1 3p21.33	Keratan sulfato
MPS-V	A princípio Síndrome de Schie, depois descobriu-se uma deficiência na α -L-iduronidase e perfis de deficiência alélica como na Síndrome de Huler.			
MPS-VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilglucosamina-4-sulfatase	ARSB 5p11-q13	Dermatan sulfato

MPS-VII	Sly	β -glucuronidase	GUSB 7q21.11	Dermatan, keratan e condroitin sulfato.
MPS-VIII	Utilizado para diagnosticar um paciente com deficiência de glicosamina-6-sulfato com características clínicas para a Síndrome de Morquio e Sanfilippo. O relatório foi posteriormente constatado e o termo não é mais utilizado.			
MPS-IX	Natowicz	Hialuronidase	HYAL 3p21.3	Ácido Hialurônico

(Souce: DANTAS, 2016)

In the Northeast, of the 572 DLL diagnoses, 55 are in Paraíba, the fourth state with the highest incidence in the Northeast, preceded by Ceara, Bahia and Pernambuco (GIUGLIANI et al., 2017).

Mucopolysaccharidosis type I

MPS-I is an AR inheritance disease, caused by the total or partial deficiency of the α -L-iduronidase enzyme (IDUA), which results in impairment of heparan and dermatan sulphate degradation, causing an accumulation of these substrates intramembrane in the lysosomes . As phenotypic outcomes and clinical manifestations may cite multisystem disorders such as corneal opacity, musculo-skeletal disorders, muscle contractures and hepatosplenomegaly and typical facial pattern (HEPPNER & CLARKE, 2011).

Symptoms usually appear in a relative ages of two and ten years old when it starts sharply the accumulation of GAG (GREINER-TOLLESRUUD / BERG, 2013). The MPS-I can be classified into Hurler syndrome, Hurler syndrome, Scheie and Scheie syndrome, or according to their clinical manifestation: attenuated and severe forms. In the attenuated form, patients have normal psychomotor development in the first ten years of life, demonstrating progressive cadres of cognitive disabilities as they become older. The carriers of the severe form of MPS-I have multiple disorders, hearing loss, intellectual disability and abnormal psychomotor development in the first years, leading to death in the first decade of life (MELBOUCI et al., 2018).

The way the disease progresses occurs by accumulated substrate GAG intracellularly (affecting lysosomes and organelles perimeter), extending the damage to the extracellular matrix (the accumulation of the substrate influences in several

metabolic pathways used in the distribution patterns of the factors growth during cell differentiation processes and innate immune response) and reflected phenotypically, e.g., in the short stature patients, caused by systemic damage during skeletal growth (Pedrosa et al., 2002).

The changes are subtle in the severe form and appear around six months of life, among them are macrocephaly, hernias, limited mobility of the hip, noisy breathing and frequent infections in the respiratory tract. In other attenuated cases, the onset of symptoms occurs at the age of five and most diagnoses occur between 10 and 20 years of age (SMITH, 2012).

It is worth mentioning that early and accurate diagnosis is a critical point, especially with regard to a specific effective therapy for the disease. When not diagnosed early, the chances of a good survival are critical (GIUGLIANI et al., 2010)

Epidemiological Aspects (MPS-I)

MPS-I has a variable population incidence: In Portugal, for example, the estimate is 2.7: 100,000 live births; Ireland has an incidence of 1.6: 100,000 live births, reaching close to 1.7: 100,000 in the United Kingdom; in Germany, the incidence reaches 1: 145,000 live births - one of the lowest frequencies, losing only to Tunisia with an incidence of 0.63: 100,000; finally, in Brazil, the incidence for MPS-I patients reaches 1: 106,000 live births (SILVA, 2017).

The difference in the incidence of the disease in some populations can be explained by the composition of the population genetic profile, since this construction took place through distinct evolutionary events, demography and migratory processes. In a study by Chkioua et al. (2011) in Tunisia, the association between patients with MPS-I and consanguinity was reported. One of the main factors that guarantees, to a certain extent, less genetic variability within a population are the so-called inbreeding marriages that result in a higher rate of recessive characteristics within a group, generating an accumulation of characteristics - resulting from low rates of variability genetics - which may result in genetic diseases (MACHADO, 2012). Recent studies reveal an association, depending on the specific geographic group or region, between ancestry and the occurrence of certain genetic diseases, raising the risk of susceptibility to certain diseases, being one of the most common examples of EIM (MACHADO, 2012; HABER et al. , 2011).

