



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Lívia Leite Ferreira

**Estudo de polimorfismos da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial
em pacientes com diabetes tipo 1: relação com a cor autodeclarada em pais
e avós**

Rio de Janeiro

2023

Lívia Leite Ferreira

Estudo de polimorfismos da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial em pacientes com diabetes tipo 1: relação com a cor autodeclarada em pais e avós

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marília Brito Gomes

Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida Silva

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F383 Ferreira, Livia Leite.

Estudo de polimorfismos da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial em pacientes com diabetes tipo 1: relação com a cor autodeclarada em pais e avós / Livia Leite Ferreira – 2023.

97 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marília Brito Gomes

Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. DNA mitocondrial – Genética – Teses. 2. Diabetes mellitus tipo I – Genética – Teses. 3. Genética Populacional. 4. Miscigenação – Brasil – Teses. I. Gomes, Marília Brito. II. Silva, Dayse Aparecida. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 575.17: 616.379-008.64(81)

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Lívia Leite Ferreira

Estudo de polimorfismos da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial em pacientes com diabetes tipo 1: relação com a cor autodeclarada em pais e avós

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de maio de 2023

Orientadora: Prof.^a Dra. Marília Brito Gomes

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Dayse Aparecida Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por sempre acreditarem nos meus sonhos e serem meu suporte durante este curso. Em especial à minha mãe Aneíse e meu pai Ailton, que sempre me incentivaram e me apoiaram.

Aos meus amigos que fiz ao longo da Universidade e aos de infância. Sem a ajuda e aconchego de vocês, tudo teria sido mais difícil. Obrigada por cada palavra de conforto durante as dificuldades e vibrações em conjunto em momentos de conquista. Cândida, Hugo, Danielle, Priscila, Rafaela, Vinicius, Alana, Luiza e Carina, amo vocês.

Ao meu namorado Leonardo, que nestes últimos meses têm sido suporte e compreensão. Obrigada por torcer a cada conquista pelo meu sucesso e aturar minhas lamúrias. Obrigada por ser presente e me levar aos jogos do Vasco quando preciso de distração; por ser calma quando preciso. Te amo.

Aos meus colegas de bancada do LDD, em especial à Silvia e Masinda, que nestes últimos meses foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todo tempo dispendido a me ajudarem com cada dúvida na determinação de haplótipos e sobre genética populacional.

À Dr^a Rossana Azulay e ao grupo BrazDiab1 por ceder amostras à este projeto.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Marília de Brito Gomes e minha co-orientadora Prof^a Dr^a Dayse Aparecida da Silva, por confiarem no meu potencial e por terem me permitido vivenciar estes dois anos de trabalho e muito ensinamento.

E agradeço à UERJ por sua excelência e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa de estudos. Além da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo financiamento à minha pesquisa.

RESUMO

FERREIRA, Livia Leite. **Estudo de polimorfismos da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial em pacientes com diabetes tipo 1: relação com a cor autodeclarada em pais e avós.** 2023. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A população brasileira é fruto da miscigenação entre três principais grupos étnicos diversos: ameríndios, europeus e africanos. Ao longo dos séculos de colonização, estas populações se misturaram de forma heterogênea, gerando o pool genético dos brasileiros. Cada região demográfica brasileira irá apresentar uma particularidade em sua população, decorrente dos diferentes padrões de miscigenação e migrações. A diabetes mellitus tipo I (DM1) é a endocrinopatia mais comum na infância e adolescência, apresentando uma incidência maior em indivíduos que se autodeclaram brancos. O sistema de autodeclaração em populações miscigenadas, como a brasileira, é falho. Uma vez que características fenotípicas como cor da pele não expressam de forma fidedigna a ancestralidade genotípica do indivíduo. Com 16569 pares de base, o DNA mitocondrial humano possui uma alta variabilidade genética. A inferência de dados do mtDNA nos permite caracterizar a ancestralidade de origem matrilinear dos indivíduos, sendo um importante marcador genético para estudos populacionais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a ancestralidade matrilinear de indivíduos com DM1 do Brasil com dados gerais da população brasileira acerca sua cor autodeclarada e região de nascimento. Para isso, o sequenciamento da região controle do mtDNA foi realizado para 204 pacientes diabéticos das regiões Norte (7); Nordeste (103); Sudeste (81) e Sul (13). Os resultados mostraram uma diversidade molecular alta, com a presença de 190 haplótipos únicos dentro do universo de 204 possíveis. Os haplogrupos de origem ameríndia foram os mais comuns, sendo o clado C o mais comum (38%). Os dados estratificados por região mostram que na Região Nordeste 38,8% apresentaram ancestralidade matrilinear de origem africana, 15,5% de origem europeia e 46,6% de origem ameríndia. Na região Sudeste a origem africana foi de 43,2%, 17,2% de origem europeia e 39,5% de origem ameríndia. Os pacientes da Região Norte apresentaram uma origem matrilinear representada por 28,5% africana e 71,4% de origem nativa americana. E os indivíduos da Região Sul apresentaram sua origem materna de 7% africana; 61,5% europeia e 30,7% nativa americana. Já referente aos dados de autodeclaração, na população estudada, 42,6% se autodeclaravam de cor/raça branca, 5,4% preta, 50,9% parda e 0,9 amarela. Esses dados se assemelham com os dados de autodeclaração da população brasileira (47,7% branca, 7,6% preta, 43,1% parda, 1,1% amarela e 0,4 indígena). Quando comparado os dados deste trabalho com outras populações de diferentes regiões brasileiras, encontramos uma similaridade entre elas. O que reforça o padrão de colonização dentro destas regiões. Dessa forma, esse trabalho traz a luz informações inéditas sobre a ancestralidade matrilinear de indivíduos diabéticos do Brasil. Esses dados que poderão ser úteis para atualização de banco de dados populacionais no Brasil, reforçando dados históricos de migração humana, além de suas aplicações clínicas.

Palavras-chave: DNA mitocondrial. Ancestralidade matrilinear. Diabetes Mellitus tipo I. Cor autodeclarada. Regiões demográficas.

ABSTRACT

FERREIRA, Livia Leite. *Study of mitochondrial DNA control region (D-loop) polymorphisms in patients with type 1 diabetes: relationship between self-reported color in parents and grandparents* 2023. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Brazilian population results from the of miscegenation between three different ethnic groups: Amerindians, Africans and Europeans. Over the centuries of colonization, these populations mixed asymmetrically, generating the genetic pool of Brazilians. Each Brazilian demographic region will present a particularity in its population, due to the different patterns of miscegenation. Type I diabetes mellitus (DM1) is the most common endocrine pathology in childhood and adolescence, with a higher incidence in individuals who declare themselves white. The self-declaration system in mixed populations, such as Brazil, is flawed. Since phenotypic characteristics such as skin color do not reliably express the genotypic ancestry of the individual. The mitochondrial genome in humans contains 16,569 base pairs has a high genetic variability. Thus, the inference of mtDNA data allows us to characterize the matrilineal ancestry of individuals, being an important genetic marker for population studies. Therefore, the objective of this study was to compare the matrilineal ancestry of individuals with DM1 in Brazil with general data from the Brazilian population regarding their self-declared color and region of birth. For this, the sequencing of the mtDNA control region was performed for 204 diabetic patients from the North regions (7); Northeast (103); Southeast (81) and South (13). The results showed a high molecular diversity, with the presence of 190 unique haplotypes within the universe of 204 possible. Haplogroups of Amerindian origin were the most common, with clade C being the most common (38%). Data stratified by region show that in the Northeast Region, 38.8% had matrilineal ancestry of African origin, 15.5% of European origin and 46.6% of Amerindian origin. In the Southeast region, 43.2% were of African origin, 17.2% of European origin and 39.5% of Amerindian origin. Patients from the North Region had a matrilineal origin represented by 28.5% African and 71.4% Native American origin. And the individuals from the South Region presented their maternal origin of 7% African; 61.5% European and 30.7% Native American. Regarding the self-declaration data, in the studied population, 42.6% declared themselves white, 5.4% black, 50.9% brown and 0.9 yellow. These data are similar to the self-declaration data of the Brazilian population (47.7% white, 7.6% black, 43.1% brown, 1.1% yellow and 0.4 Amerindian). When comparing the data from this work with other populations from different Brazilian regions, we found a similarity between them. This reinforces the pattern of colonization within these regions. Thus, this work brings to light unpublished information about the matrilineal ancestry of diabetic individuals in Brazil. These data may be useful for updating population databases in Brazil, reinforcing historical data on human migration, in addition to their clinical applications.

Keywords: Mitochondrial DNA. Matrilineal ancestry. Diabetes Mellitus type I. Self-declared color. Demographic regions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição das tribos indígenas na Costa brasileira em 1500	18
Figura 2 –	Origem dos Escravos Brasileiros	22
Figura 3 –	Mapa do mtDNA humano	28
Figura 4 –	Regiões hipervariáveis do mtDNA humano	30
Figura 5 –	Mapa da migração do mtDNA	32
Figura 6 –	Árvore de classificação dos haplogrupos de mtDNA, suas origens e mutações (números ao longo dos links). Cada haplogrupo se encaixa dentro dos continentes África, Europa, Ásia ou Nativo. Cada quadrado representa o nó do respectivo haplogrupo. CRS indica a sequência de referência revisada, e “mtEve” sendo a raiz da árvore	34
Figura 7 –	Posição de anelamento dos <i>primers</i> utilizados na PCR: L15900 e H639 na região controle	41
Figura 8 –	Posição de anelamento dos primers internos utilizados no sequenciamento da região controle	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Raça ou cor autodeclarada da população brasileira nos anos de 2012, 2020 e 2021	24
Gráfico 2 –	Raça ou cor autodeclarada das cinco regiões geográficas do Brasil, nos anos de 2012 e 2021	25
Gráfico 3 –	Distribuição dos haplogrupos nas amostras de pacientes com DM1 no Brasil	46
Gráfico 4 –	Representação gráfica das diferenças par a par observadas nas sequências das regiões hipervariáveis do mtDNA na população de DM1 no Brasil	50
Gráfico 5 –	Distribuição da origem geográfica matrilinear por grupos de cor autodeclarada em pacientes com DM1	51
Gráfico 6 –	Distribuição da origem geográfica matrilinear por grupos de heteroidentificação em mães dos pacientes com DM1	52
Gráfico 7 –	Distribuição da origem ancestral matrilinear por grupos de heteroidentificação em avós maternas dos pacientes com DM1	53
Gráfico 8 –	Cor ou raça autodeclarada na população brasileira e população diabética brasileira, estratificada por regiões demográficas (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste), segundo último dado publicado pelo PNAD Contínuo (referente ao 4 trimestre de 2022)	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Relação de primers internos utilizados na etapa de sequenciamento para amostras que possuem heteroplasmias ou transições	42
Quadro 2 –	Quantitativo e frequência dos macrohaplogrupos de mtDNA de linhagem ameríndia (A, B, C e D) e seus respectivos subhaplogrupos considerando o total de pacientes com DM1 no Brasil	47
Quadro 3 –	Quantitativo e frequência dos macrohaplogrupos de mtDNA de linhagem africanas (L0, L1, L2 e L3) e seus respectivos subhaplogrupos considerando o total de pacientes com DM1 no Brasil..	48
Quadro 4 –	Quantitativo e frequência dos macrohaplogrupos de mtDNA de linhagem europeias (H, HV, J, R, T, U e W) e seus respectivos subhaplogrupos, considerando o total de pacientes com DM1 no Brasil.	49
Quadro 5 –	Estudos das quatro regiões brasileiras utilizados para comparação de distância genética e frequência haplotípica	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tabela das proporções genômicas dos ancestrais africanos, europeus e ameríndios em quatro diferentes regiões do Brasil, independente da categoria de cor	16
Tabela 2 –	População geral brasileira em 1872, segundo censo realizado pela Diretoria-Geral de Estatística (DGE). Dados ajustados pelo MRP	23
Tabela 3 –	Protocolo para a reação da PCR	40
Tabela 4 –	Protocolo para a reação de sequenciamento do <i>primer</i> H639	42
Tabela 5 –	Protocolo para a reação de sequenciamento dos <i>primer</i> L15900; L16555; L16268; L314 e H159; H016; H599 e H484	43
Tabela 6 –	Parâmetros de diversidade molecular, obtidos para as amostras de pacientes com DM1 no Brasil, e seus agrupamentos por região	45
Tabela 7 –	Matriz de distância genética FST e valor de p do Teste Exato de Fisher. A correção de Bonferroni foi aplicada para se ajustar o nível de significância do teste, dividindo o $p < 0,05$ por 6 (6 observações), obtendo um 0,0083	54
Tabela 8 –	Frequência entre etnias autodeclaradas e origem geográfica (Africano, Ameríndio e Europeu) para a população de São Paulo	56
Tabela 9 –	Matriz de distância genética FST e valor de p do Teste Exato de Fisher. A correção de Bonferroni foi aplicada para se ajustar o nível de significância do teste, dividindo o $p < 0,05$ por 20 (20 observações), obtendo um 0,0025... ..	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFR	Africano
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Citosina
CRS	Sequência de Referência de Cambridge
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeos trifosfato
DGE	Diretoria-Geral de Estatística
D-Loop	<i>Displacement Loop</i>
EMPOP	EDNAP <i>mtDNA Population Database</i>
EUR	Europeu
H	Estande pesado
HV1	Região Hipervariável 1 (<i>Hypervariable region 1</i>)
HV2	Região Hipervariável 2 (<i>Hypervariable region 2</i>)
HV3	Região Hipervariável 3 (<i>Hypervariable region 3</i>)
HVR	Regiões Hipervariáveis (<i>Hypervariable regions</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L	Estande leve
mtDNA	DNA mitocondrial
mtEve	mtDNA de Eva
NAM	Nativo Americano
nDNA	DNA nuclear
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio
rCRS	Sequência de Referência de Cambridge Revisada
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
rRNA	RNA ribossomal
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)

