



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

ARIANI BATISTA NORONHA

ESTUDO DE ANCESTRALIDADE DA POPULAÇÃO ATENDIDA NA FUNDAÇÃO
ALFREDO DA MATTA

MANAUS
2019

ARIANI BATISTA NORONHA

**ESTUDO DE ANCESTRALIDADE DA POPULAÇÃO ATENDIDA NA FUNDAÇÃO
ALFREDO DA MATTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof^a Dr^a Fabíola da Costa Rodrigues

**MANAUS
2019**

ARIANI BATISTA NORONHA

**ESTUDO DE ANCESTRALIDADE DA POPULAÇÃO ATENDIDA NA FUNDAÇÃO
ALFREDO DA MATTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação 15/02/2019

Banca Examinadora:

Dr^a Fernanda Rodrigues Soares
Universidade do Estado do Amazonas

Dr^a Larissa Barros Muniz Orlando
Instituto de Criminalista - Polícia Civil

Dr^a Fabíola da Costa Rodrigues
Fundação Alfredo da Matta

**MANAUS
2019**

Ficha Catalográfica
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UEA)

Noronha, Ariani Batista

F62d

Estudo de ancestralidade da população atendida na Fundação Alfredo da Matta/ Ariani Noronha. - Manaus: UEA, 2019.

61 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Estadual do Amazonas, 2019.

Orientador: Profa. Dra. Fabíola da Costa Rodrigues

1.Ancstralidade- 2.Manaus- 3.AIMS- 4-Inde-
5.hanseníase I. Fabíola da Costa Rodrigues II.
Universidade Estadual do Amazonas III. Título

CDU 598.13(043.2)

Dedico este trabalho, a todos as pessoas que se fizeram presente em minha vida nesse período e acreditaram no meu potencial quanto à pesquisadora.

Dedicatória.

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus o principal responsável pelas oportunidades aparecidas e realizadas em minha vida.

À minha orientadora, Dra. Fabíola Rodrigues, pelo convite para se trabalhar com este assunto, e me permitir conhecer mais sobre o “mundo da genética” e por todo o conhecimento que me passou.

Ao Dr. Milton Ozório, e toda sua equipe do laboratório Lahan da Fiocruz-RJ, que me acolheram e me passaram um pouco dos seus conhecimentos. Em especial à equipe de ancestralidade, à doutoranda Ohanna Cavalcante, que me ajudou em todas as etapas, e esteve sempre disposta a tirar minhas dúvidas e contribuir para meu conhecimento, deixo meu agradecimento e admiração pela grande profissional que é na pesquisa. A Dra. Fernanda Manta, que levou essa técnica de trabalho com marcadores de ancestralidade para o laboratório, e a sua disposição em solucionar as dúvidas que surgiram no trabalho. A aluna de iniciação científica Laís, que caminhou comigo no início de cada etapa.

À equipe do laboratório de Biomol, da Fundação Alfredo da Matta, por me aceitarem em sua equipe, e pela disposição em ajudar.

À minha turma do mestrado, pelos momentos compartilhados juntos.

Aos meus antigos amigos, e aos novos que fiz durante esse período, a presença de vocês e apoio fez toda diferença.

Ao meu companheiro, pelo cuidado, paciência e palavras motivadores, obrigado por ter sido meu suporte.

Aos meus pais, por me motivarem com as suas “carinhas” de orgulhosos, a presença de vocês na minha vida, com certeza me dá forças para buscar o crescimento profissional.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

A secretária da UEA Dorothy, pela paciência e atenção comigo nos momentos em que a procurei.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

Apesar de ser uma doença milenar, a hanseníase ainda afeta um elevado número de pessoas em todo o mundo, e sua causa ainda é alvo de estudos, pois sabe-se que múltiplos fatores estão relacionados ao seu desfecho. Aspectos sociais e genéticos estão ligeiramente intrigados ao adoecimento, além de uma gama de genes que são investigados relacionados com o desenvolvimento desta patologia. Os estudos de associação genética possuem extrema importância na resposta do mecanismo da doença, e por esse motivo precisam ser o mais fidedigno possível. Sabe-se que há um conjunto de informações que podem causar viés nesses estudos ou mesmo ocasionar resultados falsos positivos. As análises envolvendo estas covariáveis como, idade, sexo e ancestralidade, precisam ser corrigidas e reparadas por modelos estatísticos. Sabe-se que o ideal é que se realize a análise ancestral de cada indivíduo envolvido no estudo, através de técnicas moleculares, como a genotipagem de fragmentos. Utilizando um painel de 46 marcadores informativos de ancestralidade (AIMS), do tipo *Indel* (inserção/deleção), autossômicos, o presente estudo objetivou estimar a ancestralidade numa amostra composta por 1.363 participantes do tipo caso/controle de uma perspectiva associação genética para hanseníase, realizado na Fundação Alfredo da Matta (FUAM). Desta forma, foi possível descrever o perfil ancestral da população residente de Manaus, sendo o maior levantamento de ancestralidade já realizado na população amazonense e relacionar com informações étnico-raciais autodeclarada. A população analisada demonstrou características ancestrais típicas de populações miscigenadas, com proporções de ancestralidade Europeia (EUR), Ameríndia (NAM) e Africana (AFR). Os 1363 indivíduos foram divididos em dois grupos: casos (422) e controles (941) e exibiram índices de ancestralidade muito similar, no grupo caso (EUR: 37%, NAM: 36% e AFR: 27%) e no grupo controle (EUR: 36%, NAM: 39% e AFR: 25%), mostrando que são grupos homogêneos. A associação de etnia autodeclarada, quando comparada com a ancestralidade genética, mostrou relação em todos os grupos, com exceção dos indivíduos autodeclarados negros. Os dados descritos neste trabalho confirmam que a população (casos e controles) utilizada nos estudos de associação genética, na FUAM, possui características ideais e confiáveis para serem utilizadas neste tipo de desenho amostral sem gerar viés ou associações espúrias.

Palavras Chaves: Ancestralidade, Manaus, AIMS, *Indel*, hanseníase.

ABSTRACT

Despite being a millennial disease, leprosy still affects a large number of people around the world, and its cause is still being studied, as it is known that multiple factors are related to its outcome. Social and genetic aspects are slightly intrigued to illness, in addition to a range of genes that are investigated related to the development of this pathology. Genetic association studies are extremely important in the response of the disease mechanism, so they need to be as reliable as possible. It is known that there is a set of information that may cause bias in these studies or even lead to false positive results. Analyzes involving these covariates, such as age, sex and ancestry, need to be corrected and repaired by statistical models. It is known that the Brazilian population is described as a heterogeneous group, with ancestral characteristics reflected by the process of colonization that occurred in Brazil, among Europeans, Indians and Africans. Due to this plurality in society, the ideal is to perform the ancestral analysis of each individual involved in the study, through molecular techniques such as fragment genotyping. Using a panel of 46 informational ancestry markers (AIMS), of the Indel (insertion / deletion) type, all autosomal, the present study aimed to estimate ancestry in a sample composed of 1,363 participants from a genetic association case / control study for leprosy, carried out at Fundação Alfredo da Matta (FUAM). In this way, it was possible to describe the ancestral profile of the resident population of Manaus, being the largest survey of ancestry ever performed in the Amazonian population and related to self-reported ethnic-racial information. The population analyzed showed typical ancestral characteristics of mixed populations, with significant proportions of European (EUR), Amerindian (NAM) and African (AFR) ancestry. The 1363 individuals were divided into two groups: cases (422) and controls (941) and showed very similar ancestry indexes in the case group (EUR: 37%, NAM: 36% and AFR: 27%) and in the control group EUR: 36%, NAM: 39% and AFR: 25%), showing that they are homogeneous groups. The association of self-reported ethnicity, when compared with genetic ancestry, showed a relationship in all groups, with the exception of individuals declared black. The data described in this work confirm that the population (cases and controls) used in the genetic association studies at FUAM have ideal and reliable characteristics to be used in this type of sample design without generating bias or spurious associations.

Keywords: Ancestry, Manaus, AIMS, Indel, leprosy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCB1- (do inglês, *ATP-binding cassette, subfamily B, member 1*)
- AFR- Africano
- AIMs- marcadores informativos de ancestralidade (do inglês, *Ancestry Informative Markers*)
- COMT - (do inglês, *catechol-o-methyltransferase*)
- CYP3A4- (do inglês, *cytochrome P450, subfamily IIA polypeptide 4*)
- CYP2B6- (do inglês, *cytochrome p450, subfamily IIB polypeptide 6*)
- CYP2C8- (do inglês, *cytochrome p450, subfamily IIC polypeptide 8*)
- CYP2C9- (do inglês, *cytochrome p450, subfamily IIC polypeptide 9*)
- CYP2C19- (do inglês, *cytochrome p450, subfamily IIC polypeptide 19*)
- CYP2D6- (do inglês, *cytochrome p450, subfamily IID polypeptide 6*)
- CYP3A5- (do inglês, *cytochrome p450, subfamily IIA polypeptide 5*)
- DNA- Ácido desoxirribonucléico (do inglês, *DeoxyriboNucleic Acid*)
- DT- Dimorfa-Tuberculóide
- DD - Dimorfa-Dimorfa
- DV- Dimorfa-Virchoviana
- EAS- Asiático
- EPIGEN- (do inglês, *initiative in population genomics and genetic epimology*)
- EUR- Europeu
- FIOCRUZ- Fundação Osvaldo Cruz
- FUAM- Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta
- FUAM - Fundação Alfredo da Matta
- HGDP-CEPH- (do inglês, *Human Genome Diversity Cell Line Panel*)
- IB- Índice Baciloscópico
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa
- InDels –Polimorfismos de inserção /deleção (do inglês, *Insertions and deletions polymorphisms*)
- IFNL3- (do inglês, *Interferon Lambda 3*)
- IFNG- (do inglês, *Interferon gamma*)
- IL10- Interleucina 10 (do inglês, *interleukin 10*)
- IL6- Interleucina 6 (do inglês, *interleukin 6*)
- Kb- Quilo base

LAHAN- Laboratório de Hanseníase

LTA- (do inglês, *lymphotoxin-alpha*)

MB- Multibacilares

NAM- Nativo Americano

NOD2- (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain protein 2*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR- Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PB- Paucibacilares

Pb- Pares de Base

SINAN - Sistema de informação de agravos de notificação

SLCO1B1- (do inglês, *solute Carrier organic anion transporter family, member 1B1*)

SLCO1B3- (do inglês, *solute Carrier organic anion transporter family, member 1B3*)

SOD2 – (do inglês, *Superoxide dismutase 2*)

SVR- resposta virológica sustentável

SUS- Sistema Único de Saúde

SNP - Polimorfismo de base única (do inglês, *single nucleotide polymorphism*)

TLR1- (do inglês, *gene toll-like receptor1*)

TNF α - Fatores de necrose tumoral alfa

TNF-308G- Fator de necrose tumoral

TPMT- (do inglês, *thiopurine S-methyltransferase*)

TT- Tuberculóide-Tuberculóide

UERJ- Universidade do Estado do Rio de Janeiro

VKORC1- (do inglês, *vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1*)

VV - Virchoviana-Virchoviana

1 LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1- Seleção e teste dos 46 marcadores <i>InDels</i>	23
Tabela 2- Estimativas ancestrais nas Regiões Brasileiras com 40 InDels, segundo Pena et al., 2011.....	24
Tabela 3- Estimativa de ancestralidade Nativo Americana na região Norte.....	26

CAPÍTULO I

Tabela 1- AIM- <i>InDels</i> utilizados no multiplex.....	40
Tabela 2 – Médias de ancestralidade geradas pelo software Structure.....	41
Tabela 3 - Frequencias ancestrais descritas no Brasil.....	46

2 LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1- Fluxos Migratórios no Brasil.....	16
Figura 2- Etapas Históricas do período de colonização de Manaus.....	18
Figura 3- Representação da Identificação dos Marcadores de Ancestralidade.....	21
Figura 4 – Distribuição geográfica de casos novos de Hanseníase em 2017.....	28
Figura 5 – Detecção de Casos novos de Hanseníase por Regiões.....	29
Figura 6- Respectivas vias de gênicas associados à Hanseníase.....	31

CAPÍTULO I

Figura 1- Distribuição das populações analisadas, por agrupamento (<i>cluster</i>).....	42
Figura 2- Estimativa de ancestralidade individual.....	43
Figura 3- Comparação da cor/etnia autorrelatada <i>versus</i> a ancestralidade, por meio de AIMS, em um grupo de 316 indivíduos.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Formação da População Brasileira	14
2.1.1 Brasil: cenário de encontro de povos indígenas, europeus e africanos	14
2.1.2 Fluxo Migratório no Brasil	16
2.1.3 Processo de colonização no Amazonas	17
2.2 Marcadores Genéticos	19
2.2.1 Marcadores Informativos de Ancestralidade (<i>Ancestry Informative Markers</i> - AIMS)	19
2.2.2 Associação da Ancestralidade com a autoclassificação étnico-racial nas regiões brasileiras	23
2.2.3 Perfil Genômico Ancestral da População do Amazonas	25
2.2.4 A importância da estimativa de ancestralidade em estudos biomédicos	26
2.3 Panorama da Hanseníase	28
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
CAPÍTULO I.....	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
3 RESULTADOS	41
4 DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES	52
6 REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Estudos acerca da ancestralidade genética tem sido alvo de interesse na população brasileira (KEHDY et al., 2015), que tem uma frequência alélica e genotípica variáveis, de acordo com o local amostrado. Devido à vasta miscigenação ocorrida durante o processo de colonização e imigração do Brasil, as raízes ancestrais predominantemente encontradas no país são provenientes dos europeus, africanos e indígenas (PEREIRA et al., 2012). As pesquisas a respeito da raiz ancestral fornecem dados como: a demografia de uma população (MANTA et al., 2012), mapeamento de genes, os quais podem estar relacionados a determinadas doenças complexas (KEHDY et al., 2015) e em estudos farmacogenéticos, tendo em vista que a origem ancestral pode influenciar em determinadas dosagens de fármacos (SUAREZ-KURTZ et al., 2012).

Além dessas importâncias citadas acima, vale ressaltar que, em estudos genéticos populacionais, do tipo caso-controle, o uso das informações fornecidas pelos Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) vem sendo cada vez mais solicitada para os dados de correção (SCHORK et al., 2001), tendo em vista que a contribuição ancestral pode mascarar a influência de alelos de risco a uma determinada doença, como a hanseníase, por exemplo.