Genetic and Molecular Aspects (MPS-I)

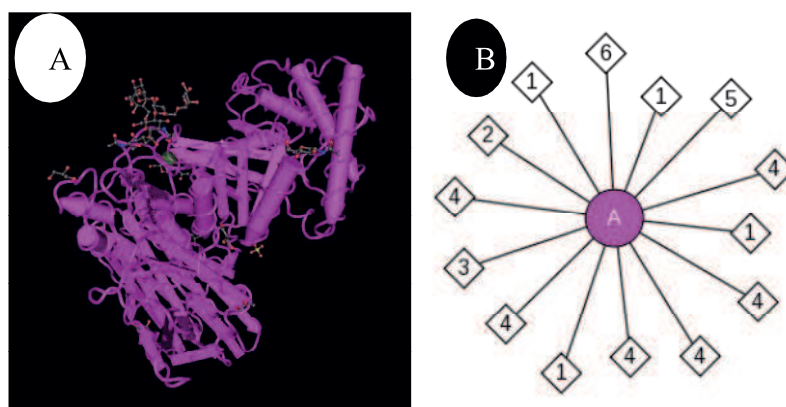
For a better understanding of the effects caused by the mutations that characterize the pathological picture of MPS-I, it is necessary to have an overview at the gene level, especially with regard to the mutations occurring in the IDUA gene and finally, the expressiveness of the clinical symptoms through a phenotypic and physiological characterization of the carriers (GIUGLIANI et al., 2010).

IDUA Gene

The IDUA gene is located in the short arm of chromosome 4, locus 4p16.3 and has about 19Kb, consisting of 15 exons that form the α -L-iduronidase enzyme mRNA (HGMD, 2016), among which, in exons 2 and 3 there is an intron with an approximate size of 13kb, possibly the largest intron found in the IDUA (LACOMBE & GERMAIN, 2014). The enzyme encoded by this gene, the α -L-iduronidase (Fig. 12a), has a chain of 653 amino acids, wherein, among these, 26 are immediately cleaved at the amino-terminal portion, resulting in an approximate size of protein 74 kD, revealing an enzymatic structure with sites of chemical interaction with six different chemical molecules (MADEJ et al., 2013; LACOMBE & GERMAIN, 2014).

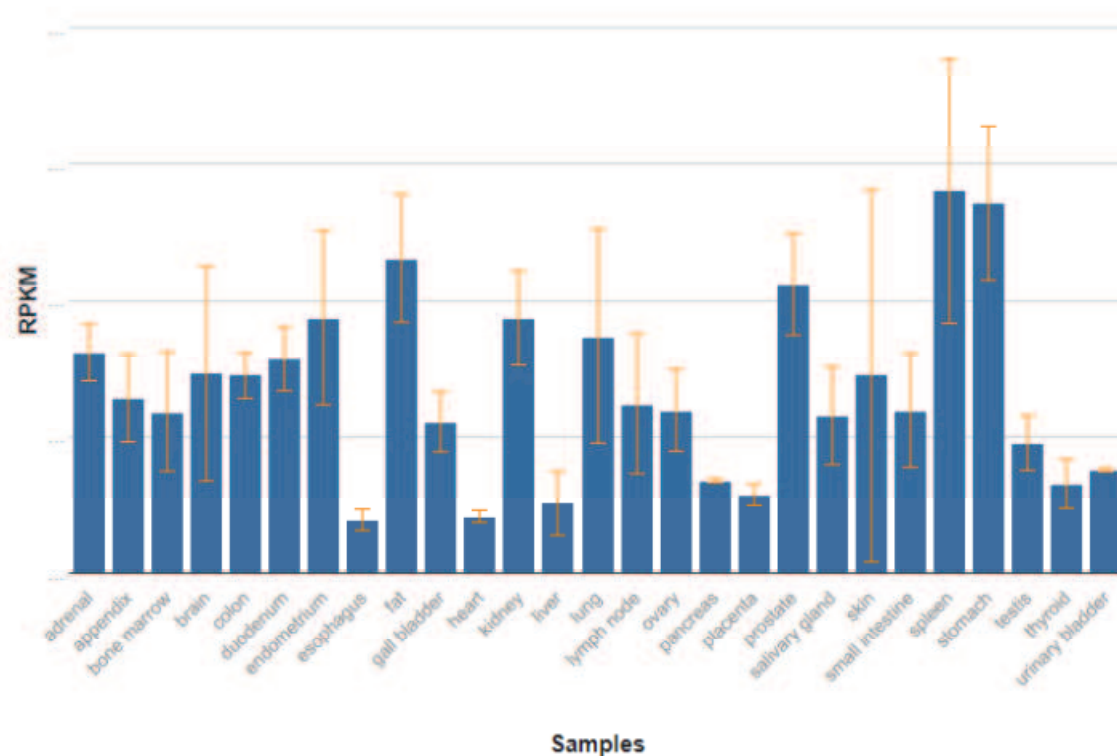
One reason that there is a systemic disorder in patients with MPS-I is given by the expression and enzymatic activity in various parts of the human body (Tab. 04). This leads us to the multisystem effects caused by the mutation, bringing a better understanding of the severity of MPS-I (FAGERBERG et al., 2014).