STR	Repetição Curta em Tandem (do inglês, <i>Short Tandem Repeat</i>)
tRNA	RNA transportador
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO TEÓRICA	15
1.1	Processo de colonização do Brasil	15
1.1.1	<u>Povos Nativos Ameríndios</u>	16
1.1.2	<u>Povos Europeus</u>	19
1.1.3	<u>Povos Africanos</u>	19
1.2	Ancestralidade brasileira autorreferida e dados do IBGE	22
1.3	Ancestralidade e marcadores moleculares na população	26
1.3.1	<u>DNA Mitocondrial</u>	27
1.3.1.1	Haplogrupos mitocondriais	31
1.4	Diabetes	35
1.4.1	<u>Epidemiologia e patogenia do diabetes</u>	35
1.4.2	<u>DNA mitocondrial em diabéticos</u>	36
1.4.3	<u>Ancestralidade da diabetes</u>	36
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo Geral	38
2.2	Objetivos Específicos	38
3	METODOLOGIA	39
3.1	Desenho de estudo	39
3.2	Coleta de dados	40
3.3	Metodologia e análise de dados	40
3.3.1	<u>Extração, amplificação e purificação do mtDNA</u>	40
3.3.2	<u>Reação de sequenciamento e análise de seqüências</u>	41
3.3.3	<u>Análise de dados</u>	43
4	RESULTADOS	45
4.1	Caracterização dos haplótipos de mtDNA de pacientes com DM1	45
4.2	Caracterização dos haplogrupos de mtDNA de pacientes com DM1	46
4.3	Dados de cor autodeclarada e haplogrupos	50
4.3.1	<u>Dados de cor autodeclarada e haplogrupos em pacientes com DM1</u>	50

4.3.2	<u>Cor autodeclarada nas mães e avós maternas dos pacientes com DM1 e haplogrupos</u>	52
4.4	Dados de local de nascimento de haplótipos	54
4.5	Comparação dos pacientes com DM1 com dados publicados da população brasileira	55
5	DISCUSSÃO	60
5.1	Caracterização da diversidade haplotípica na população DM1 e brasileira .	60
5.2	Caracterização dos haplogrupos na população DM1 e brasileira por regiões demográficas	62
5.2.1	<u>Região Sudeste</u>	62
5.2.2	<u>Região Sul</u>	64
5.2.3	<u>Região Nordeste</u>	65
5.2.4	<u>Região Norte</u>	67
5.3	Cor autodeclarada na população brasileira e pacientes com DM1	67
	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A – Distribuição por autodeclaração da população brasileira referentes aos dados do IBGE, e dados de pacientes com DM1 do presente estudo e Gomes <i>et al.</i> 2018	76
	APÊNDICE B – Frequência de ancestralidade matrilinear por Estado ou região demográfica no Brasil para população saudável e população com DM1	77
	APÊNDICE C – Trabalho apresentado no XXXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica, realizado em São Paulo, agosto de 2023	78
	APÊNDICE D – Artigo publicado	79
	ANEXO A – TCLE	89
	ANEXO B – Questionário	93

INTRODUÇÃO

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, processo resultante de cinco séculos de cruzamentos entre indivíduos interétnicos de três continentes: colono europeus, escravos africanos, e ameríndios nativos. Consequentemente, as características genótípicas e fenotípicas de europeus e africanos foram adicionadas aos habitantes nativos, fazendo com que características de aparência física (cor da pele e dos olhos, cabelo, formato dos lábios e nariz), sejam indicadores inadequados da origem geográfica de seus ancestrais. Ou seja, em populações altamente miscigenadas, como no Brasil, utilizar apenas informações de autodeclaração étnica para classificar os indivíduos quanto a sua etnia não é um bom método (CARDENA, 2013).

1 REVISÃO TEÓRICA

1.1 Processo de colonização do Brasil

O Brasil é um país de dimensões continentais, com população formada pela extensa mistura durante períodos de tempos distintos de três principais povos com raízes ancestrais distintas: africanos, ameríndios e europeus. O território brasileiro era ocupado pelos povos nativos, e a partir de 1500 com a chegada dos europeus pela costa, e mais tarde com o tráfico negreiro, têm-se o início pela costa o processo de colonização brasileiro. Posteriormente a colonização foi difundida para o interior do país, e, a partir disso, houve distintos padrões de miscigenação, que explicam a variabilidade genética no povo brasileiro (PENA ., 2011; HARARI, 2015 e SCHAAN ., 2017).

A história colonial do Brasil pode ser dividida em três períodos distintos: de 1500-1549, que compreende a chegada de Pedro Álvares Cabral à instauração do governo geral português, com o reconhecimento e posse da nova terra e um escasso comércio; de 1549 até as últimas décadas do século XVIII, com a montagem da colonização que se consolidou durante mais de dois séculos; e o terceiro período, do final do século XVIII até à Independência, em 1822 marcados pela transformação na ordem mundial, a crise do sistema colonial e movimentos pela independência (FAUSTO, 2012).

Nesse período, estima-se que chegaram ao Brasil cerca de 500 mil europeus, em grande parte homens. Em razão do tráfico negreiro, estima-se que cerca de 9 milhões de africanos vieram forçados para as Américas entre 1452 e 1870, sendo que, em 1530 os primeiros africanos chegaram ao Brasil, onde atualmente é o Estado da Bahia. Porém, este número não é fácil de ser determinado, por fatores como a mortalidade durante a viagem, tráfico ilegal e falta de registro (SALZANO; SANS, 2014).

Dessa forma, o processo de colonização foi distinto em cada uma das cinco regiões, devido à extensão do território brasileiro. De acordo com Pena e cols. (2011), cada território apresentava um histórico populacional diverso, resultado de diferentes fluxos migratórios, como mostra a Tabela 1. Na população do Norte, evidenciou-se uma grande influência genética das raízes ameríndias, em contraposição ao Nordeste que tem sua história a forte influência do povo africano devido à escravidão, e o Sul que foi majoritariamente colonizado por imigrantes europeus. A região Sudeste também há predomínio da população branca, enquanto a região Centro-Oeste era uma população uniforme entre pardos e brancos (LINS ., 2010; PENA , 2011).

Tabela 1 – Tabela das proporções genômicas dos ancestrais africanos, europeus e ameríndios em quatro diferentes regiões do Brasil, independente da categoria de cor

	Europeu	Africano	Ameríndio
Norte	0,688	0,105	0,185
Nordeste	0,601	0,293	0,089
Sudeste	0,742	0,173	0,073
Sul	0,795	0,103	0,094

Fonte: Adaptado de Pena, 2011

Dessa forma, o contingente populacional brasileiro durante a colonização pode ser dividido em três períodos: o inicial com maior componente sendo formado por ameríndios; que contribuíram fortemente para a formação inicial dos brasileiros. A segunda fase da miscigenação, que durou até meados de 1850, formada pela diminuição do número de nativos por efeito da perseguição armada e doenças, juntamente com o influxo de africanos do tráfico negreiro. E o terceiro período, que ocorre a partir da segunda metade do século XIX, com o fim do tráfico negreiro e a entrada dos imigrantes europeus num processo de embranquecimento do Brasil (PENA *et al.*, 2020).

1.1.1 Povos Nativos Ameríndios

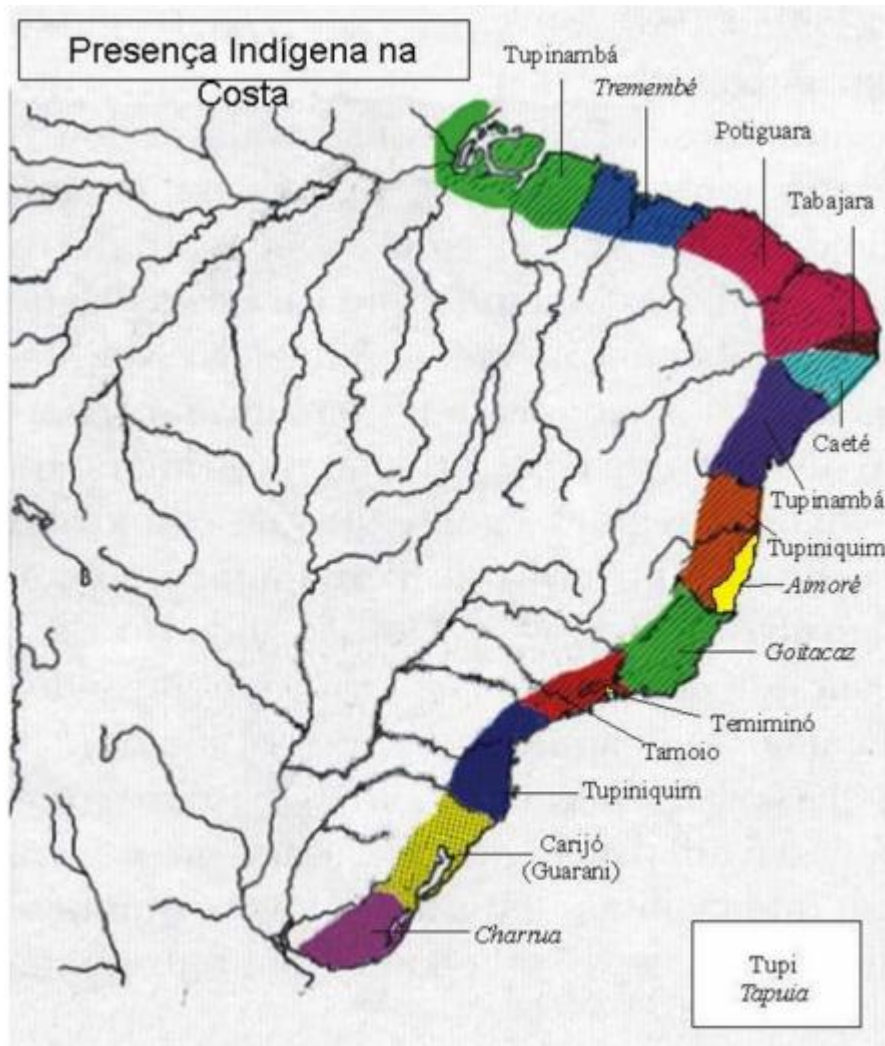
Os ameríndios foram os primeiros a colonizarem o território, e supõe-se que esses indivíduos migraram para as Américas vindos do leste da Ásia entre 11.000 e 25.000 anos. Eles teriam vindo via terrestre, através de um “subcontinente” chamado Beríngia, localizado no estreito de Bhering, no extremo Norte da Ásia. As poucas informações que temos sobre a numerosa população que habitava o Brasil antes da chegada dos colonos são obtidas por meio dos escassos e limitados relatórios produzidos por expedições europeias do início do século XIX (IBGE, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2010 e SCHAAN *et al.*, 2017).

Em 1500, quando os colonizadores desembarcaram em terras brasileiras, encontraram uma população ameríndia que estava organizada em grupos que ocupavam diferentes ambientes dentro do território, com uma vasta diversidade biológica e cultural entre elas, distribuídos ao longo da costa e na bacia dos rios Paraná-Paraguai. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), calcula-se que viviam cerca de 2 milhões de ameríndios, muito deles na parte oriental do país, falantes de mais de 150 idiomas. Passados mais de 520 anos da colonização, resultados preliminares do Censo Demográfico de 2022 (IBGE), mostram que hoje no Brasil mais de 1,6 milhões de indivíduos se reconhecem como indígenas. Esse número é 84% maior do que o contabilizado no levantamento de 2010, quando se somava 896,9 mil

peessoas. A maioria dos indígenas vivem nos estados do Norte e Centro-Oeste. O maior contingente indígena vive atualmente na Amazônia, Mato Grosso, seguidos pelo Pará, Maranhão e Pernambuco (VAINFAS, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2010; FAUSTO, 2012; HARARI, 2015; SCHAAN *et al.*, 2017; IBGE, 2022 e Agência Senado, 2023).

Segundo Fausto (2012), foi possível dividir a população que vivia no Brasil na época da colonização em dois grandes blocos, que se subdividem, em tupis-guaranis e tapuias. Os tupis-guaranis ocupavam quase toda a costa brasileira, desde o Ceará até o extremo Sul. Os tupis (tupinambás) ocupavam a faixa litorânea do Norte até o Sul do estado de São Paulo, enquanto os guaranis viviam na bacia do Paraná-Paraguai, e trechos do litoral entre Cananéia e o extremo Sul. Como podemos observar na Figura 1, em alguns pontos do litoral, havia a presença de outros grupos, como os goitacases na foz do Rio Paraíba; os aimorés no Sul da Bahia e Norte do Espírito Santo; e os tremembés na faixa entre o Ceará e o Maranhão. Esses grupos receberam a denominação de tapuias, que para os tupis-guaranis significa “índios que falam outra língua”. (FAUSTO, 2012; ALMEIDA, 2017).

Figura 1 – Distribuição das tribos indígenas na Costa brasileira em 1500, de acordo com seu agrupamento linguístico.



Fonte: Fábio Bonfim Duarte, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.58967/caletroscopio.v4.nesp.2016.3665>

Em 1808 a Coroa Portuguesa declarou “Guerra Justa” contra todas as tribos indígenas que não aceitavam as leis europeias. Uma dessas tribos perseguidas foram dos índios Aimorés, que habitavam as áreas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia. Além disso, os nativos sofreram também com doenças para as quais não possuíam imunidade natural e assassinatos, o que explica a dizimação desses povos e consequente perda da diversidade genética (FAUSTO, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2012; e SCHAAN *et al.*, 2017).

1.1.2 Povos Europeus

Com a organização em Reinos, nos princípios do século XV Portugal inicia a sua expansão marítima, que desencadeia no marco da colonização brasileira em 1500. Com a organização de ocupação e exploração da nova terra estabelecida a partir de 1530 por meio das capitânicas hereditárias, inicia-se um maior fluxo migratório dos portugueses. Segundo Pena *et al.*, (2020) a miscigenação luso-ameríndia começou logo após a chegada dos primeiros colonizadores, tornando-se corriqueira e até mesmo incentivada como estratégia de crescimento populacional e ocupação do território. (IBGE, 2000; FAUSTO, 2012 e PENA *et al.*, 2020).