A hanseníase é uma doença causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M.leprae*), uma doença associada fortemente a fatores genéticos, ambientais e econômicos, que pode se manifestar de formas distintas nos indivíduos infectados, podendo este, desenvolvê-la ou não, de acordo com sua resposta imunológica (MORAES et al., 2006; ALTER et al., 2011). Por ser uma patologia complexa, vem sendo alvo de inúmeros estudos de associação genética em diferentes grupos populacionais (ALTER et al., 2011; CARDOSO et al., 2011), cujas frequências alélicas ancestrais sofrem variações distintas.

Apesar da vasta importância, poucos estudos de ancestralidade foram realizados na população brasileira (KEHDY et al., 2015; PEREIRA et al., 2012; MANTA et al., 2013) e especificamente na população de Manaus, um único trabalho foi publicado, com somente 42 indivíduos (MANTA et al., 2013), o qual relatou um *background* genético diferenciado, com uma frequência significativa de ascendência indígena, quando comparada às demais regiões do Brasil (MANTA et al., 2013). Dessa

forma, o presente estudo teve o objetivo de estimar a ancestralidade genômica de 1363 indivíduos residentes em Manaus, que foram atendidos na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta – FUAM, por meio de painéis de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs), altamente precisos, elaborados, testados e disponíveis na literatura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Formação da População Brasileira

2.1.1 Brasil: cenário de encontro de povos indígenas, europeus e africanos

O território brasileiro era ocupado pela população indígena, quando se iniciou o processo de colonização no País. Portugal invadiu as terras do Brasil, chegando por volta do ano de 1500, na Bahia, próximo ao que hoje é a cidade de Porto Seguro e foi se expandindo em solo brasileiro. Seguindo em expedição, os portugueses foram com destino ao sertão do Maranhão (1653), ao sul do Mato Grosso (1660), ao Espírito Santo (1664) e posteriormente, Piauí, Tocantins, Amazonas e Belém, em 1673 (BOXER, 2002). A colonização cresceu rumo ao Norte e Centro-Oeste, adquirindo ainda mais o conhecimento sobre os rios e vegetações locais. Os conflitos entre os indígenas e os europeus marcaram essa época e as conjurações regionais ocorridas em Minas Gerais (1789), Rio de Janeiro (1794), Bahia (1798) e Pernambuco (1801) sinalizavam um primeiro grito de independência, que mais tarde, impulsionaram à independência do Brasil, ocorrida anos depois (FAUSTO, 2006).

O processo de colonização nas terras brasileiras foi marcado pelo despovoamento indígena. A partir de 1530, vários nativos foram submetidos ao trabalho escravo, durante o século XVI. Em função da perda significativa dessa população abriu-se, então, a inclusão da escravidão africana, para o trabalho na economia açucareira, na passagem do século XVI para o século XVII (FURTADO, 2005; VAINFAS, 2007). Esta perda demográfica da população indígena no litoral deu-se por conta de sucessivas guerras, cativerios, e epidemias nas quais os nativos não tinham anticorpos para combatê-las (RIBEIRO, 1995). Mesmo diante de toda essa guerra, vale ressaltar que alguns grupos indígenas se uniram aos europeus em suas lutas e esse fato marcou a colonização portuguesa. Há uma vasta lista de liderança indígena que se aliou aos colonizadores, bem como o relacionamento de índias com os portugueses, o qual deu origem aos mamelucos (filho de índias com europeus). Estes eram de lealdade oscilante, ora viviam como nativos, ora viravam-se para o colonialismo (LOPEZ, 2008). Massacres, alianças, despovoamento, resistências, reconstrução de identidades culturais, tudo isso marcou a história indígena no Brasil (VAINFAS, 2007).

Durante os mais de 300 anos de duração do tráfico negreiro, o Brasil foi o país que mais “importou” escravos negros. Dados esses que refletem no entendimento da contribuição africana na formação histórica e cultural brasileira. A princípio, o trabalho escravo africano era para atender o setor açucareiro, porém, mais tarde, passou a atuar em todas as demandas de setores econômicos da sociedade. Eles trabalhavam nos campos, nas cidades, nas casas, fazendo todo o tipo de trabalho forçado e explorado (REIS, 2007). Apesar da exploração africana, a sua vinda para o Brasil aumentou ainda mais a pluralidade do País e originou, assim, novos fenótipos, como os mulatos, pardos, caboclos, termos conhecidos popularmente, oriundos do relacionamento de africanos, europeus e indígenas (LOVEJOY, 2002).

Em 1887, segundo os dados do relatório anual do Ministério da Agricultura, dos 723.419 escravos no País, 482.571 concentravam-se na Região Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), devido à alta na economia pela produção de café e o restante (240.848), nas demais regiões do Brasil (MARINGONI, 2011). Toda essa forma de trabalho desumano gerou conflitos, guerras e fugas, até o momento do período de abolição. Porém, a Lei Áurea não assegurou o processo de inclusão dos negros na sociedade, o que gerou um caos já que os escravos não tinham moradia e nem trabalho. O processo de favelização do Rio de Janeiro está ligado a esse período. A abolição não foi só uma questão política, mas também, social (SKIDMORE, 2003).

No século XIX, havia escravos africanos em diversas regiões brasileiras e esse fato contribuiu para a expansão da cultura deles no solo brasileiro, concomitante, o enriquecimento, também, da nossa (REIS, 2007). Na Região Norte, o fluxo de trabalho escravo africano era bem menor devido ao tipo de trabalho encontrado na economia. Enquanto que na Região Nordeste a força produtiva era majoritariamente advinda da cana de açúcar, na região Norte, o trabalho escravo se dava apenas em comércios de pequeno porte, nas casas dos senhores e suas terras (FONSECA, 2011). Mais tarde, com o advento do ciclo da borracha, abriu-se um novo processo de imigração, dessa vez voluntária, o qual motivou também uma migração expressiva de nordestinos em busca de trabalho. Vale ressaltar, que o Nordeste teve uma expressiva contribuição africana na formação do seu povo. Com isso, observa-se, que a união desses povos contribuiu para o enriquecimento genético, cultural e para a pluralidade local (FURTADO, 2005).

2.1.2 Fluxo Migratório no Brasil

No período de 1950 a 1980, o Brasil passou por três grandes processos migratórios regionais (Figura 1), mais especificamente relacionados à economia que girava em cada localidade nesse período. A instalação de médias e grandes propriedades nos campos (a modernização do trabalho rural, a introdução de máquinas agrícolas) resultou no desemprego de milhares de trabalhadores nas décadas de 1950 e 1960 (DA COSTA, 2006). Com isso, instigou-se o processo de êxodo rural, que provocou um grande movimento da Região Nordeste para o Sudeste, onde milhares de trabalhadores migraram para os grandes centros urbanos em busca de vínculos empregatícios. Nessa época, a Região Sudeste estava vinculada principalmente ao desenvolvimento industrial, o que despertou o interesse de muitos imigrantes pela localidade (KASSAB, 2007).

Figura 1. Fluxos Migratórios no Brasil.



Nas décadas de 1950 a 1960 a migração ocorreu no sentido Nordeste – Sudeste, Nordeste – Norte e Sul – Sudeste. No período de 1960 a 1970 o fluxo migratório se dava do Nordeste - Sudeste, Nordeste – Centro - Oeste, Sul- Centro – Oeste e Nordeste - Norte, e nas décadas de 1970 a 1980 ocorreu no sentido Nordeste - Sudeste, Sul e Sudeste - Norte. **Fonte:** Adaptado de SANTOS, 1994.

Ainda de acordo com a Figura 1, nas décadas de 1960 e 1970, o cenário migratório começou a ir em direção à Região Centro Oeste, devido ao agronegócio. Com o incentivo do governo, famílias e trabalhadores agrícolas saíram do Sul e Sudeste, rumo às fazendas de Mato Grosso e Goiás (DA COSTA, 2006). Mais tarde, nas décadas de 1970 e 1980, o movimento migratório deu-se em direção à Amazônia, tendo em vista que a construção da rodovia Transamazônica estimulou a chegada de novos imigrantes, principalmente de nordestinos, para trabalhos em garimpos e

agropecuária. O fluxo migratório do Nordeste para o Sudeste continuou em menor ritmo e deslocou-se para o Norte devido a novas fontes de emprego (agricultura e pecuária) (KASSAB, 2007). A região Norte apresenta uma expressiva dinâmica populacional em torno de suas maiores cidades: Belém, no Pará e Manaus, no Amazonas. O projeto da Zona Franca de Manaus e da construção da rodovia Transamazônica atraiu o interesse de muitos trabalhadores oriundos dos mais diferentes cantos do Brasil (DA COSTA, 2006, KASSAB, 2007).

Nesse sentido, o fluxo de migração de pessoas pelo território brasileiro contribuiu para a miscigenação e a diversidade genética, o que amplia de modo satisfatório as pesquisas nos mais distintos campos científicos. Com isso, essa riqueza de culturas demográficas no Brasil, abre uma vasta linha de estudos que nos possibilita entender um pouco mais da Genética Populacional. Além de inúmeras referências históricas, esses dados estão expressos significativamente no DNA humano, os quais podem ser identificados e analisados com maior precisão, pelas técnicas de Biologia Molecular, por diversos marcadores moleculares, como os marcadores informativos de ancestralidade.

2.1.3 Processo de colonização no Amazonas

Em meados do século XVI, as populações indígenas da região Norte, tiveram seu primeiro contato com os portugueses, que estavam em busca de mão de obra escrava. Isso fez com que população começasse a diminuir, devido aos maus tratos e epidemias (ARAÚJO, 2006). Durante o século XVIII, o governo português assumiu a direção das aldeias da região Amazônica e as elevou a categoria de povoados ou de vilas. Para a população indígena, esse período significou o devastamento quase que completo de seu território pelos militares portugueses, concretizando assim a liderança portuguesa na região do Amazonas (LITTLE, 2002)

O território amazônico foi marcado por tratados, invasões, missões religiosas e algumas rebeliões indígenas que ocorreram devido ao processo de colonização portuguesa. Diversos povos tiveram que se adaptar à nova forma de vida a qual eram submetidos e aos poucos, foram se desfazendo de suas culturas e vivências (LITTLE, 2002; ARAÚJO, 2006). O processo de exploração extrativista dos recursos naturais, com destaque à exploração da borracha, culminou com o movimento de imigração

que ocorreu na região e aumentou a diversidade étnica dos indivíduos residentes. Aos poucos a região norte vinha ganhando seu espaço na economia e atraindo diferentes grupos de indivíduos (OLIVEIRA, 2006).

O território amazônico possui riquezas que sempre despertou o olhar de grandes indústrias. No ano de 1889, a borracha era bastante solicitada nas indústrias mundiais, isso contribuiu para a expansão da colonização na região norte (Manaus), dando início a um novo processo de imigração para esse local. Muitos brasileiros de outras regiões migraram para Manaus em busca de vínculos empregatícios, o que contribuiu para o aumento da demografia local (AFONSO, 2010). Mais tarde com a implantação da Zona Franca de Manaus, houve um novo fluxo migratório para a capital, considerada durante muitos anos um dos pólos que mais gerou emprego nessa região. O aumento de produção e consumo de mercadorias contribuiu para destacar a importância econômica desse lugar (OLIVEIRA, 2006).

Figura 2. Etapas Históricas do período de colonização de Manaus



Principais acontecimentos históricos no período de 1669 a 1856, momento no qual a cidade foi nomeada como Manáos. **Fonte:** AFONSO, 2010

Todo o processo de colonização que ocorreu em Manaus é de origem europeia. Em meados do século 1669, houve a construção do Forte de São José da Barra do Rio Negro, pelos portugueses, para assegurar assim o controle sob o local (Figura 2). É importante frisar que a região onde é hoje Manaus, era pertencente à Espanha.

Porém, foi tomada pelos os portugueses, os quais se juntaram com as tribos indígenas residentes aqui, para a construção do Forte. Mais tarde, com a união através de casamentos entre militares portugueses e as filhas dos Tuxauas, das tribos Manaós, iniciou-se o processo de miscigenação na região (AFONSO, 2010).

Levando em conta toda a contribuição ancestral que foi originada no Brasil desde a sua colonização, metodologias laboratoriais foram elaboradas para a correção dessas análises (PENA et al., 2000). Dependendo da quantidade de genes que está sendo avaliada, pode-se fazer o uso de diferentes ferramentas. Quando se estuda, por exemplo, um determinado gene, com associação para certa doença, em um estudo de associação genética, do tipo caso-controle, o ideal é que se faça a correção da ancestralidade por meio de marcadores informativos de ancestralidade (*AIMs*). Estes são painéis com marcadores altamente precisos na detecção de populações diferentes (PEREIRA et al., 2012), principalmente em populações altamente miscigenadas, como é o caso da brasileira. Tendo em vista que quando se analisa dois grupos distintos: doentes (grupo caso) e indivíduos saudáveis (grupo controle), o esperado é que ambos os grupos sejam o mais homogêneo possível, pois diferenças nestes, podem refletir na confiabilidade dos resultados (SANTOS et al., 2009). Essas análises ancestrais, normalmente investigam a contribuição genética de três raízes ancestrais: Ameríndia, Europeia e Africana, devido à presença marcante desses grupos na formação do povo brasileiro (PEREIRA et al., 2012).

2.2 Marcadores Genéticos

2.2.1 Marcadores Informativos de Ancestralidade (*Ancestry Informative Markers - AIMS*)

As regiões polimórficas do DNA fornecem uma maior quantidade de informações genéticas, as quais variam entre indivíduos e podem ser usadas como marcadores em estudos de associação, farmacogenéticos, e de variabilidade genética, por exemplo (Strachan & Read, 2013). Além disso, podem ser usadas também em estudos de ancestralidade (MANTA et al., 2013; DURSO et al., 2014).