Figure 5: (a) Crystalline structure of the enzyme α -L-iduronidase. (b) Sites of chemical interaction in the α -L-iduronidase molecule: (1) N-Acetyl-D-Glycosamine; (2) β -D-Mannose; (3) α -D-Mannose; (4) Glycerol; (5) Chloro Ion; (6) Ion sulfate



(SOURCE: NCBI < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4OBS>> Acessado em: 26/03/2018)

Table 4: Levels of expressivity of the α -L-iduronidase enzyme in body tissues. The graphite is shown in the X axis the extraction sites of the samples and in the Y axis the expressiveness of the enzyme.



(SOURCE: NCBI < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3425> > Acessado em: 26/03/2018).

Relative mutations and frequencies

By 2016, more than 222 pathogenic mutations have been reported for the IDUA gene (HGMD, 2016). Among these, we found the nonsense mutations as more frequent exchanges, followed by splice regions, deletions and insertions, totalizing a very diversified picture (KWAN et al., 2015).

The associated p.W402X, p.Q70X and P533R mutations were identified as being the most common for patients with a European ancestry, in which the Italian frequency for the W402X mutation reaches 11% and 55% for Australian offspring; the British present a frequency of 7% for the mutation Q70X, different from the Scandinavian people that reach 65% of frequency (VOSKOBOEVA et al., 1998; AZAB et al., 2016). According BREMER and colleagues (2011), these mutations can often be associated with the diagnosis of severe forms of MPS-I.

Nonsense mutations that insert a stop codon resulting in a deficient enzyme: p.Trp402 - most frequently characterized - and p.Gln70, a relative frequency of 37% to 48% can be observed for p.Trp402 and 19% to 35% in cases of p.Gln70 in European

populations; and in the Nordic populations - such as Finland - the allelic frequency of p.Gln70 reaches 62-84%; unlike the Asian profile, such as Japan, in which the most frequent mutations are c.704ins5 (not found in Europe) and p.Arg89Gln, which can be frequently associated with a genotype-phenotype relationship with Schie syndrome (LACOMBE & GERMAIN, 2014).

In Tunisia, p.P533R, p.R628X and p.F02X mutations were found in patients with MPS-I (CHKIOUA et al., 2007). Note that the p.P533R mutation, for example, directly affects the conserved domain of the glycohydrosylase superfamily and substitutes a proline for an arginine at position 533 of the α -L-iduronidase enzyme (ATÇEKEN et al., 2016). It is possible that the mutation p.P533R is probably of African origin in its northern region and, by processes of territorial occupation, may have spread to the northern part of the European continent, in which it is high frequency, as previously explained (BERTOLA et al., 2011).