Em meio à competição europeia por produtos, mão de obra e mercado e posterior descoberta do ouro em Minas Gerais, temos a invasão das terras brasileiras por outros povos europeus, como franceses, espanhóis, e holandeses, e mais tarde a vinda dos italianos. Esses povos chegaram a dominar algumas porções do território brasileiro, principalmente o Nordeste, durante os séculos XVI e XVII. Os franceses invadiram com sucesso os estados do Maranhão, Paraíba, Rio de Janeiro e Pernambuco, porém, acabaram sendo expulsos mais tardes pelos portugueses. Os ingleses limitaram-se a ocuparem um pequeno povoado no rio Oiapoque no Norte, porém abandonaram um ano depois. Anos depois, voltaram a ocupar o estado de Pernambuco. Já os holandeses invadiram e dominaram uma parte significativa do Nordeste durante o século XVII (PAIM, 2000; FAUSTO, 2012 e SCHAAN *et al.*, 2017).

Em relação à chegada de europeus, estima-se que cerca de meio milhão de portugueses chegaram ao país entre o descobrimento em 1500 e a transferência da corte Portuguesa para o Brasil em 1808. A partir de então, com a abertura dos portos brasileiros às nações amigas, em um período de aproximadamente 100 anos, o Brasil recebeu ao menos 5,5 milhões de outros imigrantes europeus e de outras partes do mundo. Segundo Pena *et al.*, os imigrantes eram 34% italianos, 29% portugueses, 14% espanhóis, 5% japoneses, 4% alemães, 2% libaneses e sírios e 12% outros (PENA *et al.*, 2020).

1.1.3 Povos Africanos

A partir de meados do século XVI, os africanos foram trazidos para o Brasil para servirem de mão de obra escrava nas fazendas de cana-de-açúcar no Nordeste, e posteriormente nas minas de ouro e plantações e café. Estima-se que mais de 700 mil africanos foram trazidos à força para o Brasil durante os séculos XVI e XVII e, no século XIX, aproximadamente mais

de 5 milhões de africanos haviam desembarcado em solo brasileiro (SCHAAN *et al.*, 2017 e PENA *et al.*, 2020).

A mão de obra utilizada no período do Brasil colônia era resultado da escravidão, inicialmente indígena, para mais tarde dar lugar ao escravo africano. Não há uma data certa para o início da entrada dos escravos africanos no Brasil, mas em 1516 os colonos, donos das capitanias hereditárias, que vinham ao Brasil, já traziam escravos como bens pessoais (RIBEIRO, 2013).

Em 1549, quando Tomé de Sousa assume o posto de primeiro governador-geral do Brasil na Bahia, há então a entrada de escravos africanos com maior frequência e regularidade no país. Dessa forma, em 1550, desembarca em Salvador um contingente de escravos de Guiné. Em 1559, sob a regência da Duquesa Catarina, a corte portuguesa passa a permitir que cada senhor de engenho possuísse até 120 escravos do Congo vindos da Ilha de São Tomé. Em 1587 a população na Bahia era estimada em 2 mil colonos europeus, 10 mil escravos, destes sendo 4 mil de Guiné e 6 mil indígenas (RIBEIRO, 2013).

A partir de meados do século XVII a mão de obra escrava passa a ser quase que exclusiva de africanos. Foram trazidos entre os séculos XVII e XIX negros de diversas etnias, algumas rivais entre si. Além da Guiné, a maior parte do tráfico negreiro que desembarcou no Brasil eram provenientes da região da África Centro-Ocidental (Chade, Camarões, República Centro Africana, Gabão, Congo, República Democrática do Congo e Rio Muni ou Guiné Equatorial; Mauritânia, Mali, Níger, Senegal, Gâmbia, Guiné-Bissau, Serra Leoa, Libéria, Burkina Fasso, Costa do Marfim, Gana, Togo, Benim, Nigéria, São Tomé e Príncipe). Angola e Moçambique fazem parte da África Meridional e Oriental, respectivamente, e participaram do tráfico de escravos. Os negros chegavam no mercado de escravos do Rio de Janeiro, Bahia, Recife e São Luís, sendo distribuídos para as mais variadas regiões do país (RIBEIRO, 2013 e SLAVE VOYAGE, 2019).

os negros eram capturados em qualquer região africana, mesmo no remoto interior, sem discriminação de procedência e embarcados em portos da costa, que reuniam assim escravos de várias tribos e várias regiões, às vezes completamente afastadas umas das outras. (RAMOS, 1951).

Não se sabe ao certo quantos negros africanos foram trazidos ao Brasil, uma vez que, os documentos relativos à escravidão foram destruídos por ordem do Ministro Rui Barbosa em 1890. Estima-se que, em 1600 tenham chegado em solo brasileiro por volta de 2 milhões de africanos, somando-se mais de 12 milhões dois séculos depois. Segundo Prado Junior (1976),

no século XVIII, os escravos representavam 1/3 da população total, somando 6 milhões de escravos. (PRADO JÚNIOR, 1976; REIS, 2000 e RIBEIRO, 2013).

Quando se observa a ancestralidade da população brasileira nos dias de hoje, é possível observar que o componente africano deriva do Oeste e Centro-Oeste da África e do sul de Moçambique, associados a população Yoruba/Mandeka do oeste da África não-Bantu; e outro associado a população Bantu do leste africano. (LINS, 2010; GOMES, 2019).

O termo “yorubá” é recente, referente a população do conglomerado linguístico e cultural da costa oeste do continente africano, sendo o reino de Daomé o mais importante. Estima-se que juntamente com o Yorubá, os negros de Mina (grupo Ashanti) formaram a maior parte dos escravos trazidos ao Brasil, sendo levados principalmente para a Bahia, onde receberam a denominação de nagô. A cultura desse povo se mantém viva até hoje, como herança a religiosidade no candomblé e umbanda. (RIBEIRO, 2013 e MELO, 2014).

Já o grupo *Bantu* refere-se à população do leste africano, responsável pela ancestralidade mais evidente no Sudeste e Sul do Brasil. Essa região é atualmente formada por Angola, Burundi, Djibouti, Eritreia, Etiópia, Madagascar, Malawi, Moçambique, Quênia, Ruanda, Somália, Sudão do Sul, Tanzânia, Uganda, Zâmbia e Zimbábue. No século XVII, a maioria dos escravos que desembarcaram nos portos do Rio de Janeiro e São Paulo eram de origem *Bantu*, particularmente de Moçambique (REIS, 2000; LINS, 2010 e RODRIGUES, 2010).

Segundo Gomes, o tráfico negreiro no Brasil pode ser dividido em quatro períodos, que se estende do século XVI a meados do século XIX. O primeiro é chamado de Ciclo de Guiné, e tem início algumas décadas após a chegada de Cabral à Bahia; tinha como portos de origem Senegal, Gâmbia, Guiné-Bissau, passando por Cabo verde. O segundo, intitulado como Ciclo do Congo e Angola, de onde veio a imensa maioria de africanos, persistiu até o fim do tráfico negreiro (1850). O terceiro foi o Ciclo da Costa da Mina (século XVIII), com destino a Bahia, e o quarto começa a partir do século XIX, sendo o Ciclo de Moçambique (Figura 2) (GOMES, 2019).

Figura 2 – Origem dos Escravos Brasileiros.



Fonte: Escravidão, volume 1: Do primeiro leilão de cativos em Portugal até a morte de Zumbi dos Palmares. Laurentino Gomes. 2019.

1.2 Ancestralidade brasileira autorreferida e dados do IBGE

Conforme exposto acima, é possível observar que a população brasileira é o resultado da mistura entre os nativos ameríndios, europeus e africanos. Imigrantes de outras origens, como Oriente Médio, China e Japão ingressaram no pool genético brasileiro mais tarde, a partir dos séculos XIX e XX. Sendo assim, o Brasil um país com uma diversidade genética importante, resultado de séculos de diferentes fluxos migratórios e miscigenação. (LINS, 2010; PENA *et al.*, 2020).

Em 1872 foi realizado o primeiro censo demográfico brasileiro, pela Diretoria-Geral de Estatística (DGE), como mostra a Tabela 2. Neste primeiro censo, a população brasileira era

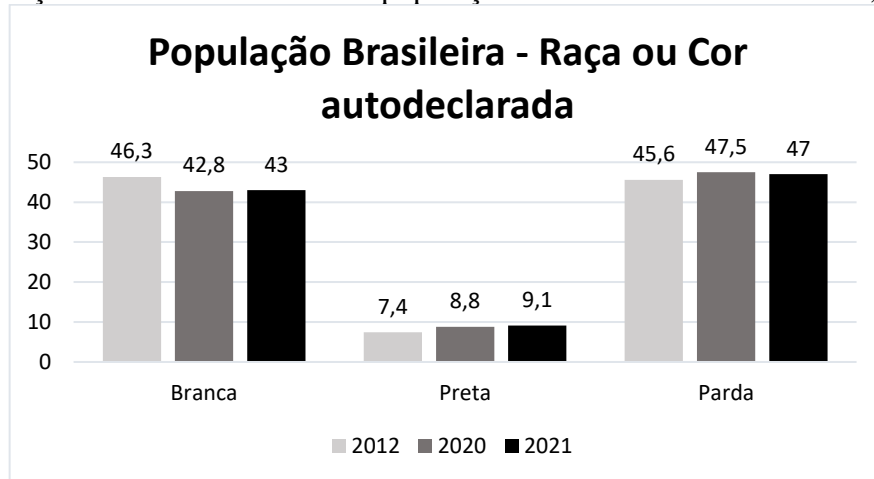
dividida entre indivíduos brancos, pardos, pretos e caboclos (mistura do índio com o branco), podendo estes serem livres ou escravos. É possível notar que em 1872 a população brasileira possuía um quantitativo maior de homens e indivíduos livres; em que 38,07% eram brancos, 38,28% eram pardos, 19,74% pretos e 3,89% caboclos (PAIVA *et al.*, 2012).

Tabela 2 – População geral brasileira em 1872, segundo censo realizado pela Diretoria-Geral de Estatística (DGE). Dados ajustados pelo MRP. Adaptado de Paiva *et al.*, 2012.

Raça	Sexo		Condição		Somatório	Porcentagem
	Homem	Mulher	Livres	Escravos		
Branco	1.967.118	1.813.992	3.781.110	-	3.781.110	38,07%
Pardo	1.926.687	1.875.005	3.331.654	470.038	3.801.692	38,28%
Preto	1.029.081	931.361	919.674	1.040.768	1.960.442	19,74%
Caboclo	200.983	186.251	387.234	-	387.234	3,89%
Total	4.318.699	4.100.973	8.419.652	1.510.806	9.930.478	100%

Atualmente, o IBGE é o responsável pela pesquisa da cor ou raça da população brasileira. Em seu sistema classificatório, são empregados simultaneamente os métodos da autodeclaração e da heteroatribuição de pertença, em que um parente ou pessoa próxima atribui o grupo ao sujeito. De acordo com os últimos dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua (PNAD) de 2021, 43% dos brasileiros de autodeclaravam da cor branca, 9,1% preta e 47% da cor parda (Gráfico 1) (OSORIO, 2003 e IBGE, 2021).

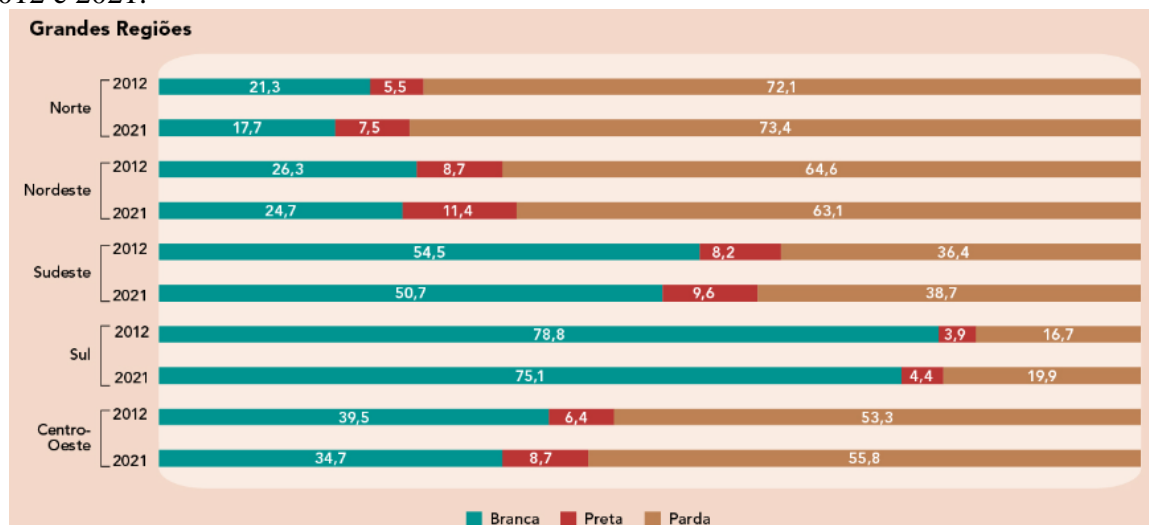
Gráfico 1 – Raça ou cor autodeclarada da população brasileira nos anos de 2012, 2020 e 2021.



Adaptado de IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Pesquisa por Amostra de Domicílios, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua 2012/2021.

Cada região tem sua particularidade específica, estando relacionadas aos diferentes perfis migratórios, que se correlacionam com a história de colonização brasileira como mostra o Gráfico 2. Padrões irregulares levaram a dinâmicas migratórias heterogêneas, afetando a formação das comunidades locais, impactando a atual composição étnica regional. A região Norte é a região com o maior número de indivíduos que se autodeclararam pardos (73,4), seguidos das regiões Nordeste (63,1), Centro-Oeste (55,8); Sudeste (38,7) e Sul com (19,9). Já em relação à autodeclaração para indivíduos brancos, a região Sul é a que apresenta o maior contingente (75,1) e a região Norte a com menor número (17,7) em 2021. (GONÇALVES *et al.*, 2010; IBGE, 2021; ÁVILA, 2022).