Dentre os diferentes tipos de marcadores moleculares existem os marcadores informativos de ancestralidade, chamados de *AIMs*, sigla que vem do inglês "*Ancestry Informative Markers*". Esses marcadores são considerados neutros, estão dispersos pelo genoma, em regiões não codificadoras e nem tampouco em regiões reguladoras,

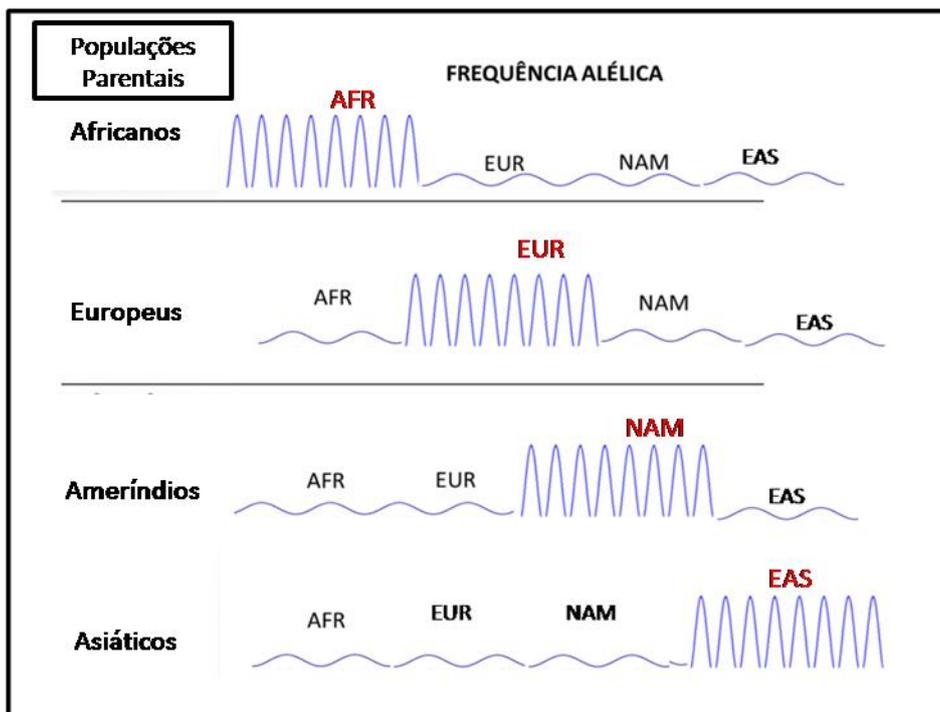
possuem frequências distintas nas populações parentais devido estarem isoladas por um longo período de tempo (SANTOS et al.,2009). É comum observar que uma grande parte de estudos relacionados a essa linha de pesquisa utilizam marcadores do tipo *SNP* (polimorfismo de base única - *single nucleotide polymorphism*) ou *InDels* (marcadores de inserção e deleção) (SANTOS et al.,2009, MANTA et al., 2013; DURSO et al., 2014; KEHDY et al., 2015).

Os polimorfismos de base única, ou *SNPs*, são variações no DNA que acometem somente uma base na sequência genômica. Eles são frequentemente associados a características morfológicas (pigmentação da pele, cor dos olhos, cabelos, dentre outras). Ademais, podem induzir o organismo a diferentes respostas a fármacos e a doenças. Por essa razão, são utilizados como marcadores genéticos em estudo de associação (SUAREZ-KURTZ et., 2012; DURSO et al., 2014).

Os marcadores de inserção e deleção, ou *InDels*, estão dispersos em todo o genoma humano e a grande variabilidade na sua frequência alélica, nas diferentes amostras populacionais estudadas, mostra que eles são importantes marcadores de ancestralidade e de análise forense (SANTOS et al.,2009). Os *InDels* possuem características importantes para serem utilizadas como marcadores em análises ancestrais, pois são binários, curtos e altamente informativos, igualmente os outros marcadores (*SNPs*), já utilizados nesse tipo de análise. Porém com um diferencial importante, os *SNPs* exigem a utilização de metodologias mais complexas (sequenciamento automático) para a determinação das bases polimórficas, enquanto que os *InDels* são facilmente genotipados, devido às diferenças nos tamanhos dos fragmentos. (PEREIRA et al., 2012).

De acordo com a amostra populacional estudada, existem painéis que analisam quatro raízes ancestrais diferentes (europeias, africanas, ameríndias e asiáticas), mas em populações miscigenadas como no Brasil, onde a representação asiática é menos frequente, esses marcadores são poucos utilizados nos painéis brasileiros conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Representação da identificação dos Marcadores de Ancestralidade



Os marcadores selecionados possuem frequências distintas nas populações parentais, são neutros e não codificantes. * (AFR: Africano, EUR: Europeu, NAM: Nativo Americano, EAS; Asiático)

A população brasileira é descrita como um grupo fortemente miscigenado, oriundo de três raízes ancestrais: os ameríndios, que habitavam o Brasil antes de seu descobrimento; os africanos, devido ao processo de imigração involuntária, ou seja, trazidos à força para o trabalho escravo; e os europeus (portugueses), primeiro grupo não nativo a chegar ao Brasil (RIBEIRO, 1995; DURSO et al., 2014). Toda essa mistura tornou o Brasil um país heterogêneo, rico em cultura e raças diferentes, que podem ser estudadas através de utilização de *AIMs*, onde é possível analisar a linhagem ancestral, adquirida em meio a todo esse evento e dessa forma, entender melhor o processo de colonização que ocorreu no país (MANTA et al., 2013).

Além disso, as taxas de ancestralidade também permitem investigar a influência das variações étnicas no desenvolvimento de doenças, bem como, contribuir em pesquisas que visam constatar se determinado fenótipo tem maior influência genética ou ambiental (MCKEIGUE., 2000).

Diversos *SNPs* com diferenças significativas nas frequências alélicas foram observados predominantemente em determinadas populações e estão fortemente associados ao desenvolvimento de doenças (CARDOSO et al., 2011; MORAES et al.,

2006). Para evitar que os dados gerados nos estudos de associação genética sejam um artifício refletido pela estratificação populacional, principalmente em populações miscigenadas, é necessário que seja feita a correção por meio dos AIMS (SANTOS et al., 2009). Sabe-se que interpretações errôneas podem ocorrer nesse tipo de estudo e levar a associações espúrias, conferindo assim, um falso risco a um determinado marcador, não por ele ser associado de fato, mas por estar sendo mascarado por diferentes taxas de ancestralidade (DURSO et al., 2014). É importante destacar, que cada população possui diferentes níveis de diversidade genética e isso pode enviesar os resultados de associações (CHIMUSA et al., 2015). Dessa forma, os AIMS não só são importantes para o conhecimento da contribuição da taxa ancestral, como também, para assegurar os resultados dos estudos de associação de doenças, do tipo caso-controle.

Existem diferentes trabalhos realizados sobre análise ancestral, que utilizam painéis distintos, variando o número e o tipo de marcadores (KEHDY et al., 2015; PEREIRA et al., 2012). Um dos maiores trabalhos realizados na população brasileira, até o momento, com o painel de *SNPs*, foi do Epigen, um estudo multicêntrico, que reuniu diversos laboratórios no intuito de estudar as variantes genéticas associadas a doenças complexas e levando em conta a heterogeneidade ancestral. Esse estudo reuniu dados de três regiões do Brasil: Nordeste (Salvador); Sudeste (BambuÍ) e Sul (Pelotas), no qual foram genotipados mais de dois milhões de *SNPs*, e selecionados para inferir a ancestralidade, 370.539 *SNPs*, em 6.487 indivíduos. Posteriormente, foi realizado o sequenciamento do genoma completo de 30 indivíduos (10 de cada corte) dessa população, a fim de caracterizar se as variantes têm alguma relação com o desenvolvimento de doenças e se a ancestralidade tem alguma influência nisso (KEHDY et al., 2015).

Um painel com um número menor de marcadores (46 *AIMs*), do tipo *InDel*, mas com uma ótima precisão, discriminação e reprodutibilidade, foi desenvolvido por Pereira e colaboradores (2012), para a identificação da ascendência genética. Estes marcadores autossômicos foram retirados de um banco de dados público e replicados em três populações homogêneas de Angola, Portugal e tribos Amazônicas, e duas populações heterogêneas de Belém, com o intuito de garantir a confiabilidade destes marcadores. Os dados obtidos por Pereira e colaboradores (2012) estão dispostos na Tabela 1, onde é possível observar um painel de marcadores específicos para a

populações miscigenadas, podendo desta forma, serem reproduzidos nesta população, para averiguação das taxas ancestrais.

Tabela 1. Seleção e Teste dos 46 Marcadores *InDels*

46 AIMS- INDEL			
	AFR	EUR	NAM
HGPD-CEPH AFR	0.969	0.011	0.008
HGPD-CEPH EUR	0.008	0.963	0.014
HGPD-CEPH NAM	0.008	0.041	0.924
População teste	AFR	EUR	NAM
Angola	0.970	0.011	0.008
Portugal	0.018	0.966	0.008
Br. Tribos Amazônicas	0.010	0.013	0.945
Belém (4G Analises)	0.148	0.535	0.229
Belém (3G Analises)	0.168	0.537	0.295

Fonte: Adaptado de PEREIRA et al. (2012) *(AFR: Africano, EUR: Europeu, NAM: Nativo Americano, HGPD-CEPH: Human Genome Diversity Project- Foundation Jean Dausset)

2.2.2 Associação da Ancestralidade com a autoclassificação étnico-racial nas regiões brasileiras

Ao se discutir sobre ancestralidade, algumas vertentes são levantadas a respeito do assunto, existindo assim, uma grande controvérsia em relação aos dados obtidos através da análise ancestral por marcadores genéticos (*AIMs*) e a autoclassificação racial (autodeclaração de cor ou cor autorrelatada) definida por cada indivíduo. A análise ancestral através de *AIMs* é embasada em aspectos genômicos, já as autodeclarações de raça/etnia são fundamentadas em dados fenotípicos, culturais e o cruzamento dessas informações podem ser discordantes (MERSHA e ABEBE 2015).

Há autores que defendem a ideia de que a ancestralidade não tem relação com a cor autodeclarada, como é discutido na análise feita por Pena e colaboradores (2011), em um estudo realizado em quatro regiões do Brasil: Norte, Nordeste, Sul e Sudeste. Eles observaram que as informações obtidas por meio de marcadores de ancestralidade genética se diferenciavam dos dados de autodeclaração de cor.

Constataram, dessa forma, que a cor autorrelatada não possui associação com a ancestralidade genética expressada e que indivíduos autodeclarados, como pardos, são os que possuem maior taxa de diversidade ancestral, entre os demais grupos investigados (ameríndios, europeus e africanos) (PENA et al., 2011). Os pardos foram considerados o grupo mais miscigenado geneticamente, enquanto que os indivíduos autodeclarados negros possuem uma maior ascendência europeia e africana, que variam de acordo com as regiões geográficas analisadas. Já os autodeclarados brancos foram considerados o grupo mais homogêneo, mostrando uma maior ascendência europeia, quando comparados aos demais grupos (PENA et al., 2011).

Os resultados gerados na análise de Pena e colaboradores (2011), além de associar fatores fenotípicos (raça/etnia) com a investigação genotípica (ancestralidade), também revelam dados importantes a respeito da população do Norte. É importante ressaltar que a população de Belém (Pará) apresenta dados expressivos (18%) de ascendência de nativos americanos, quando comparada com as demais regiões, conforme demonstrado na Tabela 2:

Tabela 2. Estimativas ancestrais nas Regiões Brasileiras com 40 InDels, segundo Pena et al., 2011.

Região	Cidade	Europeu	Africano	Ameríndio
Norte (n=203)	Belém- Pará	0.688	0.105	0.185
Nordeste (n=82)	Fortaleza- Ceará/ Ilhéus- Bahia	0.601	0.293	0.089
Sudeste (n=264)	Rio de Janeiro	0.742	0.173	0.073
Sul (189)	Joenville- Santa Catarina/ Porto Alegre- Rio Grande do Sul	0.795	0.103	0.094

Fonte: Adaptado de PENA et al. (2011)

Mesmo havendo discrepância na autodeclaração de cor de pele, fica evidente que a população brasileira possui ascendência europeia predominante em todas as regiões e esse fato é explicado pelo processo de colonização dos portugueses, na época do descobrimento do Brasil. Essa análise foi realizada com um painel de 40 marcadores, do tipo *Indels*, que foram validados no banco de dados do painel de diversidade humana (*HGDP-CEPH Diversity Panel*) (PENA et al., 2011).

Por outro lado, Lima-Costa e colaboradores (2015) apoiam o ponto de vista de que, a autodeclaração racial é influenciada tanto pela ancestralidade, como por razões não biológicas. Em sua análise, utilizando um painel de 370.539 marcadores do tipo SNPs, com 5.851 amostras de indivíduos de diferentes regiões brasileiras (Pelotas-Sul: 3533; Bambuí-Sudeste: 1442; Salvador-Nordeste: 876), eles puderam observar que quando analisados todos os participantes no mesmo grupo, a ascendência africana se torna maior naqueles indivíduos que se autodeclararam negros e diminui em indivíduos autodeclarados como brancos. Entretanto, em uma análise separada por regiões, Nordeste e Sul, são as que possuem maior contribuição de ascendência africana, em indivíduos autodeclarados negros, diferentemente da região Sudeste, onde a ascendência africana em indivíduos autodeclarados pardos é maior. É possível observar também, que os indivíduos autodeclarados brancos possuem uma maior ascendência europeia em todas as regiões, com exceção de Salvador, devido o processo de colonização local. A taxa de ascendência de nativos americanos (ameríndios ou indígenas) se manteve baixa em todas essas regiões (LIMA COSTA et al., 2015).

2.2.3 Perfil Genômico Ancestral da População do Amazonas

É importante destacar que na região do Amazonas, a população é bastante miscigenada, devido aos processos de colonização ao longo da história (assim como nos demais estados brasileiros), porém, com uma parcela de ancestralidade genética predominante de indígenas (MANTA et al., 2013). Em um estudo conduzido por Manta e colaboradores (2013) a respeito de ancestralidade brasileira, no qual foram estudadas as populações de todas as regiões do Brasil, observou-se que as taxas das frequências de ancestralidade entre elas variam entre si. A região Norte possui a maior taxa de ancestralidade ameríndia: Manaus tem 38%; Santa Isabel do Rio Negro (município do Amazonas) tem 76% de contribuição ancestral ameríndia. Esses dados foram obtidos pela análise de um painel genético com 46 AIMs, do tipo *InDels*, para a população brasileira (MANTA et al., 2013).