In the Peruvian population, 42% frequencies were identified for the W402X mutation, followed by mutations in A327P, E404X, Arg48del (correlated to Hurler syndrome patients) and R89W (correlated with patients with Hurler-Schie Syndrome (PINEDA et al., 2014).

Splices in the IDUA gene result in mutations. One of the most common examples, reported previously for p.Q70X, where a g.5862C> T mutation occurs which is often associated with the Hurler Syndrome phenotype; Another alternative splice common in MPS-I is demonstrated in the g.21632G> C mutation that changes intron 12, generating a premature termination codon, or nonsense mutation (1728insGTCC) (BREMER et al., 2011).

From the above-mentioned mutations, there is a phenotypic and clinical manifestation that together with the molecular diagnosis generates a greater reliability in the designation of which type of MPS-I (Hurler, Scheie, Hurler-Scheie) and what severity (mild or severe) that it presents itself in patient-carriers.

Clinical Aspects

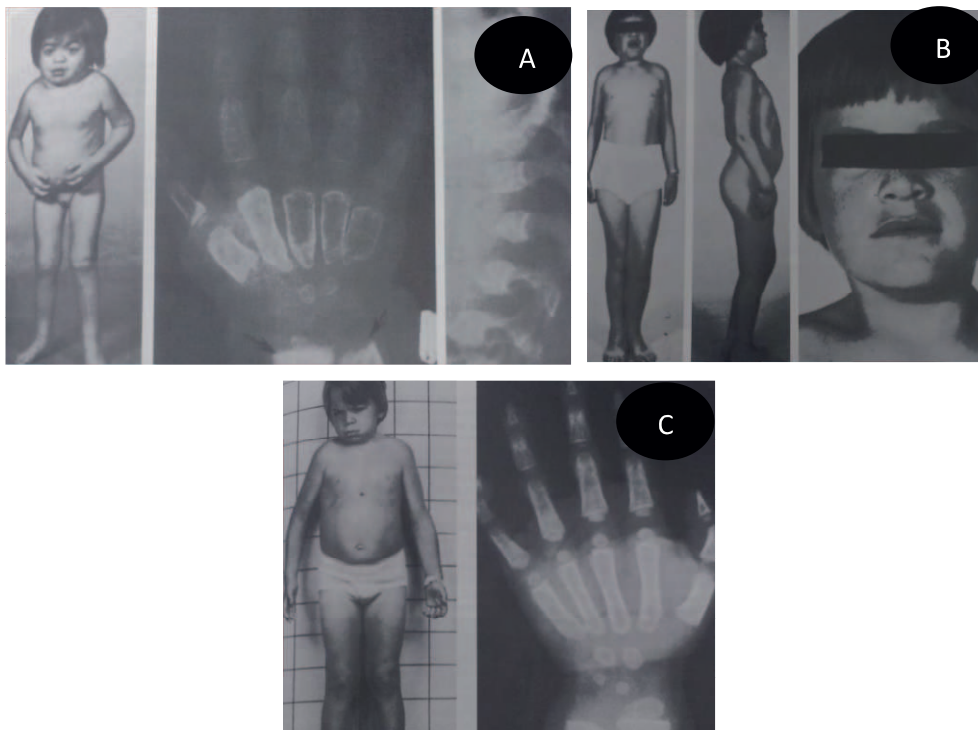
There is no biochemical standardization for such a specific classification, however, theories about the phenotype-genotype relationship associated with the classification for MPS-I have been continuously developed, even though there is no consensus regarding the constitution of this standard clinical-molecular classification (NEUFELD & MUENZER, 2001).

Hurler's syndrome (Fig. 6a) was first described in 1919, in which it was characterized as a faster growth than usual in the first years of life with a later delay (PASTORES et al., 2007). At six months of age subtle changes in the face appear, macrocephaly, hernias, limited mobility of the hips, noisy breathing and infections of the respiratory tract; with accumulation of the substrate, there is an obstruction of the upper airways that can lead to sleep apnea and severe respiratory compromises; It may also be one witness odontoid hypoplasia with or without C1-C2 dislocation (Fig 6a). (NEUFELD; Muenzer, 2001). In the second half of life there is an almost stationary period of progression of physical and mental development and can occur death of patients due to respiratory or cardiac complications, resulting in a life expectancy of up to 10 years (PASTORS et al., 2007).