Gráfico 2 – Raça ou cor autodeclarada das cinco regiões geográficas do Brasil, nos anos de 2012 e 2021.



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Pesquisa por Amostra de Domicílios, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua 2012/2021.

Dessa forma, Pena e cols (2011), descreveram que o Brasil é “o lar de pessoas geneticamente heterogêneas, produto de cinco séculos de mistura entre ameríndios, europeus e africanos”. Rodrigues (2010) por sua vez em seu trabalho, aponta que a estatística atual mostra a genética do povo brasileiro é composta por brancos de origem europeia, índios guaranis e negros do grupo *Bantu*, além dos mestiços entre essas três raças, sendo os mestiços metade da população (RODRIGUES, 2010 e PENA *et al.*, 2011).

Contudo, a miscigenação ocorreu de forma sexualmente assimétrica, em decorrência do modelo colonial vigente no Brasil, empregado pelos portugueses. Segundo Pena e cols (2011), devido ao fato de poucas mulheres europeias terem vindo ao Brasil no período de 1500 a 1808, a população brasileira era formada por europeus, principalmente portugueses, do sexo masculino, indígenas e africanos escravizados (PENA *et al.*, 2011).

Os homens lusitanos misturaram-se amplamente com as mulheres ameríndias, sendo então a primeira geração de brasileiros composta por 50% de ancestrais ameríndios e europeus, porém com um DNA mitocondrial (mtDNA) 100% ameríndio. Contudo, mesmo com as posteriores misturas com os europeus, que levaram a “europeização” dos ancestrais genômicos, a proporção de mtDNA ameríndia continuava elevada. (PENA *et al.*, 2011)

Em seu trabalho, Santos e cols (2016) mencionaram que a ancestralidade europeia segue um gradiente ao longo das cinco regiões geográficas brasileiras, onde encontrou-se um maior percentual nas áreas urbanas da região Sul. Segundo o autor, as populações na região Norte apresentam uma proporção significativa da ancestralidade de ameríndios, e as regiões Nordeste,

Centro-Oeste e Sudeste apresentam a linhagem africana como a segunda maior contribuição na ancestralidade (SANTOS ., 2016)

Porém, ainda não se conhece profundamente a variabilidade genética da população brasileira. A maioria dos estudos considera análises de subgrupos que não são representativos da população como um todo, como por exemplo, ancestralidade autodeclarada, nível social e cor de pele. Apesar de a classificação em raça ser equivocada do ponto de vista genético, como discutido por Pena, 2011, ela ainda é muito utilizada no Brasil, principalmente nos censos demográficos, que classificam os indivíduos em brancos, pretos, pardos e amarelo. E por meio dos estudos de ancestralidade genômica, fica ainda mais claro que este tipo de classificação baseada em cor/raça é superficial, se tratando de Brasil (PENA *et al.*, 2011 e MANTA, 2013).

1.3 Ancestralidade e marcadores moleculares na população

Devido aos diferentes padrões de miscigenação envolvidos na formação da população brasileira, foi importante considerar a incorporação de marcadores genéticos de colonizadores estrangeiros e os processos históricos que conseqüentemente os introduziram. Dessa forma, a utilização da biologia molecular como ferramenta para rastrear estes marcadores genéticos por meio da investigação da ancestralidade é fundamental (SCHAAN *et al.*, 2017).

Quando falamos de estudos populacionais, é impossível não citar os marcadores moleculares de ancestralidade. Os mais utilizados hoje em dia são os marcadores genéticos, que compreendem como qualquer caráter visível ou um fenótipo que possa ser analisada, para qual os *loci* individuais segregam de uma maneira mendeliana. Eles apresentam variabilidade e possibilitam a diferenciação entre os indivíduos e populações. Gontijo (2008), expõe que os estudos com os marcadores genéticos auxiliam no entendimento das relações evolutivas entre as populações e na reconstrução das rotas e origens da população. Para esse tipo de estudo, é importante incluir *loci* polimórficos, cujo alelo mais comum apresenta uma frequência populacional de no máximo 99% (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017 e GONTIJO, 2008).

Tais polimorfismos de DNA surgem através de uma variação (mutação), e a sua detecção é um avanço para o campo da genética molecular. A obtenção de tais marcadores se baseia em sequências de nucleotídeos do fragmento de DNA e a detecção das diferenças nessas regiões, ocasionadas por deleções, inserções e substituições (TURCHETTO-ZOLET , 2017).

Os marcadores moleculares podem seguir tanto a herança mendeliana distinto quanto serem autossômicos com herança bi parental. A diferença na transmissão e nos padrões de evolução dos marcadores de herança mendeliana distintos, tais como os genes e sequência do

DNA nuclear (nDNA) vão refletir aspectos diferentes da biologia e da história de uma população. Enquanto os marcadores autossômicos com herança bi-parental, como por exemplo os microssatélites, são utilizados normalmente para identificação genética de indivíduos e análises de parentesco, estimação da diversidade populacional, cálculos de distância genética e elucidar a relação entre diferentes raças e suas origens tal qual estimar a miscigenação (EGITO, 2007).

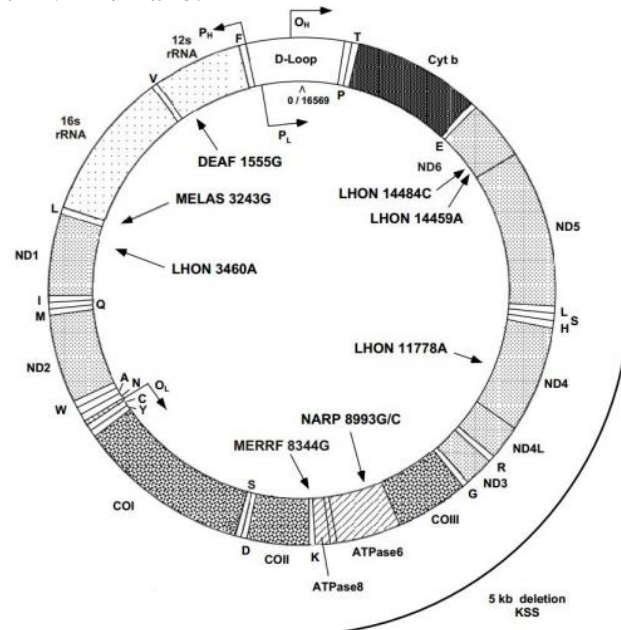
1.3.1 DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas celulares responsáveis pela produção energética, por meio do metabolismo bioenergético celular e produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa. Além disso, são responsáveis também por apoptose e regulação do ciclo celular, homeostase redox e de cálcio, além da sinalização intracelular. Acredita-se que a origem das mitocôndrias se deu por meio da endossimbiose entre as células eucarióticas e bactérias do gênero *α -proteobacterium*, que compartilha semelhanças genômicas (CHANG ., 2020; LAWLESS *et al.*, 2020 e CHOWDHURY *et al.*, 2022)

Tais organelas possuem genoma próprio, onde cada organela contém 2-10 cópias de um mtDNA de fita dupla circular de 16,6 kb contendo 37 genes que acumulam variações genéticas por meio da herança materna, e são agrupadas em haplogrupos. Seu material genético é do tipo plasmídeo, e reside na matriz mitocondrial, sendo ao longo do tempo reduzido por meio de transferência de genes para o genoma nuclear (BYBJERG-GRAUHOLM ., 2018 ; CHANG ., 2020; e LAWLESS *et al.*, 2020).

O mtDNA abrange uma região codificante, responsável pela codificação diversos polipeptídios dos complexos OXPHOS, III, IV e V, além dos rRNAs 16s e 18s mitocondriais e 22 tRNAs para a síntese de proteínas mitocondriais, como ilustrado em Figura 3. Também possui uma região controle não codificante, de aproximadamente 1000 nt, que possui uma origem de replicação do estande pesado (H), rico em guanina (G) e os promotores para a transcrição tanto do estande H quando do estande leve (L) rico em citosina (C) (WALLACE *et al.*, 2013; CHOWDHURY *et al.*, 2022).

Figura 3 – Mapa do mtDNA humano.



Fonte: *mitomap.org*

O mtDNA foi identificado pela primeira vez por Margit M. K. Nass e Sylvan Nass, em 1963, em que os autores demonstraram que as “fibras mitocondriais” de embriões de galinhas pareciam conter DNA. Com o passar do tempo e com o advento das tecnologias de sequenciamento, o mtDNA tornou-se um alvo prático para identificar diferenças entre sequências utilizando comparação sistemática de tamanhos eletroforéticos de fragmentos (DiMARCO, 2020).

A caracterização do mtDNA feita em 1987 por Rebecca Cann, Mark Stoneking e Allan C. Wilson, em 1987 na publicação “*Mitochondrial DNA and human evolution*”, foi crítica para a reconstrução da evolução humana com base nas diferenças do mtDNA entre as populações humanas contemporâneas. Por mutações serem comuns no material genético mitocondrial, é possível observar uma diversidade de sequências de mtDNA, especialmente entre indivíduos e populações humanas de origens diferentes (WALLACE *et al.*, 2013 e DiMARCO, 2020).

A filogenia apresentada em 1987 incluía um ancestral comum africano para todas as linhagens de mtDNA, e esta hipótese ficou conhecida mais tarde como a Eva mitocondrial. Isso só é possível pois os polimorfismos e mutações do mtDNA se acumularam ao longo das linhagens maternas à medida que as mulheres migravam da África para colonizar o globo. À medida que novas mutações surgiram no mtDNA, novas linhagens no ramo da sua árvore filogenética eram geradas (WALLACE *et al.*, 2013 e DiMARCO, 2020).

A utilização do mtDNA como um relógio molecular para reconstruir a evolução humana recente e marcador de afinidades genéticas em grupos humanos de diferentes regiões geográficas é especialmente útil em estudos de Genética de populações. Isso se dá por uma série de características do mtDNA, como por exemplo: a sua organização simples, herança materna, além de uma taxa de evolução relativamente alta e sua falta de recombinação. E com base nessas características, é possível então inferir padrões de herança com muito mais certeza com base no mtDNA do que no nDNA (HAGELBERG *et al.*, 1999 e DiMARCO, 2020).

Além disso, o mtDNA acumula substituições em uma taxa mais alta do que o nDNA, possivelmente porque a atividade metabólica da própria mitocôndria submete o seu material genético a níveis mais altos de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido a sua proximidade com a cadeia de transporte de elétrons. Ou seja, no mtDNA, as diferenças se acumulam numa taxa de tempo mais curtas, cerca de 5 a 15 vezes a do genoma nuclear. Além de o mesmo ser replicado numa maior frequência, e possuir uma limitada proteção dos mecanismos de reparo. Tais mutações podem ser herdadas ou adquiridas esporadicamente ao longo da vida. E ao contrário do genoma nuclear, o mtDNA é transmitido pela mãe, havendo milhares de cópias do mesmo em cada célula (AL PAYNE *et al.*, 2013 e WEI, 2019; DiMARCO, 2020 e LAWLESS *et al.*, 2020;).

Diferente do que observamos no nDNA, o mtDNA está em um estado altamente poliploide dentro de cada célula. Até poucos anos atrás, acreditava-se que quase todos os seres humanos possuíam todas as moléculas de mtDNA idênticas no nascimento (homoplasmia). Porém, aproximadamente 25% dos indivíduos saudáveis herdaram uma mistura de mtDNA denominada de heteroplasmia; que envolve quase exclusivamente o mtDNA *D-loop* não codificante. Isso é o resultado de danos ao seu material genético, gerando subpopulações de mitocôndrias portadoras de cópias de mtDNA diferentes, com inserções, deleções e outras mutações. Uma característica que explica isso é a sua independência, uma vez que continuam se replicando independentemente do ciclo celular, o que definimos como replicação relaxada (AL PAYNE *et al.*, 2013 e HEFTI *et al.*, 2017 e LAWLESS *et al.*, 2020).

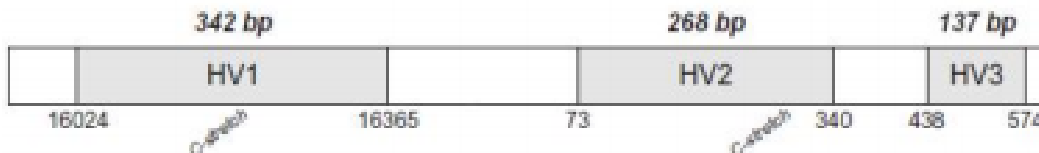
A região controle da molécula do mtDNA, também conhecida como região não codificante é a mais informativa em termos de ancestralidade materna, e é constituída em três regiões hipervariáveis (HV-I; HV-II e HV-III). Tais regiões juntas são capazes de informar o haplogrupo ancestral daquele indivíduo, por meio da presença de motivos que variam de uma sequência de referência. (SCHAAN *et al.*, 2017).

A Sequência de Referência (CRS) que utilizamos atualmente foi primeiramente sequenciada em 1981 na Inglaterra por Anderson e colaboradores a partir do mtDNA de uma

mulher com ascendência europeia. Anos mais tarde, em 1999, Andrews e colaboradores ressequenciaram a CRS, permitindo com erros na sequência original fosse corrigida, gerando a sequência que utilizamos hoje em dia para comparação, a CRS revisada (rCRS) (ANDREWS *et al.*, 1999)

As HVR apresentam uma taxa maior de mutação, explicada pela deficiência de mecanismos de reparação de mutações destas sequências, causadas pela baixa fidelidade da DNA polimerase mitocondrial. Dessa forma, a HVR apresenta três sub-regiões com alto índice polimórfico: HV-I (342 pb – posição 16.024-16.365), HV-II (268 pb – posição 73 – 340) e a HV-III (137 pb – posição 438 – 574), como mostrado na Figura 4 (CARDENA, *et al.*, 2013; MIRANDA, 2017 e BRITO COSTA, 2019).