Considerando essa riqueza demográfica que ocorreu nessa região, é muito importante conhecer a diversidade étnica da população brasileira, em especial, a amazonense, que tem uma contribuição de indígenas diferente de qualquer outra região do Brasil, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativa da ancestralidade nativo americana na Região Norte

Referência	Localidade	Ancestralidade Nativa americana	N amostral
SANTOS et al. (2009)	Belém- PA	28%	196
PENA et al.(2011)	Belém- PA	18,50%	203
MANTA et al. (2013)	Manaus- AM	37,80%	42
MANTA et al. (2013)	Santa Isabel do Rio Negro	75,80%	100

É possível verificar na Tabela 3, que Manaus e Santa Isabel do Rio Negro possuem a maior taxa de ancestralidade nativo americana. A alta taxa dessa ancestralidade encontrada em Santa Isabel do Rio Negro se deve ao fato da mesma ser a cidade com maior número de habitantes ameríndios do Estado, onde cerca de 90% da população residente são pertencentes às tribos Yanomami, Barés, Tukano e Baniwa.

Todavia, faz-se necessária a replicação desses dados em um número amostral maior, para inferir de forma mais segura a respeito da ancestralidade dessa região. Assim como, disponibilizá-los para serem utilizados na correção de estudos de associação genética, do tipo caso-controle, buscando resultados mais fidedignos.

2.2.4 A importância da estimativa de ancestralidade em estudos biomédicos

A estimativa de ancestralidade individual de uma população possui importantes aplicações nos estudos biomédicos, podendo ser utilizada para testar a associação de fenótipos específicos com o perfil ancestral de um determinado grupo ou como correção de covariável em estudos de associação genética e no campo farmacogenético, na prescrição de medicamentos e dosagens (PENA et al., 2011; LIMA- COSTA et al., 2016;).

O perfil genômico ancestral pode contribuir amplamente nas respostas de tratamento ou cura de um indivíduo. Sabe-se que há fatores de riscos genéticos para cada população e que nem todas as pessoas irão responder de uma mesma forma, a um determinado tratamento em que estão sendo submetidas, independente da

doença. Isso pode ocorrer por prováveis fatores acerca do hospedeiro, do vírus ou bactéria, como por exemplo: alguns polimorfismos ou mutações que se encontram próximos ou no gene responsável pela metabolização das drogas utilizadas no tratamento de doenças (NASTRI et al.,2016; RIZZO et al.,2016).

Rizzo e colaboradores (2016) analisaram a prevalência de três genótipos do gene *IFNL3*, em uma população de doadores de sangue, do Nordeste e Sudeste, do Brasil. Variações neste gene estão sendo utilizadas nos esquemas de tratamento da hepatite C crônica, evidenciando que alguns indivíduos não apresentam melhora no tratamento da doença. Para isso, foram estudados três genótipos desse gene: (rs12979860-CC, rs12979860-CT, rs12979860-TT) e a sua relação com marcadores informativos de ancestralidade do tipo Indels. Eles verificaram que o genótipo rs12979860-CC está fortemente associado à cura mais rápida, demonstrando uma resposta virológica sustentável (SVR) de 98% e quando comparado aos demais SNPs (rs12979860-CT e rs12979860-TT), a frequência desse genótipo é significativamente maior em indivíduos com ancestralidade europeia do que africana. Isso poderia explicar o porquê desses indivíduos terem uma resposta terapêutica melhor e conseqüentemente, a cura (RIZZO et al., 2016). Além disso, os doadores de sangue do genótipo rs12979860-TT tiveram uma maior ascendência africana, com maior prevalência em doadores nordestinos (17,4%) do que em doadores do Sudeste (11,3%). Tais dados sugerem que indivíduos com maior contribuição ancestral europeia com o genótipo rs12979860-CC tem maiores chances de cura para a hepatite C.

Na farmacogenética, estudos demonstram a importância de dados acerca da ancestralidade, na prescrição e nas dosagens de medicamentos. Genes responsáveis pela modulação dos fármacos no metabolismo (*CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A5*, *COMT* e *TPMT*), transporte (*ABCB1*, *SLCO1B1* e *SLCO1B3*) e efeito (*VKORC1*) são alvos de estudos farmacogenômicos (SUAREZ-KURTZ et al., 2012). A *VKORC1* é uma enzima-chave no ciclo da vitamina k e possui influências na ação anticoagulante da varfarina, medicamento indicado para o tratamento de trombose venosa e embolia pulmonar (JONAS e MCLEOD, 2009). Existem variações nas frequências dos polimorfismos desse gene em diferentes populações, sendo que o alelo variável, *VKORC1* 1173T, é sensível à varfarina na população japonesa (ancestralidade asiática), quando comparado com indivíduos de origem europeia. A dosagem desse medicamento, logo, tem que ser

significativamente maior em pacientes europeus do que em japoneses, para conseguirem atingir os mesmos níveis de anticoagulação (KOSAKI et al., 2006; JONAS e MCLEOD ., 2009).

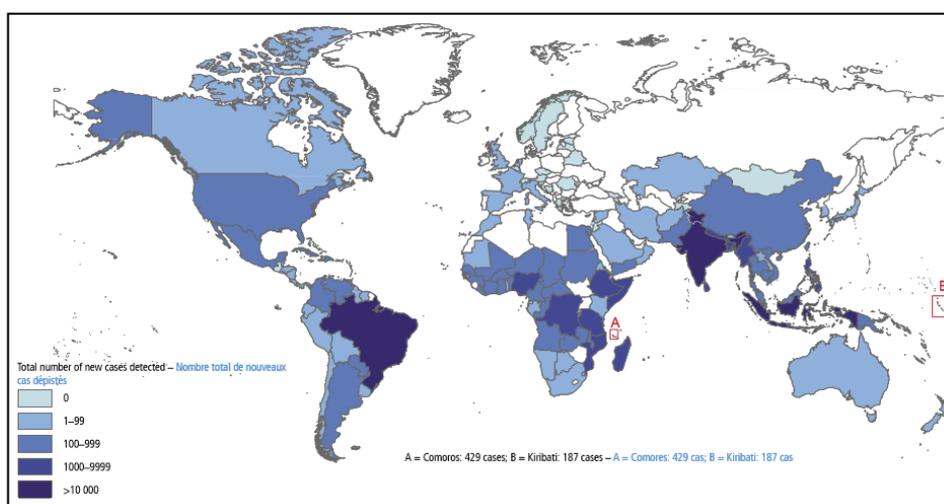
Estes estudos evidenciam a importância e a funcionalidade de se fazer o uso de metodologias moleculares, que utilizem marcadores informativos de ancestralidade e empregá-los tanto como apoio na pesquisa científica, como na parte clínica de doenças complexas, por exemplo, a hanseníase.

2.3 Panorama da Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa, de evolução lenta, crônica e caráter granulomatoso, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo ácido-álcool resistente, intracelular obrigatório, com predileção pelas células de Schwann. Quando não identificada corretamente e tratada precocemente, pode ocasionar problemas no sistema nervoso periférico e deformidades físicas irreversíveis (MOREIRA; ALVAREZ, 2002).

A doença ainda é considerada um sério problema de saúde pública em diversos países. Apesar dos números de casos novos caírem ao longo dos últimos 10 anos (oscilando no último período) no Brasil, o Brasil ainda ocupa o segundo lugar no número de notificações registradas, ficando atrás somente para a Índia (OMS, 2018).

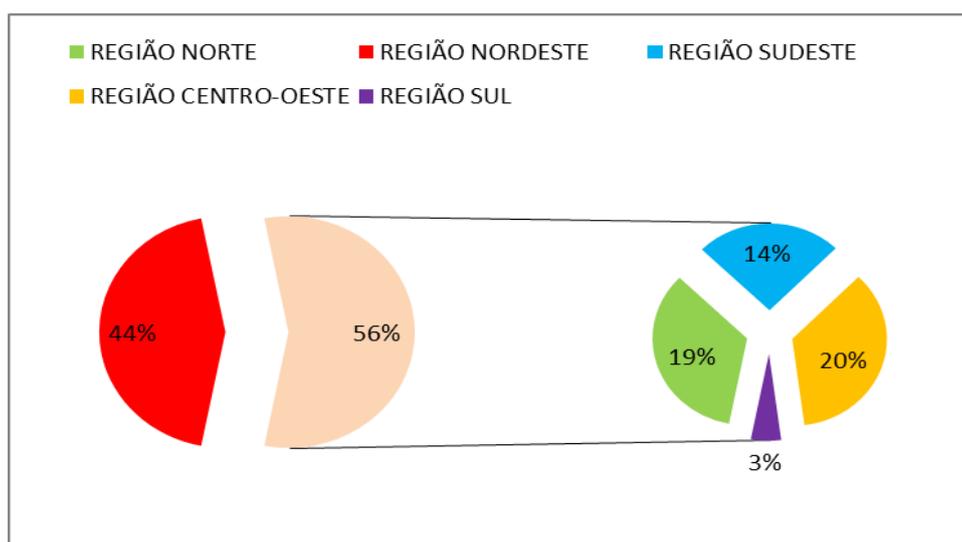
Figura 4. Distribuição geográfica de casos novos de Hanseníase em 2017



Fonte: OMS (2018)

Segundo os registros de 2017 do SINAN (Sistema de informação de agravos de notificação), dos 26.875 casos registrados no Brasil, quase metade destes foram notificados no Nordeste (11.783 casos) e a outra parte ficou dividida pelas demais regiões: Centro-Oeste (5.373 casos), Norte (5.169 casos), Sudeste (3.774 casos) e Sul (776 casos), conforme demonstrado na figura 4 (SINAN/ SVS- MS 2018).

Figura 5. Detecção de Casos novos de Hanseníse por Regiões



Fonte: Adaptado de SINAN (2018)

Os números registrados de casos novos, na FUAM, equivalem a 25,4% dos casos notificados no Estado e 74,6% de casos notificados em Manaus. Nos últimos 16 anos, o número de registros caiu consideravelmente na região devido aos programas de monitoramento e acompanhamento e das campanhas dermatológicas de conscientização serem cada vez mais ampliados (BOLETIM EPIDEMIÓLOGICO 2016).

Por ser uma doença infecciosa complexa e multifatorial, a genética do hospedeiro parece exercer um papel mais relevante para o seu desfecho, fazendo com que a doença se manifeste de diferentes formas em cada indivíduo (MORAES et al., 2006; ALTER et al., 2011; CARDOSO et al., 2011). Com relação à genética do hospedeiro, os estudos mostram que inúmeros genes estão associados à suscetibilidade de risco ou de proteção da doença (ALTER et al., 2011; CARDOSO et al., 2011). Os genes *HLA*, os quais são relacionados com as respostas imunológicas, que compreendem *HLA II*, *MICA*, *MICB*, *TNF α* e *LTA* e os genes não-*HLA*, como *IL-10*, *NRAMP1*, *SCL11A1*, *PARK2*, *PACRG*, *VDR*, mostraram-se associados a uma

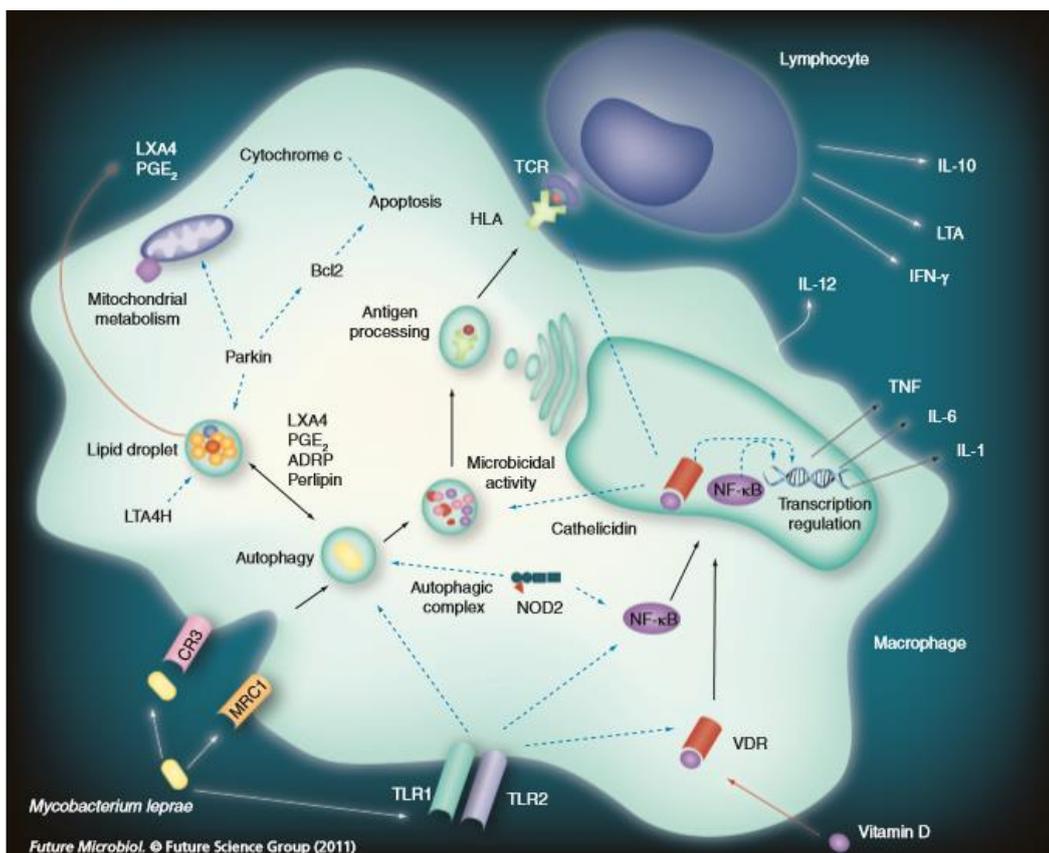
chance maior de desenvolver a hanseníase (PREVEDELLO et al., 2007). Outros genes também são apontados no desfecho da hanseníase, como, *NOD2* e *CCDC122-LACC1* (SALES-MARQUES et al., 2014), *IFNG* (CARDOSO et al., 2010) e *TLR1* (MARQUES et al., 2013).

Cardoso e colaboradores (2011) analisaram o SNP do gene (polimorfismo de nucleotídeo único), fator de necrose tumoral, *TNF-308G* (rs1800629) e sua associação com a hanseníase. Os autores verificaram que esse polimorfismo exerce relevantes atribuições na resposta do hospedeiro, frente à doença. Além disso, eles também fizeram um estudo de meta-análise e evidenciaram que o alelo-308G está associado com proteção (OR = 0,74; P = 0,04) para a doença, na população brasileira, do Rio de Janeiro.