In Scheie syndrome (Fig. 6b), the onset of symptoms often occurs after five years of age, of which, in most cases, the diagnosis is only made with an average of 10 and 20 years of age (PASTORES et al. , 2007). Symptomatology includes micrognathia (retracted chin and bite), corneal opacity, multiple dysostosis, joint contractures, auditory complications, umbilical and umbilical hernia; aggravated by late diagnosis, performed only when the cardiac and respiratory problems that the substrate accumulation causes, in an age group of 10 and 20 years (Smith, 2012). Occasionally there may be an increase in volume of the optic disc, narrowing of the carpal tunnel that may cause compression of the median nerve, mental deterioration and psychoses, discreet growth impairment, hearing loss, hepatomegaly, macroglossia, glaucoma, myopia , sleep apnea and cystic, just-articular, progressive lesions on the hands and feet (SMITH, 2012).

In 1976 the definition of Hurler-Scheie Syndrome (Fig. 6c) was defined by Stevenson et al. (1976). The progression of the clinical aspects occurs in such a way as to interact in an intermediate way between the Hurler Syndrome and the Scheie syndrome, in which the symptoms occur between 3 and 8 years of age, with a survival beyond 20 years of age, of which the first clinical aspects appear mainly in late childhood and early adolescence with corneal opacification, joint limitations, cardiac valvular abnormalities and auditory impairment (SMITH, 2012).

Figure 6: A) 3-year-old child presenting with Hurler Syndrome. Radiographs show large, irregular bones, especially in metaphyses. The thoracic and lumbar vertebrae are short with a previous crosstalk. B) Scheie syndrome. Child 9 years and 9 months old and 9 years old. Moderate limitations of movements of the shoulders, elbows and hands. C) Hurler-Scheie syndrome. Boy presenting slightly altered face and joint limitations that are more evident in the elbows and fingers. To the right discrete changes in the type of multiple dysostosis in the hands.



(SOURCE: SMITH, 1988)

FINAL CONSIDERATIONS

Through the analyzed data, we can assume an accurate relationship between phenotype-genotype of the patients, corroborating with the idea that there is a genetic predisposition for the severity of Mucopolysaccharidosis, although further studies need to be performed to confirm our assumptions. As seen in the previous pages, new studies involving ancestry of patients with MPS-I are necessary to confirm the already registered data, since the incidence rate of this disease is extremely low in the population. Through the analysis of these data, one can infer about better therapeutic measures that helped the patients with a better survival.

AUTOR CONTRIBUTION

Montenegro was responsible for all written text. Santos-Lopes reviewed all the information contained in the article.

CONFLIT OF INTEREST

The authors report that there was no conflict of interests in the production of this article.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

AHRENS-NICKLAS,, Can. Adolescent Presentations of Inborn Errors of Metabolism. *Journal Of Adolescent Health*

ALVES-SILVA, Juliana et al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *The American Journal Of Human Genetics*, [s.l.], v. 67, n. 2, p.444-461, ago. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/303004>.

ARAÚJO, Alexandra Prufer de Q. C.. Doenças Metabólicas com manifestações psiquiátricas. *Revista de Psiquiatria Clínica*, [s.l.], v. 6, n. 31, p.285-289, out. 2004.

ATÇEKEN, N. et al., Evaluation and identification of IDUA gene mutations in Turkish patients with mucopolysaccharidosis type I. *Tubitak*, v.46, p.404-408, 2016.

AZAB, Belal et al. Novel frameshift variant in the IDUA gene underlies Mucopolysaccharidosis type I in a consanguineous Yemeni pedigree. *Molecular Genetics And Metabolism Reports*, [s.l.], v. 12, p.76-79, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.06.001>.

BARROS, J. E. X. S. Diversidade haplotípica de microssatélites do cromossomo Y humano na população de Pernambuco, Nordeste do Brasil. UFPE: Recife, 2006.