Figura 4 – Regiões hipervariáveis do mtDNA humano



Fonte: Miranda, 2017

De acordo com Miranda, ao longo da evolução humana, as mutações sofridas pelo mtDNA foram acumuladas, o que gerou uma grande diversidade entre os indivíduos e entre as populações. Essas sequências são identificadas por um conjunto de variações, denominadas haplótipos. Quando os haplótipos compartilham os mesmos polimorfismos, podemos então agrupá-los em clados, os haplogrupos (MIRANDA, 2017).

A diversidade de haplótipos pode ser explicado por meio da vantagem adaptativa, em que, se uma mutação fundadora mudasse a fisiologia mitocondrial de maneira benéfica para os indivíduos naquele ambiente regional, então aquela linhagem de mtDNA se tornaria enriquecida naquela localidade geográfica, permitindo a colonização humana dos diversos ambientes que eles encontraram ao redor do mundo. Substituições subsequentes de bases adicionais em mtDNA geraram haplótipos descendentes regionais relacionados, que são denominados como haplogrupo. Sendo assim, cada continente e região geográfica possui uma matriz distinta de tipos de sequências de mtDNA, característica daquela região (WALLACE *et al.*, 2013).

Bybjerg-Grauholm e colaboradores, (2018) em seu artigo relata que variantes genéticas do mtDNA, assim como variantes nos genes nucleares que codificam o proteoma mitocondrial estão sendo correlacionados a doenças, mas frequentemente não reproduzíveis. Os autores

explicam que, por meio do processo de deriva genética aleatória e seleção, de acordo com a migração das populações humanas, linhagens predominantes de mtDNA tornaram-se específicas geograficamente (BYBJERG-GRAUHOLM ., 2018).

Dessa forma, cada haplogrupo está relacionado com um conjunto próprio de variantes de nucleotídeos únicos (SNVs), tendo propriedades bioenergéticas próprias e interações diferentes, com base nas influências nucleares e exposições ambientais. Atualmente, as principais doenças relacionadas com alterações no mtDNA são doenças degenerativas neurológicas, como doença de Alzheimer, doenças de Parkinson, doenças psiquiátricas e cardíacas, como hipertrófica e cardiomiopatia isquêmicas (BYBJERG-GRAUHOLM ., 2018; GUDISEVA ., 2019).

Outrossim, o mtDNA fornece uma ferramenta adicional para caracterizar evidências biológicas. Sendo assim, além da aplicação na Genética populacional, o mtDNA é utilizado também como importante marcador nas Ciências Forenses. Sua aplicação em casos forense sempre foi útil para os geneticistas, principalmente devido à sua presença ubíqua no material biológico, mesmo na ausência do nDNA (como é o caso de materiais provenientes de ossos, dentes e cabelos). Porém, mesmo com a sua capacidade limitada de identificar indivíduos devido à falta de recombinação, o mesmo oferece vantagens significativas quando se busca a confirmação da linhagem materna (COURT, 2021).

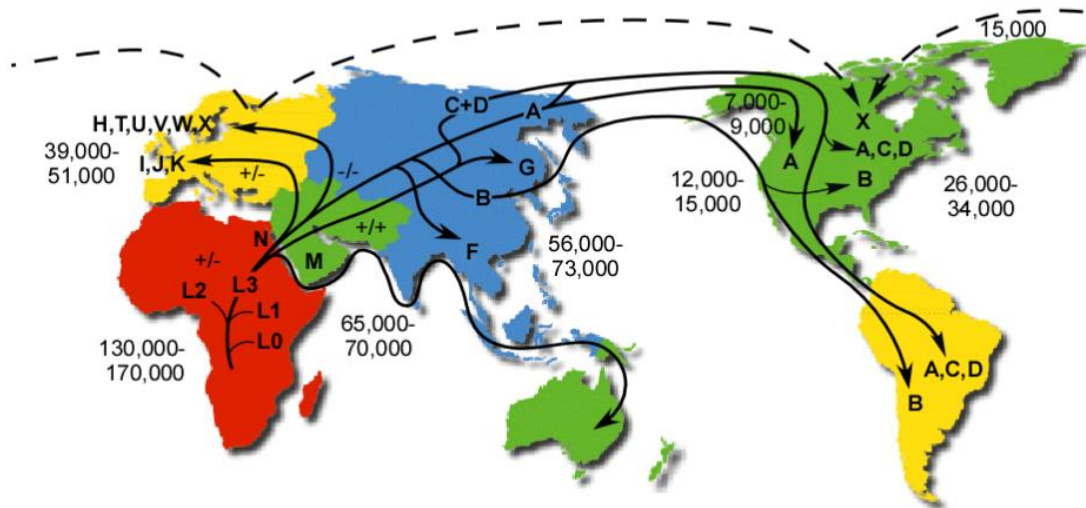
Além disso, o mtDNA também pode ser aplicado ao contexto clínico, uma vez que a maioria das doenças mitocondriais estão relacionados às alterações na região codificante da molécula. Essas doenças são formadas por um grupo clinicamente heterogêneo, causadas por defeitos no sistema de produção de ATP, em que as mutações no mtDNA ou nos genes nDNA relacionados à mitocôndria podem resultar em disfunção mitocondrial. A doença geralmente afeta múltiplos órgãos em locais e gravidade variados (RODENBURG, 2011 e MOLNAR *et al.*, 2017).

1.3.1.1 Haplogrupos mitocondriais

Os haplogrupos são conjuntos evolutivamente conservados das variações regionais de haplótipos SNP de mtDNA, resultado de antigas migrações populacionais humanas. Tais haplogrupos apresentam distribuição geográfica característica, variam em frequências entre os continentes e exibem diversas capacidades metabólicas. Isso ocorre uma vez que, o mtDNA exibe uma alta taxa de mutação e não sofre recombinação. A partir das mutações, é possível gerar agrupamentos filogenéticos, em que são considerados correspondentes com determinadas regiões geográficas, onde existem haplogrupos específicos da África, Ásia, Europa e América,

como podemos ver na Figura 5 (MIRANDA, 2017; BYBJERG-GRAUHOLM ., 2018 e CHANG ., 2020).

Figura 5 – Mapa da migração do mtDNA



Fonte: mitomap.org

A classificação dos tipos de mtDNA em diferentes haplogrupos se deu com base em polimorfismos de fragmentos de restrição ou substituição de bases na região controle do mtDNA. Essa abordagem forneceu uma nomenclatura útil para os estudos de mtDNA de diferentes regiões geográficas, e nos permite avaliar a origem (sub) continental dos indivíduos por meio da ancestralidade matrilinear das populações. Além disso, demonstra a necessidade de identificação filogenética de forma precisa das sequências dos diferentes haplogrupos para se entender os eventos de migração humana (HAGELBERG *et al.*, 1999 e ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

Estimar o haplogrupo das linhagens de mtDNA é crucial para pesquisas científicas e análises diagnósticas forense. Graças a essas linhagens, foi possível reconstruir as migrações humanas, baseadas na distribuição dos haplogrupos mitocondriais existentes. Na genética forense, os haplogrupos fornecem informações que podem ser usadas para considerações filogenéticas e filogeográficas (DÜR *et al.*, 2021).

Os nomes do haplogrupos mitocondriais foram desenvolvidos na década de 1990, sendo catalogado sistematicamente desde 2009 no banco de dados Phylotree(mt) (<https://www.phylotree.org/tree/index.htm>, acessado em 04 de fevereiro 2023). Esse dispositivo é gratuito, e foi atualizado pela última vez em fevereiro de 2016; contando com uma árvore com 5.435 motivos de definição de haplogrupos diferentes. Ele é a base para o desenvolvimento de outros *softwares* que estimam o status do haplogrupo de um determinado mitotipo (haplótipo de mtDNA), como por exemplo o EMPOP (DÜR *et al.*, 2021).

E com base em novos sequenciamentos de mtDNA de populações diferentes, novos dados populacionais sendo gerados, se observa um número crescente de seqüências que não possuem correspondência verdadeira nesta árvore. Com isso, estima-se que, com base nos novos dados adicionados ao Phylotree, os resultados dos haplogrupos fiquem mais fidedignos a sua origem (DÛR *et al.*, 2021).

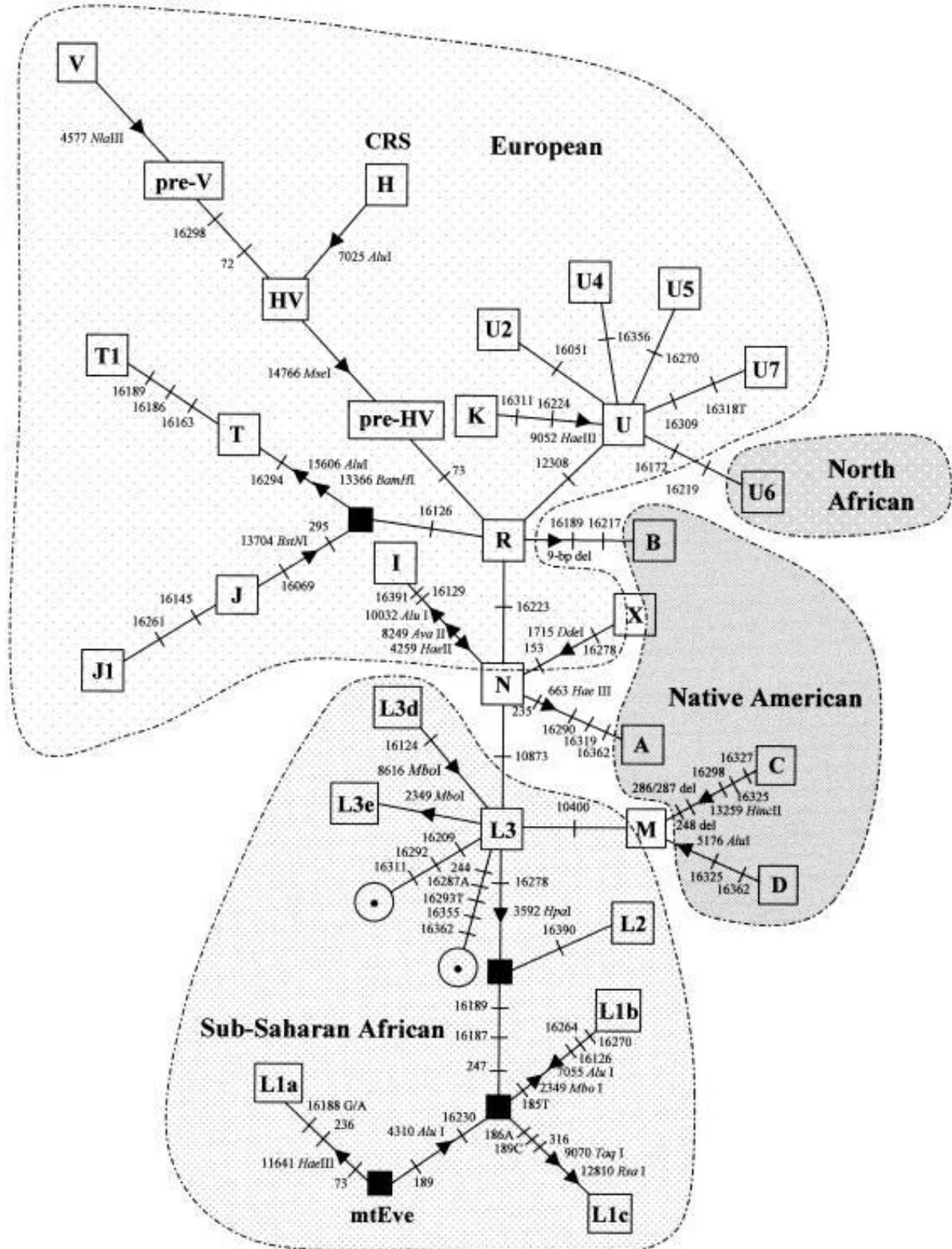
Os haplogrupos característicos de África estão relacionados e englobam dentro de uma linhagem específica do continente denominada de “macrohaplogrupo L”, que surgiu entre 130.000 e 200.000 anos. Esse macrohaplogrupo foi fundado por mtDNAs semelhantes ao haplogrupo L0, comum entre populações da África do Sul. Já na Etiópia, há 65.000 anos o haplogrupo L3 deu origem aos haplogrupos M e N. Os descendentes de M e N deixaram a África para colonizar o resto do globo. O macrohaplogrupo M moveu-se ao longo do Sudeste Asiático, chegando à Austrália. Mais tarde, os descendentes de M se mudaram para o Norte do Sudeste asiático, formando uma infinidade de haplogrupos de mtDNA da Ásia Central e Oriental, incluindo: C, D, G, M1-M20 (BEHAR *et al.*, 2008 e WALLACE *et al.*, 2013).

Já o macrohaplogrupo N, fora da África, foi para duas direções: Uma moveu-se pelo Sudeste da Ásia para a Austrália e do Sul da Ásia e do Norte da Ásia central, gerando os haplogrupos A e Z. Além disso, o macrohaplogrupo N ainda se mudou para o Norte da África, gerando os haplogrupos europeus I, X e W. Na Eurásia, N também deu origem ao submacrohaplogrupo R. Já R deu origem aos demais haplogrupos europeus: H, J, Uk, T, U e V. Além disso R também se moveu para o leste produzindo os haplogrupos asiáticos B e F (BEHAR *et al.*, 2008 e WALLACE *et al.*, 2013).

A partir de análises completas do genoma mitocondrial, foram identificadas ao menos 15 linhagens fundadoras no pool genético ameríndio, sendo elas: A2, B2, C1b, C1c, C1d, C1d1, D1 e D4h3a; além dos restritos ao Norte da América do Norte: A2a, A2b, D2a, D3 e X2a, e outros encontrados no extremo Sul da América do Sul, incluindo o B21, D1g e C1b13. Com isso, é proposto que a maioria das linhagens de mtDNA de nativos foram geradas durante o período em que esses indivíduos ficaram isolados na Beríngia, há cerca de 5000 anos (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Com isso, temos que de toda a diversidade africana, apenas as linhagens M e N colonizaram o resto do mundo. Além disso, dos mtDNAs asiáticos, apenas as linhagens A, C e D se mudaram do extremo Nordeste da Sibéria e deram origem aos paleo-índios. Ademais, a taxa de evolução da seqüência de mtDNA é tal que produziu importantes mudanças evolutivas no mtDNA que coincidem com as principais migrações geográficas humanas, como visto na Figura 6 (WALLACE *et al.*, 2013).