Os estudos de associação genética publicados mostram que a genética exerce um importante peso no desfecho e no desenvolvimento da doença. É possível verificar ainda que até mesmo as reações imunológicas desencadeadas por ela podem estar relacionadas com variações genéticas do indivíduo, frente ao patógeno. De 15 *SNPs*, em oito genes distintos (*TNF α* , *LTA*, *IFNG*, *IL10*, *TLR1*, *NOD2*, *SOD2* e *IL6*), o gene *IL6* demonstrou associação com reações hansênicas (SALES-MARQUES et al., 2017), uma resposta imunológica que alguns pacientes multibacilares podem desenvolver. Nesse contexto, vale ressaltar que os resultados obtidos de pesquisas, sobre a relação entre marcadores moleculares e alguns fenótipos apresentados na hanseníase, precisam ser examinados por replicação em diferentes grupos étnicos (PINTO et al., 2015).

Todos esses genes possuem receptores dentro ou na parede do macrófago, célula que o microrganismo infecta ao entrar no organismo. Como demonstrado na Figura 6, esses genes possuem uma determinada ligação, funcionando como uma espécie de cascata. Dessa forma, se houver mutação em algum desses genes, toda a via poderá ser prejudicada, favorecendo assim o desenvolvimento do patógeno no organismo. Estudos genéticos são ferramentas chaves, para verificar se está havendo alguma mutação nessas vias, bem como traçar medidas para reverter o dano causado, utilizando fármacos que as ativem (CARDOSO et al., 2011).

Figura 6. Respectivas vias de gênicas associados à Hanseníase



Fonte: CARDOSO et al. (2011)

Os estudos de associação genética, do tipo caso-controle, no qual se tem um grupo doente e um grupo saudável, fornecem informações importantes a respeito de uma determinada população, além de ser possível avaliar a chance de risco de uma dada exposição (CARDOSO et al., 2011). Quando se trabalha com esse tipo de análise, o ideal é que os dois grupos avaliados sejam o mais homogêneo possível, pois se os sujeitos forem de subpopulações diferentes, nas quais as frequências alélicas e os marcadores analisados diferem entre si, isso pode gerar resultados falsos positivos, com associações espúrias, enviesando assim, as análises (SANTOS et al., 2009). Existem alguns fatores de confundimento na população brasileira que podem levar a resultados inequívocos, em pesquisas científicas, como: idade, sexo, ascendência genética, condição social, escolaridade, entre outros (DURSO et al., 2014). Para evitar esse tipo de viés, é necessário que as análises passem por correções, como por exemplo, a correção por ancestralidade genética, que pode ser pelos marcadores de SNPs ou *Indels*, por exemplo, (PEREIRA et al., 2012; PENA et al., 2011).

Tendo em vista as pesquisas que estão sendo desenvolvidas por nosso Grupo de Biologia Molecular, da Fundação Alfredo da Matta (FUAM), principalmente no que diz respeito a estudos genéticos de associações à hanseníase e do viés que os mesmos podem causar, levando a resultados falso-positivos, o presente estudo almejou estimar a ancestralidade dos indivíduos, atendidos na FUAM para corrigir os efeitos de subestruturação populacional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estimar a ancestralidade genômica de 1363 amostras de indivíduos provenientes da Fundação Alfredo da Matta (FUAM), por meio de AIMs, do tipo *InDels*.

3.2 Objetivos específicos

- Genotipar 1363 indivíduos, sendo 422 pacientes com hanseníase e 941 indivíduos saudáveis, atendidos na FUAM, com um painel de 46 marcadores informativos de ancestralidade, do tipo *InDels*, a fim de avaliar a ancestralidade genômica individual e global;
- Estimar a ancestralidade genômica na população de pacientes com hanseníase (grupo caso) e indivíduos saudáveis (grupo controle);
- Comparar os dados de ancestralidade genômica gerados com as informações de etnia autodeclarada dos indivíduos do estudo;
- Construir um banco de dados de ancestralidade genômica, por meio dos marcadores *InDels* para corrigir as diferenças na estratificação populacional, em estudos genéticos de associação.

CAPÍTULO I

Estudo de ancestralidade na população atendida na
Fundação Alfredo da Matta

Estudo de ancestralidade na população atendida na Fundação Alfredo da Matta

Noronha, A; Cavalcante, O; Leturiondo, A; Manta, F; Mendonça, C; Ferreira,
Rodrigues, F; Moraes, M

Universidade do Estado do Amazonas, Brasil, Manaus

Resumo

A população brasileira é fortemente miscigenada, resultante da mistura ancestral entre ameríndios, portugueses e africanos, que refletem em diferentes proporções ancestrais nas regiões brasileiras. A Região Norte é caracterizada por possuir um “*background*” diferenciado em relação às demais, com maiores percentuais de ancestralidade nativa americana. Este estudo teve como meta estimar a ancestralidade genômica na população do Amazonas, utilizando como ferramenta um painel de marcadores autossômicos, de 46 marcadores informativos de ancestralidade, do tipo *Indel*. Todos os marcadores foram analisados via PCR *multiplex* e detectados por eletroforese capilar. A análise da composição estrutural da população dos 1363 indivíduos foi realizada pelo *software Structure*. As estimativas de ancestralidade global do grupo de 941 indivíduos saudáveis mostraram uma população miscigenada, com distintas proporções de ancestralidade nativa americana (39%), europeia (36%) e africana (25%). A estimativa ancestral em ambos os grupos (casos e controles), demonstrou uniformidade, sendo assim, um grupo padrão para desenhos do tipo caso-controle. Os resultados referentes à autodeclaração de cor de 316 indivíduos que se declararam nas etnias branca, parda, indígena e preta, mostraram concordância entre a ascendência genética, variando somente entre o grupo autodeclarado preto. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os dados descritos na literatura e com os registros históricos da demografia brasileira, além de confirmarem que a população analisada é confiável e pode ser utilizada em estudos de associação genética para correção da estratificação populacional.

1 INTRODUÇÃO

Estudos de associação genética são ferramentas-chave no controle e no entendimento de doenças complexas, as quais são geralmente do tipo caso-controle, em que se analisam dois grupos: um doente (caso) e um saudável (controle), sendo possível avaliar a chance de adoecimento em ambos os grupos. Quando se trabalha com esse tipo de análise, o ideal é que os dois grupos avaliados sejam o mais homogêneo possível, pois se os sujeitos forem de subpopulações diferentes, nas

quais as frequências alélicas e os marcadores analisados diferem, isso podem gerar resultados espúrios, enviesando o estudo (SANTOS et al., 2009).

A população brasileira é descrita como um grupo fortemente miscigenado, oriundo de três raízes ancestrais: os ameríndios, que já habitavam o Brasil antes de seu descobrimento; os africanos, devido ao processo de imigração involuntária, ou seja, trazidos à força, com o uso de violência, para o trabalho escravo; e os europeus, especificamente os portugueses que foram os primeiros a imigrar ao Brasil. Toda essa mistura tornou o Brasil um país heterogêneo, rico em cultura e raças diferentes (RIBEIRO, 1995; DURSO et al., 2014) e essa miscigenação reflete no DNA de cada indivíduo. Com o intuito de identificar o perfil ancestral e corrigir a estratificação populacional, foram desenvolvidos painéis de marcadores informativos de ancestralidade (*AIMs*). Esses marcadores são altamente precisos na detecção de populações diferentes (PEREIRA et al., 2012).

Conhecendo a real necessidade que nosso grupo de pesquisa tem em suas atividades diárias, com estudos de associação genética, o presente trabalho teve o objetivo de analisar o perfil ancestral da população atendida na Fundação Alfredo da Matta - FUAM e disponibilizar esses dados em um painel, para serem utilizados como covariável de correção. Sabe-se que a população do Norte é descrita por ter sua ascendência genética diferenciada, com um maior percentual de ancestralidade nativa americana, quando comparada com as demais regiões (SANTOS et al., 2009; PENA et al., 2011; MANTA et al., 2013).

Visando uma prática de reprodutibilidade na rotina laboratorial, foi utilizado um painel de *AIMs*, do tipo *InDels* (inserção/deleção), que são utilizados comumente em trabalhos associados à identificação humana e à análise ancestral, por possuírem propriedades relevantes para os estudos genéticos. Os marcadores de inserção/deleção são pequenos, estão distribuídos ao longo do genoma e facilitam a amplificação do DNA, inclusive em amostras degradadas. Estão dispersos em todo o genoma humano e a grande variabilidade na sua frequência alélica, nas diferentes amostras populacionais estudadas, mostra que eles são importantes marcadores de ancestralidade e de análise forense (SANTOS et al., 2009).

Utilizamos um painel de 46 marcadores, elaborado por Pereira e colaboradores (2012) e replicado em três populações puras e duas heterogêneas, a fim de garantir a confiabilidade dos dados. Além disso, todos os marcadores são autossômicos e foram retirados de um banco de dados público. Este painel foi utilizado em outros

estudos (MANTA et al, 2013), possui uma precisão acima de 90% para inferir a ancestralidade, apresenta boa reprodutibilidade e pode ser utilizado em diferentes estudos populacionais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas sob o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) de cada participante. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética, da Fundação Alfredo da Matta: CEP/FUAM com o Parecer 555.620.

Coleta de amostras e extração de DNA

As etapas deste trabalho foram realizadas em diferentes Instituições: na Fundação Alfredo da Matta – FUAM (Manaus) foram realizadas as etapas de coleta do material biológico e extração do DNA; na Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz (Rio de Janeiro) sucedeu as etapas de quantificação, diluição, PCRs das amostras e análises estatísticas e na Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ (Rio de Janeiro), as etapas de eletroforese capilar e genotipagem.

As amostras utilizadas nesta pesquisa foram provenientes de um estudo maior (Doutorado), realizado na Fundação Alfredo da Matta (FUAM), intitulado “**Marcadores moleculares, genéticos e sorológicos na hanseníase: suporte ao diagnóstico clínico de pacientes e vigilância dos contatos**”, coordenado pelo Me. André Luiz Leturiondo. Essas amostras foram coletadas no período de março de 2014 a dezembro de 2017, na FUAM e mantidas refrigeradas a 8°C. Foram incluídos no estudo os indivíduos que compareceram à FUAM em busca de atendimento dermatológico, nesse período e foram divididos em dois grupos: pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis.

O grupo de pacientes foi composto por todos aqueles diagnosticados clinicamente pelo médico dermatologista, de acordo com os sintomas apresentados. Enquanto que o grupo saudável foi formado por indivíduos que compareceram à FUAM para a realização do exame dermatológico, para fins de atividades recreativas

ou vínculo empregatício. Ambos os grupos passaram por uma criteriosa avaliação e feita por um profissional devidamente capacitado.

A extração de DNA foi realizada por meio do Kit comercial *Blood & Tissue* (Qiagen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, o DNA foi quantificado através de espectrometria para verificar os padrões de pureza e concentração de cada amostra, utilizando o sistema NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Scientific*).

Para a realização da PCR (Reação em cadeia da Polimerase) o DNA precisou estar em uma concentração de 0,5ng/ul a 10ng/ul, pois é uma metodologia altamente sensível e que requer de baixas quantidades de DNA. Com os resultados da quantificação foi aplicado o cálculo de concentração nessas amostras, com o objetivo de deixá-las dentro do padrão almejado para a PCR, cuja concentração final esperada era de 5ng/ul de DNA, em um volume final de 25uL, para cada amostra. Após a diluição, foram escolhidas amostras aleatórias para quantificar e verificar se estavam dentro dos valores desejados.

Marcadores Genéticos e Genotipagem

PCR

Foi utilizado o sistema *multiplex*, composto por 46 marcadores *InDels*, que permite estimar as proporções de três fontes ancestrais diferentes (ameríndios, africanos e europeus), na população escolhida, em uma única reação de PCR (PEREIRA et al., 2012), tanto por diferença nos tamanhos dos fragmentos e por fluorescências diferentes. Para a reação de PCR utilizamos o multiplex AIM-Indels, usamos o QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen). A mistura de reação foi composta por mastermix 1X, 1µL do mix de primer e 0.5 - 5ng de DNA genômico em uma reação de 5µL de volume final. Obedecendo as seguintes condições termocíclicas: etapa inicial de 95°C por 15min; 30 ciclos de 94°C por 30seg, 60°C por 90seg, e 72°C por 45seg; e 72°C por 60min de extensão final. As por 30°C por 15 min; 30 ciclos de 94°condições termocíclicas foram: etapa inicial de 95 C por 60 min de extensão final. As PCRs foram desenvolvidas no termociclador Veriti (Life Technologies). Do produto de PCR é retirado 1 µL e adicionado 8,8 µL de Formamida HI-DI e 0,2 µL do padrão de tamanho interno (STD – size standard) GeneScanTM500 LIZ® ambos AppliedBiosystems.

O uso de *primers* marcados com fluoróforos possibilitou a utilização de técnicas automatizadas de eletroforese capilar, realizadas no sequenciador automático 3130XL (*Thermo Fisher*), com o auxílio do *software Genetic Analyzer* (*Thermo Fisher*), que se fundamenta na análise por meio de tamanhos de fragmentos distintos e de fluorescências diferentes, emitindo para cada amostra analisada, um eletroferograma.

A mobilidade eletroforética dos fragmentos de DNA, estipulada pela sinalização liberada pelos respectivos fluoróforos, retrata seu tamanho relativo em comparação com o marcador de referência de peso molecular conhecido, o Liz450 (*Thermo Fisher*). O sequenciador automático 3130XL (*Thermo Fisher*), realiza a eletroforese em oito capilares simultaneamente e a identificação dos fragmentos de DNA é realizada através de uma câmara laser, que detecta os sinais fluorescentes emitidos conforme sua passagem. Desse modo, as frequências alélicas divergem significativamente entre os grupos étnicos analisados (ameríndio, africano e europeu). Os marcadores *InDels* que foram utilizados neste trabalho, estão listados na Tabela 1. Os alelos gerados foram analisados com o auxílio do *software Gene Mapper V4.0* (*Thermo Fisher*) e foram comparados com o marcador padrão Liz450 (*Thermo Fisher*). Posteriormente, as informações geradas foram tabuladas em uma planilha Excel para serem analisadas nos *softwares* específicos.