BELLETTATO, Cinzia Maria et al. Inborn Errors of Metabolism Involving Complex Molecules. *Pediatric Clinics Of North America*, [s.l.], v. 65, n. 2, p.353-373, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.011>.

BERTOLA F., FILOCAMO M., CESATI G et al., IDUA mutational profiling of a cohort of 102 European patients with mucopolysaccharidosis type I: Identification and characterization of 35 novel α -L-iduronidase (IDUA) alleles. *Hum Mutat.* V.6,p.2189-2210, 2011

BICALHO, C. Avaliação do comprometimento auditivo em pacientes com Mucopolissacaridose. FIOCRUZ: Salvador, 2015.

BOCHERNITSAN, A. N. Distribuição geográfica de Mucopolissacaridose tipo IV no Brasil através de estudos moleculares para identificação de mutações patogênicas e polimorfismos no gene ARSB. 2013. 34f. Trabalho de conclusão de curso – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BONINI-DOMINGOS, Claudia R.. As hemoglobinopatias e a diversidade genética da população brasileira. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [s.l.], v. 31, n. 6, p.401-401, jan. 2009.

BREMER, Sara et al. A novel mucopolysaccharidosis type I associated splice site mutation and IDUA splice variants. *Molecular Genetics And Metabolism*, [s.l.], v. 104, n. 3, p.289-294, nov. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.07.012>.

CARVALHO-SILVA, D. R. et al. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *The American Journal of Human Genetics*, v. 68, n. 1, p. 281-286, 2001.

CHKIOUA, L. et al. La mucopolysaccharidose de type I: identification des mutations du gène alpha-L-iduronidase dans des familles tunisiennes. *Archives de Pédiatrie*, [s.l.], v. 14, n. 10, p.1183-1189, out. 2007. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcped.2007.06.018>.

CHKIOUA et al. Hurler diseases (mucopolysaccharidosis type IH): clinical features and consanguinity in Tunisian population. *Diagnostic Pathology*, v.6, p.113, 2011.

CLARKE, L.A., HEPPNER. Mucopolysaccharidosis type I. Gene Reviews (online). University of Washington, Seattle, 2011. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1162>> Disponível em: Acesso em 21/11/16

CLARKE, L. A. The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. v.10. e.1, 2008.

COUTINHO et al., Glycosaminoglycan Storage Disorders: A review. *Biochemistry Research International*, 2011.

DANTAS, Mayla Aracelli Araújo. Ancestralidade de pacientes com mucopolissacaridose tipo III-c com marcador de linhagem: Análise do cromossomo Y. 2016. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

DUDEK, Ronald W.; WILEY, John E.. *Genética Humana Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

EL-HATTAB, Ayman W.. Inborn Errors of Metabolism. *Clinics In Perinatology*, [s.l.], v. 42, n. 2, p.413-439, jun. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2015.02.010>.

FAUSTO, B. *História do Brasil: Cobre, um período de mais de quinhentos anos, desde as raízes da colonização portuguesa até nossos dias*. São Paulo: Edusp. 1996

GIUGLIANI R. et al., Mucopolysaccharidosis I, II and VI: brief review and guidelines for treatment. *Mol Gen Biol*, v. 33, n.4, p. 589-604, 2010.

GIUGLIANI, Roberto et al. Relative frequency and estimated minimal frequency of Lysosomal Storage Diseases in Brazil: Report from a Reference Laboratory. *Genetics And Molecular Biology*, [s.l.], v. 40, n. 1, p.31-39, 16 mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0268>.