Figura 6 – Árvore de classificação dos haplogrupos de mtDNA, suas origens e mutações (números ao longo dos links). Cada haplogrupo se encaixa dentro dos continentes África, Europa, Ásia ou Nativo. Cada quadrado representa o nó do respectivo haplogrupo. CRS indica a sequência de referência revisada, e “mtEve” sendo a raiz da árvore



Fonte: Reproduzido de *Alves-Silva, 2000*.

A herança materna do mtDNA significa que o mesmo nunca pode se misturar, e,

portanto, não sofre recombinação. Dessa forma, as variantes de nucleotídeo único do mtDNA que se acumularam ao longo da história permanecem em desequilíbrio de ligação (WALLACE *et al.*, 2013).

1.4 Diabetes

1.4.1 Epidemiologia e patogenia do diabetes

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), a diabetes mellitus é a endocrinopatia mais recorrente, afetando aproximadamente 422 milhões de indivíduos em 2014, sendo que no Brasil, 13 milhões são acometidos. Ela se caracteriza pela deficiência insulínica, decorrente da não produção da insulina pelo pâncreas, ou devido ao organismo não conseguir empregar adequadamente a insulina produzida. As formas mais comuns da doença são a tipos 1 (autoimune), que acometem de 5 a 10% dos diabéticos, e a tipo 2 (adquirida), que representa 90% dos casos, sendo em ambas o quadro de hiperglicemia observado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019 e PASSO *et al.*, 2020).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) caracteriza-se por deficiência insulínica grave, sendo considerado a endocrinopatia mais comum da infância e adolescência. É sabido que essa deficiência insulínica é gerada pela destruição autoimune das células β -pancreáticas das ilhotas de Langerhans, juntamente a susceptibilidade genética e fatores ambientais. Dessa forma, pouca ou nenhuma insulina é liberada, fazendo com que a glicose permaneça no sangue e não sendo usado como fonte energética pelas células (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019 e ALEOTTI *et al.*, 2020).

De acordo com Diaz-Valencia e cols. (2015), os fatores com maior capacidade de influenciar a variabilidade da incidência do DM1 mundial seriam o clima e o meio ambiente; dados demográficos (exemplo o índice de massa corporal das populações); e indicadores econômicos e de saúde das populações. Dados recentes em um estudo realizado em Bauru mostram que a incidência da doença também está aumentando no Brasil (DIAZ-VALENCIA *et al.*, 2015; e NEGRATO *et al.*, 2017).

A patogenia da diabetes tipo 1 por sua vez envolve tanto componentes celulares (linfócitos T CD4 e T CD8) quanto humorais, pela presença de autoanticorpos e autoantígenos. Os autoantígenos são os responsáveis pela destruição das células beta, que são originados das lesões provocadas nessas células. Os autoantígenos são reconhecidos pelo sistema imune,

gerando então uma resposta autoimune. Diversos fatores já foram mencionados como os desencadeadores de tal resposta, como por exemplo, a quebra da tolerância imunológica por disbiose intestinal ou infecções virais (PASSO *et al.*, 2020 e HAYASHI *et al.*, 2020).

O DM1 está associado a um aumento do risco de complicações crônicas microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas) e cardiovasculares, resultando em elevadas taxas de morbidade e mortalidade em faixas etárias jovens, justificando a identificação precoce de possíveis marcadores genéticos, clínicos e laboratoriais destas complicações para a criação de medidas de prevenção e terapêuticas adequadas que possam alterar o curso natural da doença. Dentro do contexto dos marcadores genéticos das complicações crônicas, o estudo da ancestralidade genômica em pacientes DM1 no Brasil é de grande interesse pois poucas populações mundiais têm a diversidade étnica observada no nosso país (KLEIN *et al.*, 1984; FOLEY *et al.*, 2007 e FOSS-FREITAS *et al.* 2008).

1.4.2 DNA mitocondrial em diabéticos

Até o presente momento não foi realizado nenhum estudo de mtDNA em pacientes com DM1. Estudos de mtDNA na população brasileira tem demonstrado que a contribuição e Africana, Ameríndia e Europeia foi de respectivamente, 28%, 33% e 39% e que a mesma também apresentou uma distribuição geográfica. Ressaltamos, entretanto, que nenhum destes estudos avaliou a relação entre cor autodeclarada e local de nascimento dos pais e avós com a ancestralidade genômica do indivíduo (ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

De maneira geral, é possível concluir que a diversidade genética na população brasileira é vasta, devido a diferentes padrões de miscigenação. Nenhum estudo analisando o mtDNA de pacientes diabéticos foi realizado no Brasil. A associação dos dados de ancestralidade matrilinear com a cor autodeclarada e local de nascimento dos mesmos nos permitirá avaliar se existem correlações entre estes dados e a manifestação da doença.

1.4.3 Ancestralidade da diabetes

De acordo com a última pesquisa nacional realizada pelo IBGE, a cor autorreferida/etnia no Brasil é composta por brancos (48,8%), pardos (mulatos) (43,8%), preta (6,5%), índios (0,9%), com uma grande variabilidade em todo o país. No que diz respeito à dados de pacientes com diabetes, a incidência da doença está aumentando sem estar relacionada a um grupo étnico específico. (DCCT Research Group, 1993; FERREIRA, 2006; NEGRATO *et al.*, 2017).

A pesquisa realizada por Gomes e colaboradores (2018) mostrou que a etnia autorreferida em uma amostra de pacientes com DM1 no Brasil foi composta por 54,3% de brancos, 35,9% de pardos, 7,8% de preto, 1,1% de ascendente oriental e índios nativos com 0,9%, também revelando uma grande variabilidade através das quatro regiões geográficas. Além disso, o mesmo estudo revela que a ancestralidade genômica europeia era mais prevalente na população diabética (67,8%) e nos pacientes que se autodeclararam como brancos (74,6%) e pardos (61,1%). Nos pacientes autodeclarados negros, a ancestralidade europeia era de 39,1% quando comparados com os controles da mesma região demográfica. Além disto, observou-se que a ancestralidade europeia era maior no Sul/Sudeste e a africana no Norte/Nordeste (GOMES ., 2018; IBGE, 2021).

É importante notar que, comparando o estudo de Gomes ., (2018) com a pesquisa nacional do IBGE acima mencionada, a incidência de DM1 é maior entre brancos e pardos. Isto poderia ser relacionado com a imprecisão na etnia autorreferidas ou para algumas características do DM1 no Brasil, até agora desconhecida. Dentro deste contexto é importante enfatizarmos que a etnia no Brasil é relacionada ao nível socioeconômico e, ambas podem exercer grande influência no estado de saúde do indivíduo (GOMES *et al.*, 2018).

Já quando utilizado o Cromossomo Y como marcador molecular para estudar a ancestralidade paterna dos pacientes com DM1 no Brasil, poucos são os estudos. Porém, o que se sabe sobre a ancestralidade patrilinear dos indivíduos portadores de DM1, foi recentemente publicado em um estudo realizado no Maranhão com 152 pacientes, utilizando a análise dos 26 marcadores STR do cromossomo Y. Neste estudo, chegou-se à conclusão de que os indivíduos com e sem DM1 no Maranhão têm origem europeia como seu maior componente, e porcentagem de afro-americanos e nativos maiores do que outras populações brasileiras. Dessa forma, a origem patrilinear europeia foi evidenciada pela maior frequência do haplogrupo R1b (AZULAY ., 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a ancestralidade matrilinear (europeia, africana e ameríndia) em pacientes com DM1 com base em sua cor autodeclarada e localidade geográfica e comparar com os dados gerais da população brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar os haplótipos das linhagens de mtDNA das amostras de pacientes com DM1;
- b) Determinar as frequências dos haplogrupos de mtDNA de amostra dos pacientes com DM1;
- c) Avaliar a variabilidade das linhagens matrilineas em pacientes com DM1 e mãe e avós estratificados por local de nascimento e cor autodeclarada.
- d) Comparar os dados de haplótipos e haplogrupos entre pacientes com DM1 e com dados da população brasileira;

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho de estudo

Este estudo engloba 204 pacientes do projeto intitulado “Associação de alelos do sistema principal de Histocompatibilidade com ancestralidade autossômica, do cromossoma Y e do DNA mitocondrial em pacientes com diabetes tipo 1: relação com a cor autodeclarada em pais e avós” que conta com 685 pacientes diabéticos, sendo esta derivado de um estudo multicêntrico transversal em diabetes tipo 1 já realizado entre agosto de 2011 e agosto de 2014 (projeto CNPQ Edital nº42/2010; processo 563753/2010-2; CAAE: 53563115.2.1001.5259), com 1.760 pacientes das de nove centros, distribuídos pelas cinco regiões geográficas brasileiras. Para este trabalho, foram sequenciados 204 amostras, sendo 103 da região Nordeste, 7 da região Norte, 81 da região Sudeste e 13 da região Sul.

Os pacientes participantes do estudo são brasileiros, portadores de diabetes mellitus tipo I (DM1), em acompanhamento médico pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os pacientes foram diagnosticados pela presença de sintomas clínicos característicos de DM1, tais como: grau variado de hiperglicemia, perda de peso, poliúria, polidipsia, polifagia e a necessidade de uso contínuo de insulina desde o diagnóstico.

Os pacientes incluídos tinham pelo menos 13 anos de idade, e fizeram o acompanhamento mínimo de 6 meses no seu respectivo centro de estudo. Dessa forma, cada centro forneceu dados de ao menos 50 pacientes com DM1 que compareciam regularmente à clínica. Todos os indivíduos incluídos no estudo foram devidamente orientados de forma verbal e através de um termo de consentimento livre e esclarecido obtidos pelos pacientes ou dos seus pais e ou responsáveis (TCLE: anexo 1).

O projeto aborda as características clínicas e genéticas da diabetes tipo 1. As análises genéticas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) sob coordenação do professor Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto e do Laboratório de Diagnóstico por DNA sob coordenação da professora Dr^a. Dayse Aparecida da Silva. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (Universidade do Estado do Rio de Janeiro) e pelo comitê de ética local de cada centro.

3.2 Coleta de dados

Os pacientes responderam a um inquérito (anexo 2) sobre os antecedentes familiares, pais e avós maternos e paternos abordando a cor autodeclarada e local de nascimento dos mesmos. O questionário padronizado foi aplicado durante a Consulta clínica para avaliar os dados clínicos e demográficos, tais como: sexo, idade, local de nascimento, cor/raça autodeclarada, idade do diagnóstico e duração do diabetes.

Além disso, informações acerca da história familiar, local de nascimento e cor/raça dos parentes também foram coletadas, para parentes de três gerações. A cor/raça foi avaliada a partir da classificação do IBGE, em preta, branca, parda, amarela (asiática) e indígena. Quando o nascimento era notificado fora do Brasil, os dados foram estendidos para a geração ascendente, nos casos de dados não declarados.

3.3 Metodologia e Análise de dados

3.3.1 Extração, amplificação e purificação do mtDNA

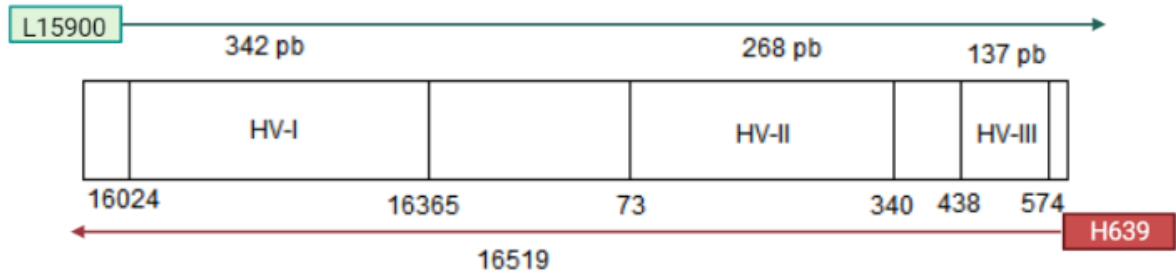
A extração de DNA foi realizada em uma amostra de sangue periférico usando o kit comercial SP QIA Symphony de acordo com as diretrizes do fabricante (Qiagen, EUA).

Para a amplificação, foi padronizado a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com um volume de 10 μ L conforme exposto na Tabela 5. Foram utilizados um mix a 2 μ M dos *primer* senso L15900 (L15900 – TAA ACT AAT ACA CCA GTC TTG TAA ACC) e antissenso H639 (GGG TGA TGT GAG CCC GTC TA), que abrange a região controle do mtDNA (Figura 7), conforme descrito por Reis *et al.*, 2019.

Tabela 3 – Protocolo para a reação da PCR

Reagentes	Volume por amostra (μL)
Tampão Qiagen [2x]	5
<i>Primer</i> MIX (L15900/H639) [2 μ M]	1
H ₂ O	1
DNA	2

Figura 7 – Posição de anelamento dos *primers* utilizados na PCR: L15900 e H639 na região controle.



Fonte: A autora

A reação seguiu o protocolo de ciclagem de desnaturação inicial à 95 °C por 15 minutos, seguido pelo número otimizado de 35 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60 °C por 90 segundos, e extensão à 72 °C por 1 minuto e por fim, polimerização final à 72 °C por 10 minutos.

Ao fim da PCR, foi seguido a confirmação da amplificação em gel de agarose 1,2% (1,2 g de agarose + 100 µL de tampão TAE 1x), utilizando 1 µL de intercalante de DNA (Corante Não Mutagênico Safer - Kasvi) e 2 µL da amostra.

Em seguida, foi realizada a purificação da amostra utilizando a enzima Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase (EXO/SAP, Thermo Scientific Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Nessa etapa, o protocolo de ciclagem foi 37 °C por 15 minutos e 85 °C por 15 minutos.