Tabela 1. AIM- *InDels* utilizados no *Multiplex*

MID*	rs number	Chromosome	Alleles described in dbSNP
MID- 1470	rs2307666	11	-/GTTAC
MID- 777	rs1610863	16	-/GAA
MID- 196	rs16635	6	-/CAT
MID- 881	rs1610965	5	-/ACTT
MID- 3122	rs35451359	18	-/ATCT
MID- 548	rs140837	6	-/CT
MID- 659	rs1160893	2	-/CT
MID- 2011	rs2308203	2	-/CTAGA
MID- 2929	rs33974167	8	-/TA
MID- 593	rs1160852	6	-/TT
MID- 798	rs1610884	5	-/GGGAAA
MID- 1193	rs2067280	5	-/AT
MID- 1871	rs2308067	7	-/TT
MID- 17	rs4183	3	-/TAAC
MID- 2538	rs3054057	15	-/AACA
MID- 1644	rs2307840	1	-/GT
MID- 3854	rs60612424	6	-/TCTA
MID-2275	rs3033053	14	-/TCAGCAG
MID- 94	rs16384	22	-/AAC
MID- 3072	rs34611875	18	-/GCCCCCA
MID- 772	rs1610859	5	-/TAG
MID- 2313	rs3045215	1	-/ATTATAACT
MID- 397	rs25621	6	-/TTCT
MID- 1636	rs2307832	1	-/AA
MID- 51	rs16343	4	-/TTTAT
MID- 2431	rs3031979	8	-/ATTG
MID- 2264	rs34122827	13	-/AAGT
MID- 2256	rs133052	22	-/CAT
MID- 128	rs6490	12	-/ATT
MID- 15	rs4181	2	-/AAATACACAC
MID- 2241	rs3030826	6	-/GTCCAATA
MID- 419	rs140708	6	-/AATGGCA
MID- 943	rs1611026	5	-/TGAT
MID- 159	rs16438	20	-/CCCCA
MID- 2005	rs2308161	10	-/AACAAAT
MID- 250	rs16687	7	-/CA
MID- 1802	rs2307998	5	-/GGA
MID- 1607	rs2307803	3	-/TG
MID- 1734	rs2307930	6	-/CCAT
MID- 406	rs25630	6	-/AG
MID- 1386	rs2307582	1	-/AAACTATTCATTTTCACCCT
MID- 1726	rs2307922	1	-/CAAGAACTATAAT/CACTATCTATTAT
MID- 3626	rs11267926	15	-/AATATAATTTCTCCA
MID- 360	rs25584	12	-/AA
MID- 1603	rs2307799	5	-/TTGT
MID- 2719	rs34541393	20	-/AACT

Fonte: Adaptado de PEREIRA et al. (2012) *Nomenclatura de acordo com o banco de dados de polimorfismos de inserção/deleção de Marshfield;

Análise de dados

A análise estrutural da composição étnica foi realizada no *software Structure* (PRITCHARD et al., 2000). Este *software* realiza as análises de forma comparativa, ou seja, fazendo comparação entre as populações parentais (ameríndia, africana e europeia) com a população teste. Assim, o *Structure* não apenas infere a frequência de diferentes populações, mas também indica indivíduos às suas populações, analisa zonas híbridas, distingue e estima as frequências alélicas de migrantes e populações misturadas.

3 RESULTADOS

Os resultados de genotipagem das 1363 amostras coletadas foram divididos em dois grupos (população teste): 941 indivíduos saudáveis para hanseníase (controles) e 422 pacientes com hanseníase.

A Tabela 2 mostra as médias de proporções ancestrais das diferentes populações puras (ameríndia, africana e europeia) e da população teste (casos e controles). As médias de ancestralidade entre os dois grupos da população teste (casos e controles) pouco variaram e nota-se uma proporção maior de ancestralidade europeia e nativa americana, nos indivíduos do Amazonas.

Tabela 2. Médias de ancestralidade geradas pelo *Software Structure*

Amostras de Populações		AFR	EUR	NAM	N Amostral
População Pura	Africano (AFR)	1.000	0.000	0.000	105
	Europeu (EUR)	0.006	0.991	0.003	158
	Ameríndio (NAM)	0.012	0.018	0.970	64
População Teste	Casos	0.274	0.368	0.358	422
	Controles	0.248	0.363	0.389	941

A Figura 1 mostra o resultado gerado pelo *Software Structure* e demonstra de forma ilustrativa as médias ancestrais, representadas em forma de agrupamentos (*clusters*) nos vértices de um triângulo, onde cada vértice representa uma população pura, ilustrada nas cores: azul (nativo americano), vermelho (africano) e verde (europeu). A população teste (casos e controles) está destacada nas cores: amarela e rosa e o agrupamento ocorre de acordo com a origem ancestral de cada indivíduo. Dessa forma, é notório que a população teste possui características ancestrais parecidas, por estar formando um único grupo mais próximo das extremidades NAM (nativa americana) e EUR (européia).

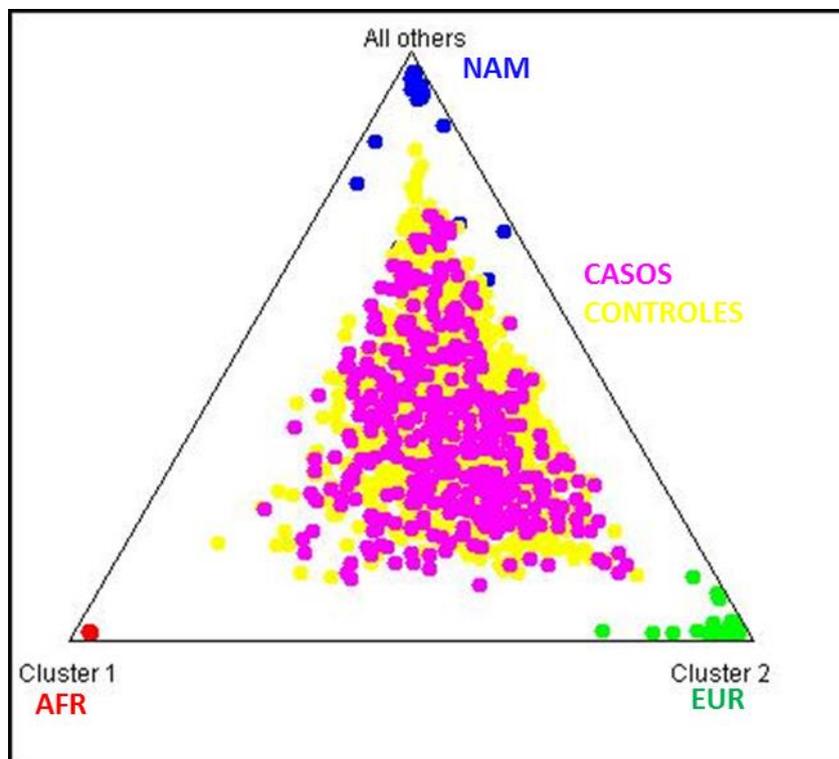


Figura 1. Distribuição das populações analisadas, por agrupamento (*cluster*), dividido nas extremidades de cada vértice (AFR: África; EUR: Europa e NAM: Nativo americano), de acordo com a porcentagem de proporções ancestrais geradas no *software Structure*. Cada ponto corresponde a um indivíduo separado e as proporções ancestrais podem ser determinadas pela proximidade nos vértices dos três eixos.

Na Figura 2, os dados de ancestralidade genômica individual estão demonstrados em colunas. Cada linha na vertical indica um indivíduo e cada cor, um grupo analisado. Ambas as figuras demonstram, em uma dinâmica diferente, os mesmos resultados: uma população homogênea entre si (casos e controles), com taxas maiores de ancestralidade nos grupos ameríndios (AME) e europeus (EUR).

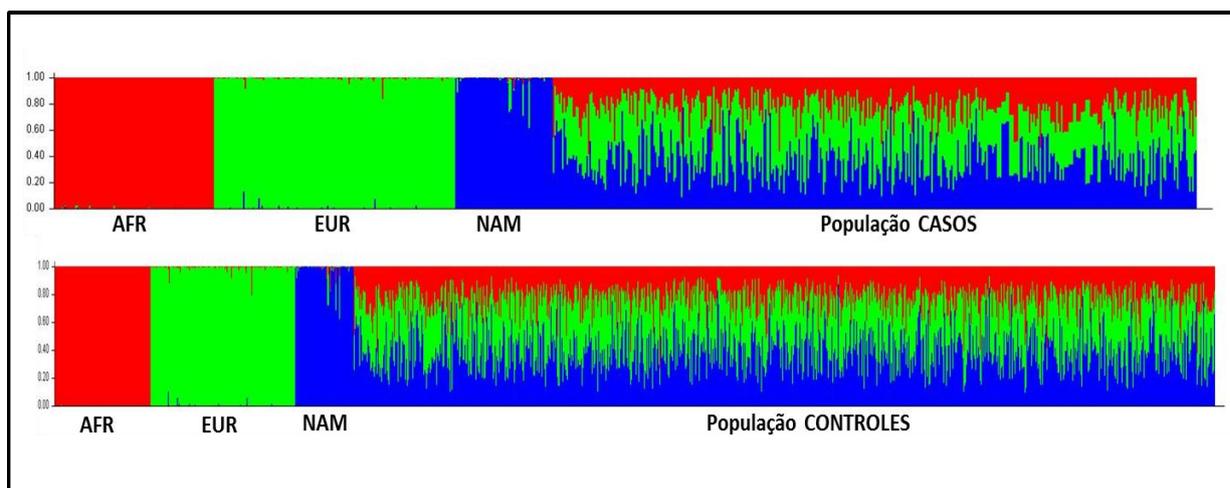


Figura 2. Estimativa de ancestralidade individual, obtido através de amostras de referência, retiradas de um banco de dados público HGDP-CEPH e indivíduos testes da região Norte Manaus, utilizando um painel de 46 AIM- INDELS (AFR: África; EUR: Europa e NAM: Nativo americano). As proporções foram geradas pelo *Software Structure*, obedecendo aos parâmetros indicados para análise.

Dentre os 1363 indivíduos envolvidos no estudo, 316 que constituíam o grupo de casos, tinham disponíveis em suas fichas dados referentes à cor da pele (etnia autodeclarada). Desse total, 104 eram do sexo feminino e 212 do sexo masculino. Essas informações foram obtidas por autoavaliação, isto é, cada participante declarou sua etnia (branca, indígena, parda e preta). Essas informações foram utilizadas para se fazer uma análise de associação de cor autodeclarada e cruzadas com os resultados de ancestralidade, fornecidos pelos AIMS. É possível observar, na Figura 3, que indivíduos autodeclarados brancos possuem uma maior taxa de ancestralidade europeia. O mesmo é verificado no grupo autodeclarado indígena, em que há uma maior taxa de ancestralidade nativo americana encontrada. Nos indivíduos autodeclarados pardos há uma mistura mais significativa das três raízes ancestrais, ou seja, um grupo mais miscigenado. Porém, ao analisar o grupo autodeclarado preto é notório uma discrepância nos dados de etnia *versus* ancestralidade, demonstrando

uma maior taxa de ancestralidade europeia e não de africanos, em acordo como todos os estudos de ancestralidade no Brasil.

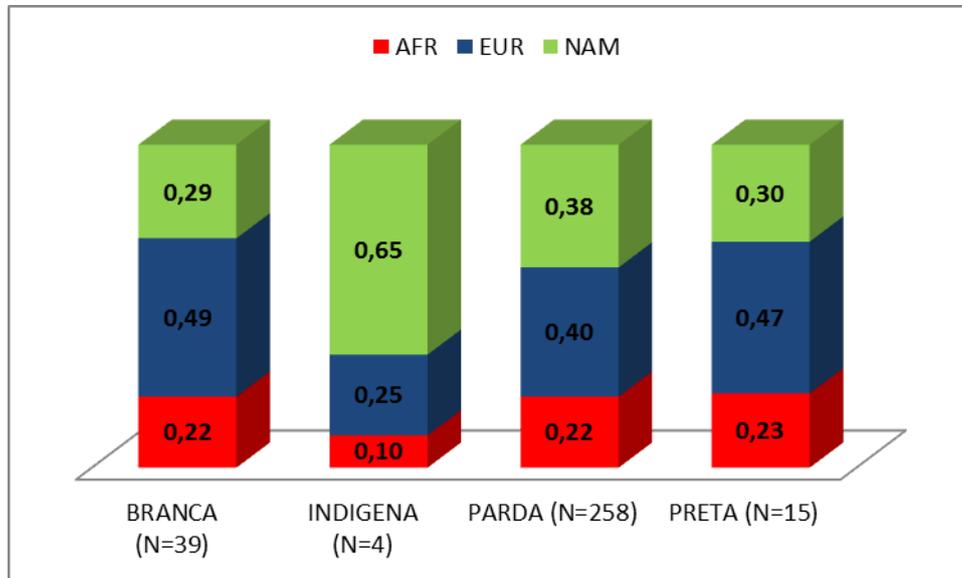


Figura 3. Comparação da cor/etnia autorrelatada *versus* a ancestralidade, por meio de AIMS, em um grupo de 316 indivíduos. É demonstrado as parcelas das proporções genômicas de ancestralidade Africana (AFR), Européia (EUR) e Nativo Americana (NAM), em quatro grupos de etnias autodeclarados como branca, indígena, parda e preta.

4 DISCUSSÃO

Com o advento da Biologia Molecular, a Ciência proporcionou novas estratégias para a pesquisa, o que possibilitou estudos de populações atuais para fazer ilações com contextos históricos, como realizado neste trabalho. Utilizamos um painel de 46 AIMS, do tipo *InDels*, para verificar a composição das frequências alélicas, por meio da ancestralidade genética, de 1.363 indivíduos, sendo até o momento, a primeira avaliação realizada com um número expressivo de amostras da população residente no Estado do Amazonas. Utilizamos esta metodologia por permitir a análise ancestral dispondo de um número menor de marcadores testados e já utilizados por outros grupos de pesquisas, com uma ótima reprodutibilidade e alto grau de confiabilidade (MANTA et al., 2012;9 PEREIRA et al., 2012; HEINZ et al., 2013; MANTA et al., 2013; ROMANINI et al.,2015; SANTOS et al., 2009).

Os indivíduos selecionados neste estudo foram divididos em dois grupos: o grupo caso, composto por 422 pacientes com hanseníase e o grupo controle, formado por 941 indivíduos saudáveis, com os objetivos de estimar a ancestralidade genômica, fornecida pelas frequências alélicas dos *InDels*; correlacionar as informações de cor autorrelatada com os dados genéticos e disponibilizar um painel de ancestralidade genética para ser utilizado como correção da estratificação populacional.