- GREINER-TOLLERSRUD, Ole Kristian; BERG, Thomas. Lysosomal Storage Disorders. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6177/>>. Acesso em: 17 maio 2016.
- GUARANY, N. R. et al. Mucopolysaccharidosis: Caregiver Quality of Life. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*. p. 1-7, 2015
- GUSELLA, J. F. et al.. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. [s.l.], v. 306, n. 5940, p. 234-238, 1983.
- HABER, Marc et al. MtDNA Lineages Reveal Coronary Artery Disease-Associated Structures in the Lebanese Population. *Annals Of Human Genetics*, [s.l.], v. 76, n. 1, p.1-8, 20 out. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-1809.2011.00682.x>.
- HGMD, The Human Gene Mutation Database. Disponível em: <<http://www.hgmd.org>>. Acesso em 30/11/2016.
- KIDD, Kenneth K. et al. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. *Forensic Science International: Genetics*, [s.l.], v. 10, p.23-32, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.002>.
- KINGMA, S.D. et al., Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders; challenges of screening. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, v.29, p.145-157, 2015.
- KWAK M.J. et al., Report of 5 novel mutations of the α -L-iduronidase gene and comparison of Korean mutations in relation with those of Japan or China in patients with muco/polysaccharidosis I. *BMC Medical Genetics*. 2016.
- LAHAYE, Christelle et al. Human occupation in South America by 20,000 BC: the Toca da Tira Peia site, Piauí, Brazil. *Journal Of Archaeological Science*, [s.l.], v. 40, n. 6, p.2840-2847, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2013.02.019>.
- LEE, Chang-yong. A model for the clustered distribution of SNPs in the human genome. *Computational Biology And Chemistry*, [s.l.], v. 64, p.94-98, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.06.003>.
- LI, Wan et al. Identification of susceptible genes for complex chronic diseases based on disease risk functional SNPs and interaction networks. *Journal Of Biomedical Informatics*, [s.l.], v. 74, p.137-144, out. 2017. Elsevier BV.
- LINS, Tulio Cesar de Lima. Impacto da Miscigenação na aplicação do HapMap para a População Brasileira Avaliado nos genes PTPN22 e VDR. 2007. 196 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2007.
- 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.

- MACHADO, T. M. B. et al. Migração, estrutura populacional, tipos de casamentos e doenças genéticas em Monte Santo – BA. Tese de Doutorado. 2012.
- MADEJ, Thomas et al. MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 42, n. 1, p.297-303, 6 dez. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1208>.
- MELBOUCI, Melodie et al. Growth impairment in mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics And Metabolism*, [s.l.], p.100-140, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.03.004>.
- MENNI, Francesca et al. Vaccination in children with inborn errors of metabolism. *Vaccine*, [s.l.], v. 30, n. 50, p.7161-7164, nov. 2012. Elsevier BV.
- MUENZER, Overview of the Mucopolysaccharidoses. *Reumatology*, v.50, p.4-12, 2011.
- NEUFELD, E. F.; MUENZER, J. The Mucopolysaccharidoses. In: *The online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill Companies, 2011, p. 3421-3452.
- O'ROURKE, Dennis H.; RAFF, Jennifer A.. The Human Genetic History of the Americas: The Final Frontier. *Current Biology*, [s.l.], v. 20, n. 4, p.202-207, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.051>.
- 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.
- PEDROSA, M. A. F., Composição genética de quatro populações remanescentes de quilombos do Brasil com base em Microsatélites e Marcadores de Ancestralidade. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, 2006.
- PEISCHL, Stephan et al. Genetic surfing in human populations: from genes to genomes. *Current Opinion In Genetics & Development*, [s.l.], v. 41, p.53-61, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2016.08.003>.
- 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
- PENA, S. D. J. *Homo Brasilis: aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro*. FUNPEC-RP, 2002
- PIERRE, Michelle de Saint. Antiquity of mtDNA lineage D1g from the southern cone of South America supports pre-Clovis migration. *Quaternary International*, [s.l.], v. 444, p.19-25, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.quaint.2017.05.054>.

PINEDA, Tatiana et al. Genotypic and bioinformatic evaluation of the alpha-1 -iduronidase gene and protein in patients with mucopolysaccharidosis type I from Colombia, Ecuador and Peru. *Molecular Genetics And Metabolism Reports*, [s.l.], v. 1, p.468-473, 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2014.10.001>.

QUINTANA-MURCI, Lluís. Genetic and epigenetic variation of human populations: An adaptive tale. *Comptes Rendus Biologies*, [s.l.], v. 339, n. 7-8, p.278-283, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2016.04.005>.