3.3.2 Reação de sequenciamento e análise de sequências

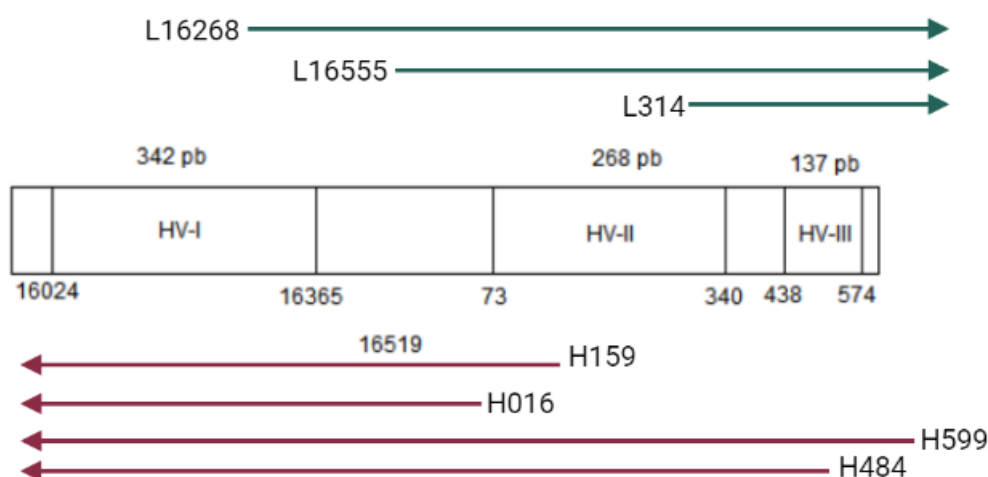
A região controle foi sequenciada utilizando o kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems™) e os *primers* senso L15900 e anti-senso H639, em tubos de reações diferentes. Quando o sequenciamento direto utilizando os dois *primers* não foi suficiente para contemplar a região controle como um todo, como é o caso de amostras com heteroplasmias nas posições 16189 (T>C); T309C; heteroplasmia de comprimento pela inserção de AC em 513 e 525, ou transições na posição 460, foi utilizado os *primers* complementares, conforme mostrado em Quadro 1 e Figura 8.

Quadro 1 – Relação de *primers* internos utilizados na etapa de sequenciamento para amostras que possuem heteroplasmias ou transições.

Primer	Orientação	Sequência (5' – 3')
L16555	Senso	CCCACACGTTCCCCTTAAAT
L16268	Senso	CACTAGGATACCAACAAACC
L314	Senso	AAATAATAGGATGAGGCAGGAATC
H159	Antissenso	AAATAATAGGATGAGGCAGGAATC
H016	Antissenso	TGATAGACCTGTGATCCATCGTGA
H599	Antissenso	CACTAGGATACCAACAAACC
H484	Antissenso	TGAGATTAGTAGTATGGGAG

Fonte: Cardena *et al.*, 2013 e Reis *et al.*, 2019

Figura 8 – Posição de anelamento dos *primers* internos utilizados no sequenciamento da região controle



Fonte: A autora.

Foi seguido as recomendações do EMPOP utilizando 200ng de DNA em um volume final de 10 μ L, como descrito nas Tabelas 3 e 4. O perfil de ciclagem do sequenciamento foi de desnaturação inicial à 96 °C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação à 96 °C por 15 segundos, anelamento à 50 °C por 9 segundos e extensão à 60 °C por 2 minutos, por fim extensão final à 60 °C por 10 minutos.

Tabela 4 – Protocolo para a reação de sequenciamento do *primer* H639

Reagentes	Volume final (μL)
Big Dye	2
Tampão	1
<i>Primer</i> H639 [2,5 μ M)	1
H ₂ O	1
Total da reação: 5 μ L do mix + 5 μ L do produto de PCR	

Tabela 5 – Protocolo para a reação de sequenciamento dos *primer* L15900; L16555; L16268; L314 e H159; H016; H599 e H484

Reagentes	Volume final (μL)
Big Dye	0,5
Tampão	0,75
<i>Primer</i> L15900 [2,5 μM]	0,5
H ₂ O	1,75
Total da reação: 3,5 μL do mix + 1,5 μL do produto de PCR	

Com o fim da reação de sequenciamento, seguiram para a etapa de purificação para eliminação de ddNTPs livres com a coluna de Sephadex (IlustraSephadex DNA Grade; GE Healthcare). Para esse procedimento, foram adicionadas 800 μL de Sephadex em uma coluna com filtro, apoiadas em um tubo de 2 mL. Os tubos foram adicionados na centrífuga, sofrendo rotação em 6.500g por três minutos. Ao fim dos três minutos, uma coluna de Sephadex foi formada. A coluna foi transferida a um novo tubo de 2 mL devidamente identificado; e ao centro da mesma adicionada 5 μL do produto da reação de sequenciamento, que sofreu uma nova centrifugação à 6.500g por três minutos.

Passados os três minutos, o produto purificado encontrava-se no fundo do tubo de 2 mL. Neste, foram adicionados 10 μL de formamida, misturada por *up and down* no tubo, e com seguinte adição na placa para sequenciamento. A eletroforese foi realizada em sequenciador automático ABI PRISM ® 3500 (Applied Biosystems, CA, USA).

3.3.3 Análise de dados

Todos as sequências *forward* e *reverse* foram verificadas manualmente e alinhadas com a Sequência de Referência de Cambridge revisada (rCRS), usando o programa SeqScape Versão 2.7 (Applied Biosystems, CA, USA), seguindo as atualizações de guias de nomenclatura para mtDNA. Para garantir a qualidade dos dados, duas avaliações independentes de dados brutos foram realizadas para determinação dos haplótipos. O software EMPOP foi utilizado para determinação dos haplogrupos de acordo com a versão mais atualizada da árvore filogenética do DNAm_t, Phylotree. Os haplótipos foram convertidos em sequências utilizando a ferramenta HaploSearch (POLETTO *et al.*, 2019).

O software Arlequin (versão 3.5.2.2) foi utilizado para as análises interpopulacionais, como o cálculo de distância genética (pairwise F_{ST}), diferenciação populacional, distribuição

mismatch e diversidade molecular.

Os resultados do nosso trabalho foram agrupados de acordo com a cor autodeclarada, e local de nascimento dos pacientes. A distribuição da origem geográfica matrilinear por grupos de cor autodeclarada nos pacientes foi calculado utilizando o excel. Para fins de comparação da ancestralidade matrilinear com indivíduos saudáveis do Brasil, foram utilizado dados já publicados das quatro regiões brasileiras: Sudeste (Cardena *et al.*, 2013; Sanches, 2013; Dos Reis *et al.*, 2019; Fridman *et al.*, 2014 e Simão *et al.*, 2018); Sul (Palencia *et al.*, 2010 e Poletto *et al.*, 2019); Norte (Nogueira *et al.*, 2017) e Nordeste (Schaan *et al.*, 2017).

O software Arlequin foi utilizado novamente, para cálculo da distância genética e F_{ST} (número de permutação 10.000 e limiar de significância 0,05) entre as amostras dos pacientes e com os dados da literatura para as regiões Sudeste (Cardena *et al.*, 201; Sanches, 2013; Dos Reis *et al.*, 2019; Fridman *et al.*, 2014 e Simão *et al.*, 2018) e Sul (Palencia *et al.*, 2010 e Poletto *et al.*, 2019). E para se evitar erros estatísticos, a correção de Bonferroni foi aplicada aos testes de significância.

O software GraphPad Prism (9.5.1) foi utilizado para calcular a distribuição por autodeclaração dos haplogrupos, foi utilizado o teste Anova e o Teste T par a par (dados não mostrados).

4 RESULTADOS

Este trabalho permitiu a elaboração de uma base dados com 204 haplótipos provenientes da análise da Região Controle do mtDNA de pacientes com DM1 do Brasil. Ao final deste estudo, os resultados obtidos serão apresentados em forma de pôster destaque no evento científico XXXVI Congresso Brasileiro de Genética Médica, a ser realizado em Agosto de 2023 em São Paulo (Apêndice C) e submetido como artigo científico à Revista Brasileira Internacional “Genomics and Molecular Biology” (Apêndice D).

4.1 Caracterização dos haplótipos de mtDNA de pacientes com DM1

Neste trabalho foi analisada a região controle do mtDNA de 206 pacientes diabéticos residentes de quatro regiões geográficas do Brasil (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste). Após a exclusão de pacientes aparentados, obtivemos 204 haplótipos geradas, dos quais 190 eram únicos. 11 haplótipos foram compartilhados por mais de um indivíduo, sendo o mais frequente compartilhado entre três indivíduos.

Os dados sobre diversidade molecular são encontrados na Tabela 6. É possível observar uma grande diversidade de haplótipos únicos dentro da população. Quando a estratificamos de acordo com a região de nascimento, tal diversidade aumenta, uma vez que, existiam haplótipos compartilhados entre as diferentes regiões geográficas. Com isso, a diversidade haplotípica encontrada nas amostras de DM1 no Brasil foi de 0.9991 ± 0.0006 , sendo a probabilidade de dois indivíduos compartilharem o mesmo haplótipo de 0,58%. Quando estratificamos os dados por região, temos os dados de diversidade haplotípica da região Sudeste sendo de 0.9994 ± 0.0020 ; para a região Nordeste 0.9977 ± 0.0019 ; na região Sul a diversidade foi de 1.0000 ± 0.0302 ; enquanto na região Norte foi de 1.0000 ± 0.0764 .

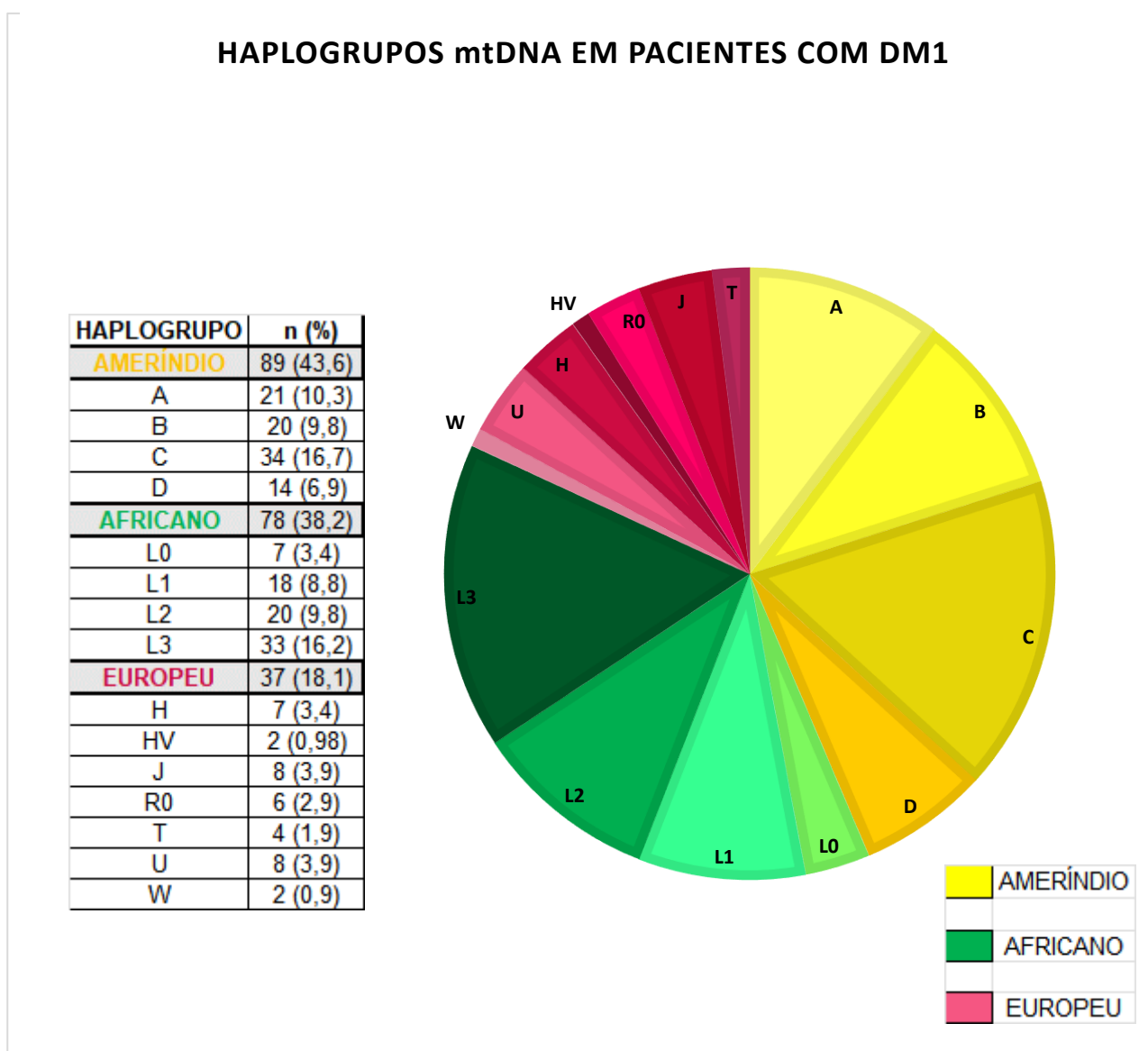
Tabela 6: Parâmetros de diversidade molecular, obtidos para as amostras de pacientes com DM1 no Brasil, e seus agrupamentos por região. Dados obtidos por meio do software Arlequin.