A origem da formação da sociedade brasileira sempre foi alvo de curiosidade e entender como o processo de colonização contribuiu para a formação do nosso povo, ainda é algo cercado de histórias, suposições e hipóteses. Trabalhos sociológicos, antropológicos e históricos já demonstraram essa preocupação e isso pode ser visualizado nas obras de Paulo Prado, em “Retrato do Brasil” (1927); Gilberto Freyre, em “Casa grande e senzala” (1933); Sérgio Buarque de Holanda, com “Raízes do Brasil” (1936) e Darcy Ribeiro, em “O povo brasileiro” (1995), por exemplo. Entretanto, responder essas questões, a respeito da composição étnica, com base nas características fenotípicas, é algo muito empírico. A forma mais precisa de se obter essas informações é por meio de marcadores genéticos informativos de ancestralidade (AIMs), como os *InDels*.

Neste trabalho, foi possível estimar as frequências alélicas ancestrais, de 941 indivíduos amazonenses, que compreendem a população formada por nosso grupo controle (saudáveis para doenças de pele). Optou-se por caracterizar o perfil genético ancestral destes indivíduos (941 saudáveis) para inferir o padrão ancestral da população de Manaus. Isso porque o grupo formado pelos pacientes com hanseníase poderia sugerir resultados enviesados devido às frequências de determinados alelos serem específicas deste grupo, ou, por terem sofrido algum tipo de seleção natural e assim, por poderem apresentar características geneticamente distintas.

Os resultados obtidos da amostragem dos indivíduos saudáveis retratam uma população miscigenada, com maiores proporções de ancestralidade nativo americana (39%) e Europeia (36%) e com menor contribuição Africana (25%). A frequência aumentada de ancestralidade nativa americana amazonense, descrita no presente trabalho, corrobora com o já relatado por Manta e colaboradores (2013), que encontrou uma frequência ameríndia de 37%, em 42 amostras procedentes de Manaus. Entretanto, é diferente das frequências nativos americanas encontradas em trabalhos anteriores com amostras de outros locais do Brasil, como da população do

Pará na qual a ancestralidade nativa americana encontrada foi de 29% (PEREIRA et al., 2012) e de 18,5% (PENA et al., 2011); na Bahia de 9% (PENA et al., 2011); 9% em Santa Catarina (PENA et al., 2011); de 14% no Rio de Janeiro (MANTA et al., 2012) e de 15% no Mato Grosso do Sul (MANTA et al., 2013).

É possível verificar, na Tabela 3, as frequências ancestrais encontradas em diferentes estudos e região do Brasil. A alta taxa de ancestralidade nativa americana encontrada em Santa Isabel do Rio Negro (76%) se deve ao fato de ser uma cidade formada por 90% da população indígena, o mesmo acontece com as frequências ancestrais de Terena (78%).

Tabela 3. Frequencias ancestrais descritas no Brasil.

	Amostras de populações	AFR	EUR	NAM	Referência
NORTE	Santa Isabel do Rio Negro	7%	17%	76%	MANTA et al.,2013
	Manaus	16%	46%	38%	MANTA et al.,2013
	Belém	17%	54%	29%	PEREIRA et al., 2012
	Belém	14,4%	57,3%	28,3%	SANTOS et al.,2009
	Belém	69%	10%	19%	PENA et al., 2011
	Amazonas	25%	36%	39%	ESTE ESTUDO
NORDESTE	Pernambuco	28%	57%	15%	MANTA et al.,2013
	Alagoas	27%	55%	19%	MANTA et al.,2013
	Salvador	50,5%	42,4%	5,8%	LIMA-COSTA et al., 2015
	Fortaleza/ Ilhéus	60%	30%	10%	PENA et al., 2011
CENTRO-OESTE	Mato Grosso do Sul	26%	59%	15%	MANTA et al.,2013
	Terena	9%	13%	78%	MANTA et al.,2013
SUDESTE	Minas Gerais	29%	59%	12%	MANTA et al.,2013
	Espírito Santo	13%	74%	12%	MANTA et al.,2013
	Rio de Janeiro	31%	55%	14%	MANTA et al.,2013
	São Paulo	25%	63%	12%	MANTA et al.,2013
	BambuÍ	9,6%	83,8%	5,4%	LIMA-COSTA et al., 2015
	Rio de Janeiro	74%	17%	7%	PENA et al., 2011
SUL	Paraná	17%	71%	12%	MANTA et al.,2013
	Santa Catarina	11%	80%	9%	MANTA et al.,2013
	Rio Grande do Sul	14%	73%	13%	MANTA et al.,2013
	Pelotas	6,6%	85,3%	6,3%	MANTA et al.,2013
	Joenville/Porto Alegre	80%	10%	10%	PENA et al., 2011

A frequência nativo americana aumentada (39%) descrita no presente estudo corrobora ainda com relatos históricos do processo da colonização do Estado do Amazonas, onde se encontravam diversas tribos de índios, como os Manaós, Yanomami e os Torás, que lutaram bravamente contra a colonização portuguesa (AFONSO, 2010). Com relação às frequências africanas encontradas aqui (25%), deve-se mais à imigração nordestina devido ao comércio local e à construção da Transamazônica (COSTA, 2006), do que ao tráfico negreiro. O domínio português em terras brasileiras vem desde o descobrimento do Brasil, em 1500, e a região Norte, em particular, sofreu com este processo entre 1637 a 1639 com a expedição de Pedro Teixeira, na Região Amazônica, afirmando assim a presença lusitana nas terras da região (AFONSO, 2010). O Nordeste teve uma alta contribuição genética advinda dos escravos africanos, nos séculos XVI e XVIII, principalmente devido ao ciclo da cana de açúcar (VAINFAS, 2007).

Os dados aqui gerados demonstram que a população da região Norte, mais precisamente de Manaus, difere das demais populações brasileiras, mostrando um aumento de ancestralidade nativo americana. Enquanto que no Sul e Sudeste, por exemplo, a contribuição Europeia é mais predominante (maior que 70%) e no Nordeste a taxa ancestral africana é maior (GIOLO et al., 2011). Além disso, nossos dados estão em conformidade com estudos anteriores que utilizaram a mesma metodologia de marcadores autossômicos do tipo *InDel*, e demonstraram características ancestrais tri híbrida (Europeia, Africana e Ameríndia) na população brasileira, com distintos graus de ancestralidade que varia de acordo com cada região geográfica (LINS et al. 2011 SANTOS et al., 2009; PENA et al., 2011).

Pena e colaboradores (2000) analisaram dois marcadores moleculares de linhagem genealógicas, na perspectiva de investigar a herança ancestral recebida pelas linhagens paterna (cromossomo Y) e materna (DNA mitocondrial). O estudo foi realizado com indivíduos considerados brancos e foi observado que a maior parte das linhagens de cromossomos Y, veio da Europa (90%), principalmente de Portugal, enquanto que a genética materna veio de origens ameríndias ou africanas. Esses dados, mais uma vez, corroboram com a descrição histórica, de que os Europeus se relacionaram com índias na sua chegada ao Brasil e mais tarde, com a entrada de africanos para o trabalho escravo a história se repetiu entre os senhores (Europeus) com suas escravas (Africanas), dando início assim, a uma população altamente miscigenada (RIBEIRO, 1995).

Diante de toda a miscigenação da população brasileira, fica evidente a necessidade de se inferir a estrutura populacional para melhor entender a relação de alelos associados à ancestralidade, com alelos associados a doenças, principalmente nos estudos do tipo caso-controle. Em estudos de associação genética, do tipo caso-controle, faz-se necessário o monitoramento de alguns fatores, que podem ser de confundimento, como o sexo, a idade, a ancestralidade, fator econômico, entre outros. Essas informações são baseadas naquelas passadas pelo próprio participante do estudo, porém, a etnia autodeclarada é um dado muito subjetivo e propenso a erros de classificação (LIMA-COSTA et al., 2015), quando comparado à idade, por exemplo, principalmente quando se trata de uma população altamente miscigenada. Sendo assim, o mais adequado para essas correções é utilizar a ancestralidade genômica, baseada nas análises do DNA dos indivíduos, já que estas características não mudam com o tempo (LIMA-COSTA et al., 2015), e usá-las para corrigir o efeito de estratificação populacional, característica comum em amostras oriundas de países miscigenados (LINS et al., 2011; GIOLO et al., 2011; SANTOS et al., 2015).

Nesse sentido, os resultados deste estudo podem ser utilizados como fator de correção para a estratificação populacional, em estudos de associação genética, do tipo caso-controle, em doenças de pele, como a hanseníase, pois além de nossos participantes terem passado por um rigoroso exame de pele (por especialistas em Dermatologia), nossos resultados corroboram com as frequências já relatadas na literatura e com os processos históricos da colonização. Neste caso, vale ressaltar que a população utilizada neste estudo faz parte de um trabalho maior de associação genética, do tipo caso-controle, com SNPs que influenciam no desfecho da hanseníase. Observamos que a ancestralidade entre casos e controles é similar, isso mostra que a população utilizada nos estudos de associação genética em hanseníase, na FUAM, é homogênea e confirma ser um grupo padrão para este tipo de análise.

Sabe-se que SNPs associados ao desfecho de algumas doenças exibem frequências alélicas específicas das populações em que são analisadas, podendo levar a resultados falsos positivos, falsos negativos e com associações espúrias, causados pela estratificação populacional (LIMA-COSTA et al., 2016; SANTOS et al., 2009). Além disso, fatores de confundimento como, idade, sexo, ascendência genética, etnia autorrelatada, condição social, escolaridade podem enviesar os resultados (DURSO et al., 2014). Existem trabalhos de associação genética que

buscam associar variantes no DNA ao desfecho de determinadas doenças e que já utilizam a ancestralidade genômica para confirmar tal associação.

Lima-Costa e colaboradores (2016) analisaram a associação genômica ancestral com a infecção por *Trypanosoma cruzi* e a cardiomiopatia, em 1.341 indivíduos de Bambuí – Minas Gerais, em um painel de 370.539 SNPs. Eles encontraram uma associação significativa relacionando a ancestralidade nativo americana e africana com a infecção pelo *T.cruzi* ($p < 0.001$), mesmo após os ajustes para outras covariáveis. Entretanto, não foi possível saber se essa associação foi de fato uma consequência da ancestralidade genética ou se foi exposição diferencial à infecção (fatores ambientais).

Vieira e colaboradores (2015) constataram uma associação positiva entre o polimorfismo Arg521Lys, no gene *EGFR* e a suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de estômago, em indivíduos residentes em Belém (Pará). Porém, quando os dados foram corrigidos para a ancestralidade e assim, eliminar os efeitos da estratificação populacional, a associação foi perdida (antes da correção com os AIMS: $p = 0,03$; depois da correção com os AIMS: $p = 0,06$).

Lima-Costa e colaboradores (2015) analisaram se indivíduos com maiores taxas de ancestralidade africana teriam mais chances de desenvolver a hipertensão, do que os outros grupos étnicos, já que esta doença tem uma prevalência maior em indivíduos de pele preta. Foram genotipados 1.272 indivíduos de Bambuí – Minas Gerais, com mais de 60 anos de idade, em um painel de 370.539 SNPs. Não houve associação do perfil genômico africano com a hipertensão, mas sim, a fatores sociais e econômicos. Um outro estudo, feito por Kittles e colaboradores (2002), verificou que existia uma associação positiva do gene *CYP3A4* (que codifica o citocromo P450) e o desenvolvimento do câncer de próstata. Entretanto, quando foi realizada a correção da ancestralidade, a associação perdeu significância estatística.

Até em grupos homogêneos geneticamente, como é o caso dos europeus, a associação de polimorfismos ligados a doenças, como, o transtorno bipolar, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla, por exemplo, perdeu significância estatística depois de feita a correção para ancestralidade, com 300 AIMS, em 4.198 amostras europeias (antes da correção com os AIMS: $p = 0,003$; depois da correção com os AIMS: $p = 0,12$) (PRICE et al., 2008). Isto mostra que, mesmo em populações mais geneticamente homogêneas, os resultados dos SNPs podem ser associados erroneamente a uma doença devido à estratificação populacional.

Esses trabalhos descritos reforçam a importância de se usar os AIMs para corrigir os resultados das análises de associação genética, que buscam variantes que possam influenciar no desenvolvimento de doenças e assim, tornar os achados mais consistentes e confiáveis.

Como última abordagem deste trabalho, avaliamos a relação entre a etnia autodeclarada e confrontamos com os dados de ancestralidade genética, evidenciando que há concordância entre a ascendência genética com a autodeclaração de cor, nos três grupos avaliados (branco, indígena e pardo), discordando somente o grupo autorrelatado preto que teve uma contribuição menor de ancestralidade africana (AFR: 23%, EUR: 47% e NAM: 30%). Entretanto, é difícil interpretar a cor da pele, pois ela é mutável e não é somente a cor da pele que define a etnia de um indivíduo. É importante considerar também as características morfológicas, como: cor dos olhos, tipos de cabelos e traços faciais. Cada população tem suas características próprias; o povo africano possui características fenotípicas de caracteres dominantes, quando comparadas aos europeus da Finlândia, que tem característica fenotípica recessiva (RUIZ-LINARES et al., 2014). São pontos que precisam ser levados em consideração no momento da autodeclaração de cor da pele. Ruiz-Linares e colaboradores (2014), demonstraram o quanto cada característica fenotípica reflete na ancestralidade genética: a cor da pele, por exemplo, possui uma maior relação com a ancestralidade (19%), seguido do tipo de cabelo (8%), cor dos olhos (4%) e cabelo (5%) e no máximo 1% para os demais traços.

Grande parte dos estudos de ancestralidade genética versus autodeclaração de cor, os indivíduos definidos como pretos, possuem altos índices de ascendência europeia e africana (LEITE et al., 2011; PENA et al., 2011; DURSO et al., 2014). Visto todo o processo de ocupação territorial que ocorreu no Brasil, é esperado que a proporção de ascendência europeia seja representativa em todos os grupos, assim como, também é esperado que os percentuais de ancestralidade africana e indígena aumentem de acordo com a região analisada. No grupo autorrelatado preto, esperávamos uma ancestralidade aumentada de africanos. Porém, assim como demonstrado em outros trabalhos e considerando que a etnia não depende de um único fator, nossos dados corroboram com os disponíveis na literatura (DURSO et al., 2014; PENA et al., 2011; LEITE et al., 2011). Já as proporções de contribuição ancestral encontrada no grupo de indivíduos autorrelatados como pardos e brancos, se assemelham com os achados de Pena e colaboradores (2011),

caracterizando este grupo com uma maior mistura genética e o outro como mais homogêneo respectivamente.