REIS, R.P. O tempo de pedra. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2008.
 SAINZ CM, MUÑOZ CZ, MONTEAGUDO AGQ. Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. *Rev Cubana de Pediatría*; v.74, n.1, p.68-76, 2002.
 SCHUH, Roselena Silvestri et al. Gene editing of MPS I human fibroblasts by co-delivery of a CRISPR/Cas9 plasmid and a donor oligonucleotide using nanoemulsions as nonviral carriers. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, [s.l.], v. 122, p.158-166, jan. 2018. Elsevier BV.

SENE, G.M. Caminhos pré-colombianos. *Revista de História*. Disponível em: <<http://www.revistadehistoria.com.br/secao/artigos/caminhos-pre-colombianos>>. Acessado em: 03/02/2016.

SILVA, Rhaisa Farias da. Mucopolissacaridose tipo I: Perfil genético-epidemiológico e análise de consanguinidade de pacientes no Estado da Paraíba. 2017. 50 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SKOGLUND, Pontus; REICH, David. A genomic view of the peopling of the Americas. *Current Opinion In Genetics & Development*, [s.l.], v. 41, p.27-35, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2016.06.016>.

SMITH, Lachlan J. et al. Effect of neonatal gene therapy on lumbar spine disease in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Molecular Genetics And Metabolism*, [s.l.], v. 107, n. 1-2, p.145-152, set. 2012. Elsevier BV.

SMITHIES, O.; WALKER, N. F.; Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature*. [s.l.], v. 176, n. 4496, p. 1265-1266, Dez 31, 1995.

VIEIRA, T. et a., Mucopolysaccharidoses in Brazil: What Happens From birth to biochemical diagnosis? *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 146A, n. 13, p.1741-1747, 2008.

VOLODKO, Natalia V. et al. Mitochondrial Genome Diversity in Arctic Siberians, with Particular Reference to the Evolutionary History of Beringia and Pleistocenic Peopling of the Americas. *The American Journal Of Human Genetics*, [s.l.], v. 82, n. 5, p.1084-1100, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.03.019>.

VOSKOBOEVA, Elena Y. et al. Molecular Genetics of Mucopolysaccharidosis Type I: Mutation Analysis among the Patients of the Former Soviet Union. *Molecular Genetics And Metabolism*, [s.l.], v. 65, n. 2, p.174-180, out. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/mgme.1998.2745>.

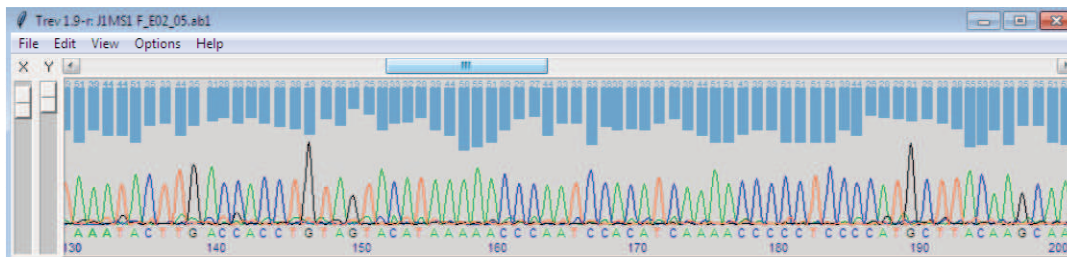
WATERS, M.R., STAFFORD, T.W., 2007. Redefining the age of Clovis: implications for the peopling of the Americas. *Science* 315, 1122e1126.

WERTHEIM-TYSAROWSKA, Katarzyna et al. GENETIC ANALYSIS IN INHERITED METABOLIC DISORDERS FROM DIAGNOSIS TO TREATMENT. OWN EXPERIENCE, CURRENT STATE OF KNOWLEDGE AND PERSPECTIVES. *Developmental Period Medicine*, [s.l.], v. 4, n. 19, p.413-431, 2015.

WRAITH, JE. The Mucopolysaccharidoses: a Clinicalreviewandguideto Management. *ArchivesofDisease in Chilhood*. v. 72, p. 263-267, 199

APÉNDICE II

APÊNDICE II – Eletroferogramas da região HRV de todos os indivíduos e os seus valores de confiança
(Phred)



(FONTE: Autor)