Em relação à população indígena, que habita as áreas urbanas, o IBGE relatou um aumento de indivíduos que se autodeclararam índios, entre 1991 a 2000. Este fato pode estar relacionado não só a fatores migratórios, mas também ao crescimento no número de pessoas que se reconhecem como tal (<https://indigenas.ibge.gov.br>). Nosso estudo mostrou que a ancestralidade genética possui uma forte associação com a autodeclaração de cor da pele (65%) indígena, entretanto, só tínhamos a informação de quatro pacientes com hanseníase, para este grupo.

Vale frisar, que os dados obtidos neste trabalho além de confirmarem estudos prévios, mostram que este painel pode ser usado em estudos de associação genética, do tipo caso-controle, em doenças de pele, como a hanseníase. Além de ressaltar que cada indivíduo é uma combinação de fatores únicos, proveniente de uma diversidade genética ampla, de fatores evolutivos, de processos históricos construídos e em construção e que o DNA tem a explicação para muitas respostas.

5. CONCLUSÕES

- Foi obtida a ancestralidade genética de 1.363 indivíduos, atendidos na FUAM, por meio de um painel de 46 AIMs – *Indels*

- A ancestralidade genômica do grupo de 941 indivíduos controles foi de: 39% de nativa americana; 36% de europeia e 25% de africana, enquanto que do grupo de 422 pacientes foi: 38% de nativa americana; 37% de europeia e 27% de africana.

- O grupo demonstrou uniformidade, considerado um grupo padrão para desenhos do tipo caso-controle

- A correlação autodeclaração de cor, de 316 indivíduos, versus ancestralidade genética, mostrou concordância, com uma leve variação entre o grupo autodeclarado preto

- As amostras analisadas podem ser utilizadas para corrigir para a estratificação populacional, em estudos de associação genética, do tipo caso-controle, em doenças de pele, como a hanseníase

6 REFERÊNCIAS

AFONSO, L. **Panorama da cidade de Manaus: crise, progresso e cultura na década de 1960.** SOMANLU. 10(2). 2010

ALTER, A; GRANT, A; ABEL, L; ALCAIS ,A; SCHURR, E. **Leprosy as a genetic disease.** Mamm Genome 22:19–31. 2011

ARAÚJO, A. V. et. al. **Povos indígenas e a lei dos brancos: o direito à diferença.** Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Continuada, Alfabetização e Diversidade; LACED/Museu Nacional, 2006.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Manaus: Fundação Alfredo da Matta, 2000-.
Anual

BORIS, F. História do Brasil. EDITORA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. 12 ed. São Paulo. 2006

BOXER, CHARLES.R. **O império marítimo português 1415–1825.** São Paulo: COMPANHIA DAS LETRAS. 2002.442 páginas.

CARDOSO, C; PEREIRA, C.A; BRITO-DE-SOUZA, N; DIAS-BAPTISTA, I.M., ET AL. **IFNG + 874T> A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians.** HUM.GENET. 128(5).481-490.2010

CARDOSO, C; PEREIRA, C.A, BRITO-DE-SOUZA, V; DURAES, S., ET AL. **TNF -308G> A Single Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Among Brazilians: A Genetic Epidemiology Assessment, Meta-Analysis, and Functional Study.** THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES;204:1256–63. 2011

CARDOSO, C; PEREIRA, C.A; MARQUES, C; MORAES, M. **Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome.** FUTURE MICROIOL. 6(5),533-549. 2011

CHIMUSA, E; MEINTJES, A; TCHANGA, M; MULDER, N; SEOLGHE, C., et al. **A Genomic Portrait of Haplotype Diversity and Siganatures of Selection in Indigenous Southern African Populations.** PLOS GENETICS.11(3). e1005052.2015

DA COSTA. G. P. **História e Geografia : livro do estudante : ensino fundamental /** Coordenação : Zuleika de Felice Murrie. — 2. ed. — Brasília : MEC : INEP, 2006.

DURSO, D; BYDLOWSKI, S.P; HUTZ, M.H; SUAEZ-KURTZ, G; MAGALHÃES, T; PENA, S.D. **Association of Genetic Variants with Self-Assessed Color Categories in Brazilians.** PLOS ONE 9(1): e83926. 2014

FAUSTO; BORIS. **História do Brasil.** 12 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2006.

FONSECA, D. **O trabalho do escravo de origem africana na Amazônia.** REVISTA VEREDAS AMAZÔNICAS. 1(1).2011

FURTADO, C. Formação Econômica do Brasil. COMPANHIA EDITORA NACIONAL. 32 ed. São Paulo. 2005. 256 páginas.

GOMES, A; HERMAN, J; REIS, J.J; KODAMA, K; GRINBERG, K; GUIMARÃES, L.M; MOLTT, M.L;VANÂNCIO, R; RAMINELLI, R.J; VAINFAS, R; GREGORY, V. **Brasil 500 anos de povoamento.** Rio de Janeiro. IBGE. 2007

GIOLO SR, SOLER JM, GREENWAY SC, et al. **Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture.** Eur J Hum Genet.;20(1):111-6. 2011.

JONAS, D.E; MCLEOD, H.L. **Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing.** TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES. 30(7). 2009

HEINZ, T; ALVAREZ-IGLESIAS, V; PARDO-SECO, J; TABOADA-ECHALAR, P; GOMEZ-CARBALLA, A. et al., **Ancestry analysis reveals a predominant Native American component with moderate European admixture in Bolivians.** FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL: GENETICS. 2013

KASSAB, A. **A nova geoeconomia do emprego.** JOURNAL DA UNICAMP. Ed.349. 2007

KEHDY, F; GOUVEIA, M; MACHADO, M; MAGALHÃES, W; HORIMOTO, A., et al. **Origin and dynamics os admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations.** PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 112(28).8696-8701. 2015

KITTLES, R; CHEN, W; AHAGHOTU, R; ADEBAMOWO, A; GRIFFIN, R; UKOLI, T., et al. **CYP3A4-V and prostate cancer in African Americans: causal or confounding association because of population stratification?.** HUMAN GENETICS.110.2002

KOSAKI, C; YAMAGHISHI, R; SATO, H; SEMEJIMA, H; FUIJITA, K., et al. **1173C>T Polymorphism in VKORC1 Modulates the Required Warfarin Dose.** PEDISTRIC CARDIOLOGY. 27(6). 2006

LEITE, T; FONSECA, R; FRANÇA, N; PARRA, E; PEREIRA, R. **Genomic Ancestry, Self-Reported “Color” and Quantitative Measures of Skin Pigmentation in Brazilian Admixed Siblings.** PLOS ONE. 6. 2011

LIMA-COSTA MF, MACINKO J, MAMBRINI JV, et al. **Genomic African and Native American Ancestry and Chagas Disease: The Bambui (Brazil) Epigen Cohort Study of Aging.** PLoS Negl Trop Dis.;10(5):e0004724. 2016

LIMA-COSTA, M.F; RODRIGUES, L; BARRETO, M; GOVEIA, M; HORTA, B., et al. **Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative).** SCIENTIFIC REPORTS. 5 : 9812. 2015

LINS, T; VIEIRA, R; ABREU, B; GENTIL, P; MORENO-LIMA, R., et al. **Genetic Heterogeneity of Self-Reported Ancestry Groups in an Admixed Brazilian Population.** JOURNAL EPIDEMIOLOG. 21(4). 2011

LITTLE, 2002. **Etnodesenvolvimento local: autonomia cultural na era do neoliberalismo global.** Tellus, ano 2, n.3, p.33-52, 2002

LOPEZ, A; MOTA, C.G. **História do Brasil: Uma Interpretação.** SENAC. São Paulo. 2008 1056 páginas

LOVEJOY, P.E. **A escravidão na África: uma história de suas transformações.** RECORD. 2002. 497 páginas.

MANTA, F; PEREIRA, R; CAIAFA, A; SILVA, D.A; GUSMÃO, L; CARVALHO, E. **Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers.** ANNALS OF HUMAN BIOLOGY. 40(1). 2012

MANTA, F; PEREIRA, R; VIANNA, R; BEUTTENMÜLLER DE ARAÚJO A. R; GITAÍ, D; et al. **Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels.** PLoS ONE 8(9): e75145. 2013

MARINGONI, G. **História- O destino dos negros após a abolição. IPEA desafios do desenvolvimento.** São Paulo. 29/12/2011. Disponível em : http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&id=2673%3Acatid%3D28&Itemid=23 Acesso em: 02/12/2018

MARQUES, C; BRITO-DE-SOUZA, V; GUERREIRO, L.T; MARTINS, J., ET AL. **Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection.** THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. 208(1) 120-129. 2013

MCKEIGUE, P.M; CARPENTER, J.R; PARRA, E.J; SHRIVER, M.D. **Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations.**

MERSHA, T; ABEBE, T. **Self-reported race/ ethnicity in the age of genomic research: its potential impact on understanding health disparities.** HUMAN GENOMICS. 9(1).2015

MINISTERIO DA SAÚDE. Manual de prevenção de incapacidades. In: **MANUAL DE PREVENÇÃO DE INCAPACIDADES.** [s.l: s.n.]. p. 12–25.2001

MORAES, M; CARDOSO, C; VANDERBORGHT, P; PACHECO, A. **Genetics of host response in leprosy.**77(3). 189-202. 2006

MOREIRA, D.; ALVAREZ, R. R. A. **Evaluation of the palmar prehension strength using Jamar® dynamometer in Hansen's Disease patients attended in ambulatorial level in Federal District.** HANSENOLOGIA INTERNATIONALIS, v. 27(2), p. 61–69, 2002.

NASTRI, A.C; MALTA, F; DINIZ, M.A; YOSHINO, A, ABE-SANDES, K., et al. **Association of IFNL3 and IFNL4 polymorphisms with hepatitis C virus infection in a population from southeastern Brazil.** SPRINGER. 2016

OLIVEIRA, J. P.; FREIRE, C. A. R. **A Presença Indígena na Formação do Brasil.** Brasília: Ministério da Educação, Secretaria de Educação Continuada, Alfabetização e Diversidade. LACED/Museu Nacional, 2006.

ORGANIZATION WORLD HEALTH. **Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy.** WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, Vol 93, No. 35, 445-456.2018

PENA, S; CARVALHO-SILVA, D; ALVES-SILVA, J; PRADO, V. **Retrato Molecular do Brasil.** CIÊNCIA HOJE. 27(159). 2000

PENA, S; PIETRO, G; MORAES, M; GENRO, J., ET AL. **The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected.** PLOS ONE 6(2): e17063. 2011

PEREIRA, R; PHILIPS, C; PINTO, N; SANTOS, C., et al. **Straightforward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion Multiplexing.** PLOS ONE 7(1): e29684. 2012

PINTO, P; SALGADO, C; SANTOS, N.P.C; SANTOS, S; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. **Influence of Genetic Ancestry on INDEL Markers of NFKβ1,CASP8,**

PAR1,IL4 and CYP19A1 Genes in Leprosy Patients. PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES 9(9):e0004050. 2015

PREVEDELLO, F.C; MIRA, M,T. **Hanseníase: uma doença genética?** AN BRAS DERMATOL. 82(5):451-9. 2007

PRICE AL, BUTLER J, PATTERSON N et al: **Discerning the ancestry of European Americans in genetic association studies.** PLoS Genet 4: e236. 2008.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P. **Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.** Genetics 155: 945 959. 2000

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: A formação e o sentido do Brasil.** São Paulo. Segunda edição. 1995

RIZZO, S.R; GAZITO, D; POTT-JUNIOR, H; LATINI, F; C, A. **Prevalence of IFNL3 gene polymorphism among blood donors and its relation to genomic profile of ancestry in Brazil.** THE BRAZILIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. 20(6). 2016

ROMANINI, C; ROMERO, M; PUERTO, M; CATELLI, L; PHILLIPS, C; PEREIRA, R., et al. **Ancestry informative markers: Inference of ancestry in aged bone samples using an autosomal AIM-Indel multiplex.** FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL: GENETICS. 2015

RUIZ-LINARES, A; ADHIKARI, K; ACUNA-ALONZO, V; QUINTO- SANCHEZ, M; JARAMILLO, C., et al. **Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals.** PLOS ONE GENETICS. 10(9).2014

SALES-MARQUES, C; CARDOSO, C; ALVARADO-ARNEZ, E.L; LILARAMENDI, X., et al. **Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy.** PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES. 11(7).e0005754. 2017

SALES-MARQUES,C; SALOMÃO, H; FAVA, V., ET AL. **NOD2 and CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians.** HUM GENET. 133:1525–1532.2014

SANTOS, N; RODRIGUES, E; SANTOS, A., ET AL. **Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48–Insertion-Deletion (INSEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) Panel.** HUMAN MUTATION, No. 2, 184–190, 2009

SANTOS, H; HORIMOTO, A; TARAZONA-SANTO, E; RODRIGUES-SOARES, F; BARRETO, M., et al. **A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set.** EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS. 2015

SCHORK, N; FALLIN, D; THIEL, B; XU, X; JACOB, U; COHEN, D. **The future of genetic case-control studies.** ADVANCES IN GENETICS. 42. 2001

STRACHAN, T. E READ, A. P. Genética Molecular Humana. Artmed. 3ª edição. São Paulo, 2013

SKIDMORE, T. **Uma história do Brasil** . PAZ E TERRA. 4 ed. Rio de Janeiro. 2003

SUAREZ-KURTZ, G; PENA, S.D; STRUCHINER, C.J; HUTZ, M.H. **Pharmacogenomic diversity among Brazilians: influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin.** FRONTIERS IN PHARMACOLOGY.00191. 2012

VIEIRA, P; BURBANO, R; FERNANDES, D.C; MONTENEGRO, R; SANTOS, S.E., et al. **Population Stratification Effect on Cancer Susceptibility in an Admixed Population from Brazilian Amazon.** ANTICANCER RESEARCH.35.2015

<http://portalsinan.saude.gov.br/> Acessado em 05/11/2018

<https://epigen.grude.ufmg.br> Acessado em 28/11/2018

<https://indigenas.ibge.gov.br> . Acessado em 13/11/2018