Parâmetro	Brasil	Nordeste	Norte	Sul	Sudeste
Tamanho amostral	204	103	7	13	81
Número de haplótipos únicos	190	94	7	13	76
Substituição	228	175	44	62	156
• Transição	221	155	41	58	141
• Transversão	27	20	3	4	15
Indels	35	21	7	10	23
Número de sítios polimórficos	240	185	51	71	167

4.2 Caracterização dos haplogrupos de mtDNA de pacientes com DM1

Dos dados gerados a partir da análise de mtDNA dos pacientes com DM1 no Brasil, 190 haplótipos foram gerados, conferindo um total de 120 haplogrupos únicos. Desses, 89 (43,6%) tinham origem matrilinear ameríndia (A = 10,3%; B = 9,8%; C= 16,7% e D= 6,9), 78 (38,2%) tinham origem matrilinear africana (L0= 3,4%; L1= 8,8%; L2= 9,8%; L3= 16,2), e os de origem europeia foram 37 (18,1%) (H= 3,4%; HV= 0,98%; J = 3,9%; R0= 2,9%; U= 3,9%; W= 0,9% e T= 1,9%), como é observado no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Distribuição dos haplogrupos nas amostras de pacientes com DM1 no Brasil.



Os pacientes com componente de origem ameríndia (n=89) foram os com maior quantitativo nas amostras de pacientes com DM1 (43,6%), representando 34 haplogrupos

distintos. O macrohaplogrupo A foi compartilhado com 21 indivíduos, desses 9 sendo haplogrupos distintos; o macrohaplogrupo B foi encontrado em 20 pacientes, sendo 6 distintos. O haplogrupo mais frequente foi o C (n=34), sendo o subhaplogrupo C1b o mais comum (n=17), o que caracteriza 8,3% das amostras; e o macrohaplogrupo D foi o menos frequente, sendo observado 14 vezes, porém com uma diversidade maior, com 9 haplogrupos diferentes, como pode ser observado no Quadro 2.

Quadro 2 – Quantitativo e frequência dos macrohaplogrupos de mtDNA de linhagem ameríndia (A, B, C e D) e seus respectivos subhaplogrupos considerando o total de pacientes com DM1 no Brasil.

Haplogrupo	N	Frequência	Haplogrupo	N	Frequência
A	21	10,29	C	34	16,67
A2	3	1,47	C1	1	0,49
A2+(64)	5	2,45	C1+16311	1	0,49
A2+(64)+@153	1	0,49	C1a	1	0,49
A2+(64)+@153	1	0,49	C1b	17	8,33
A2d2	3	1,47	C1b2	2	0,98
A2+(64)+16129	1	0,49	C1b8	4	1,96
A2aa	1	0,49	C1b8a	1	0,49
A2ag	1	0,49	C1d+194	4	1,96
A2al	5	2,45	C1d1d	2	0,98
B	20	9,80	Cb1	1	0,49
B2	1	0,49	D	14	6,86
B2r	3	1,47	D1	2	0,98
B2b3a	2	0,98	D1e	1	0,49
B2c2	2	0,98	D1f	1	0,49
B4	1	0,49	D1f1	2	0,98
B4b	11	5,39	D4	1	0,49
			D4b2a1	1	0,49
			D4h2	3	1,47
			D4h3a	2	0,98
			D4h3a5	1	0,49

O componente de ancestralidade matrilinear africano foi o segundo mais frequente em nossa amostra (n=78), o que representa 38,2% dos indivíduos com DM1 no Brasil. Foram encontrados 56 haplogrupos distintos. O macrohaplogrupo L0 foi encontrado em 7 indivíduos, sendo 4 diferentes. O macrohaplogrupo L1 foi compartilhado com 18 indivíduos, possuindo 14 haplogrupos diferentes. Já o macrohaplogrupo L2 foi encontrado em 20 pacientes, possuindo 18 haplogrupos diferentes. O macrohaplogrupo mais comum nessa população foi o L3 (n= 33), sendo o subhaplogrupo L34a o mais comum (n=4), caracterizando aproximadamente 2% das amostras, como indicado no Quadro 3.

Quadro 3 – Quantitativo e frequência dos macrohaplogrupos de mtDNA de linhagem africanas (L0, L1, L2 e L3) e seus respectivos subhaplogrupos considerando o total de pacientes com DM1 no Brasil.

Haplogrupo	N	Frequência	Haplogrupo	N	Frequência	Haplogrupo	N	Frequência
L0	7	3,43	L2	20	9,80	L3	33	16,18
L0a1a2	1	0,49	L2a1a3	1	0,49	L3	1	0,49
L0a1b1	3	1,47	L2a1a2	2	0,98	L3b	1	0,49
L0a1b2	1	0,49	L2a1+16189+(16192)	1	0,49	L3b2	1	0,49
L0a2a2	2	0,98	L2a1c+16086	1	0,49	L3b3	2	0,98
L1	18	8,82	L2a1c+16129	1	0,49	L3d	2	0,98
L1b1a+189	2	0,98	L2a1d	1	0,49	L3d4	1	0,49
L1b1a10	1	0,49	L2a1c1	1	0,49	L3e1	1	0,49
L1b1a18	1	0,49	L2a5	1	0,49	L3e1a	3	1,47
L1c1a2b	1	0,49	L2a1f3	1	0,49	L3e1a1	1	0,49
L1c1b1	1	0,49	L2b1b	1	0,49	L3e1a3b	1	0,49
L1c1d	2	0,98	L2b1a	1	0,49	L3e1b2	2	0,98
L1c2	1	0,49	L2b2	1	0,49	L3e2	1	0,49
L1c2a1a	1	0,49	L2c2	2	0,98	L3e2a1b1	1	0,49
L1c2a3a	1	0,49	L2b2	2	0,98	L3e3	3	1,47
L1c2b2	1	0,49	L2b3c	1	0,49	L3e2a1b1	1	0,49
L1c4	2	0,98	L2c2b1b	1	0,49	L3e2b+152	2	0,98
L1c3b	2	0,98				L3e4a	4	1,96
L1c4b	1	0,49				L3f1b1a1	3	1,47
L2a1+143	1	0,49				L3f1b4	1	0,49
L2a1	1	0,49				L3f3b	1	0,49
L1c5	1	0,49				L3h1b2	1	0,49
L1c4b	1	0,49						

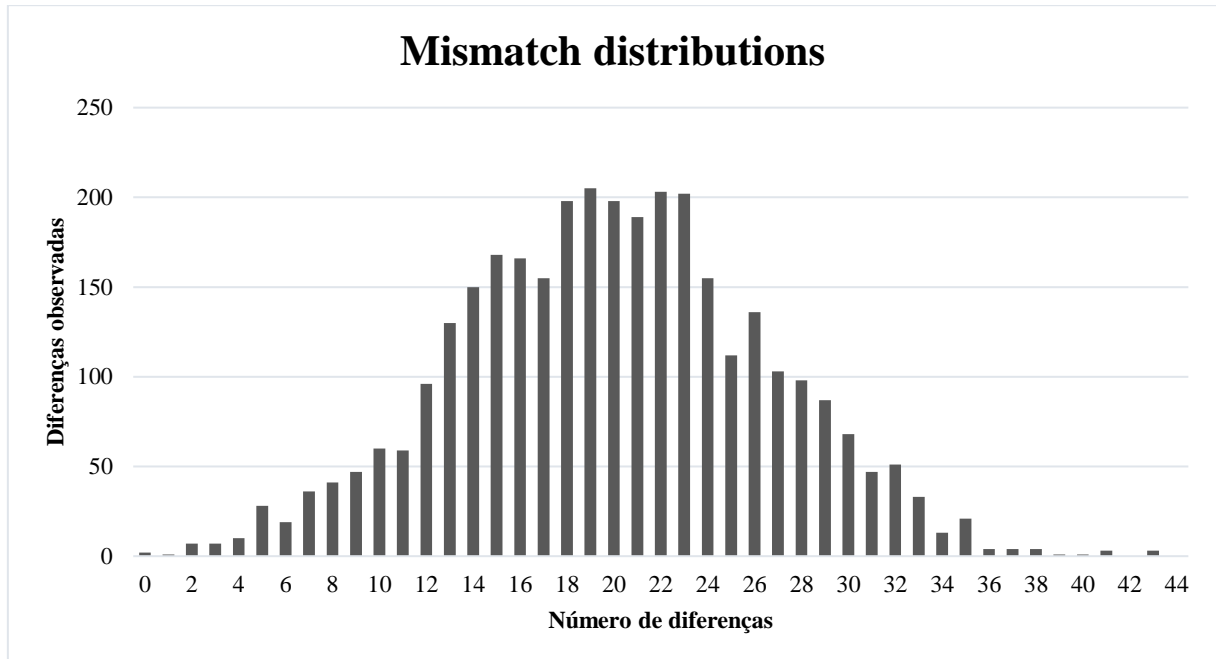
Já o componente europeu foi o menos frequente nas nossas análises, representando um total de 18,1%. Ao todo foram gerados 37 haplogrupos sendo 33 distintos. O macrohaplogrupo H foi observado 7 vezes, possuindo 7 haplogrupos distintos. O haplogrupo mais comum foi o J (n=8), sendo os subhaplogrupos J1b1a e J1c2 os mais frequentes, com dois indivíduos não aparentados os possuindo. Com isso, temos que cada subhaplogrupos possui uma frequência de aproximadamente 1%, como indicado no Quadro 4.

Quadro 4 – Quantitativo e frequência dos macrohaplogrupos de mtDNA de linhagem europeias (H, HV, J, R, T, U e W) e seus respectivos subhaplogrupos, considerando o total de pacientes com DM1 no Brasil.

Haplogrupo	N	Frequência	Haplogrupo	N	Frequência
H	7	3,43	R	6	2,94
H1b	1	0,49	R0	6	2,94
H1u2	1	0,49	T	4	1,96
H20a1a	1	0,49	T1a	1	0,49
H3h2	1	0,49	T1a1'3	1	0,49
H3h7	1	0,49	T1b	1	0,49
H3z	1	0,49	T2+16189	1	0,49
H6	1	0,49	U	8	3,92
HV	2	0,98	U3a	1	0,49
HV0+195	1	0,49	U3a2a1	1	0,49
HV14	1	0,49	U4a1c	1	0,49
J	8	3,92	U5a1	1	0,49
J1b1a1	2	0,98	U5a1b+16362	1	0,49
J1c2	1	0,49	U5a1f1	1	0,49
J1c5d	2	0,98	U6a1a1	1	0,49
J1c3+189	1	0,49	U6a1b1a	1	0,49
J2a1a1a	1	0,49	W	2	0,98
J2a2d	1	0,49	W+194	1	0,49
			W1+119	1	0,49

Foi calculado o *mismatch distribution* para as amostras de DM1 no Brasil, na qual a distribuição do número de diferenças par a par entre os haplótipos é estimada (Gráfico 4). O resultado encontrado apresenta uma distribuição mediana das diferenças par a par entre as sequências. Ou seja, demonstra que nossa população apresenta uma distribuição de variedades média, com uma certa variedade entre os haplótipos, o que é esperado em uma população miscigenada, como a brasileira.

Gráfico 4 – Representação gráfica das diferenças par a par observadas nas sequências das regiões hipervariáveis do mtDNA na população de DM1 no Brasil.

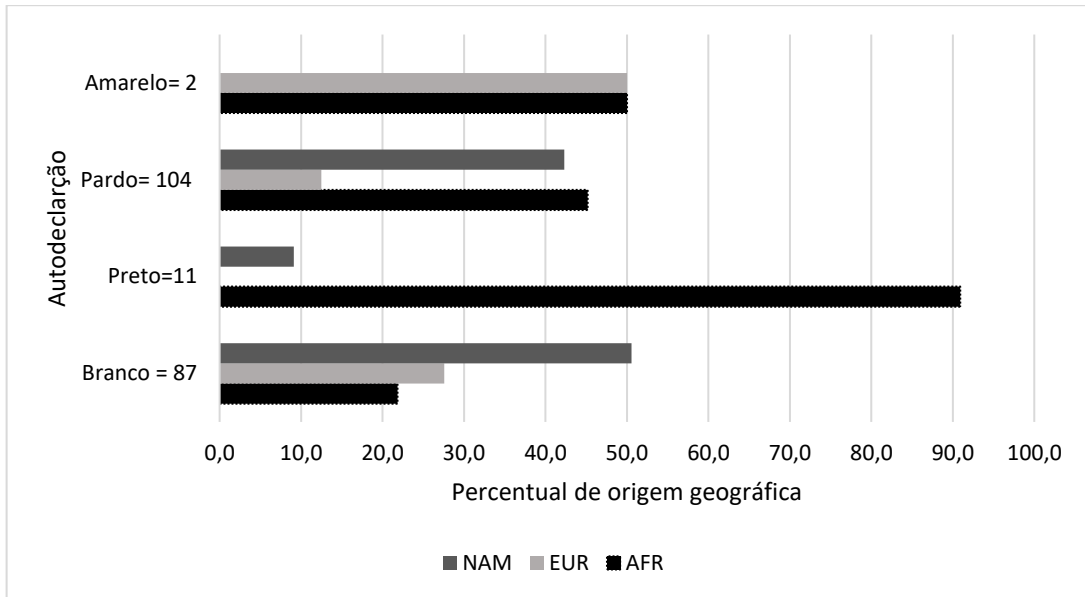


4.3 Dados de cor autodeclarada e haplogrupos

4.3.1 Dados de cor autodeclarada e haplogrupos em pacientes com DM1

Visando entender se existe alguma correlação entre a cor autodeclarada e os haplogrupos de ancestralidade matrilinear, foi calculado a distribuição das origens geográficas das linhagens matrilineares (África [AFR], Europa [EUR] e Nativo Americana [NAM]) por grupos de cor autodeclarada (branco, preto, pardo e amarelo) nos pacientes com DM1, como indicado no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Distribuição da origem ancestral matrilinear por grupos de cor autodeclarada em pacientes com DM1.



Legenda: NAM: Nativo Americano; EUR: Europeu; AFR: Africano

Dentro do universo de 87 pacientes que se autodeclararam brancos, 21,8% possuem a ancestralidade matrilinear de origem africana, 27,6% europeia e 50,6% nativa americana. Já os 11 pacientes que se autodeclararam negros, 90,9% possuem a ancestralidade matrilinear de origem africana e 9,1% nativa americana, sendo que nenhum possuía mtDNA de origem europeia. Os que se autodeclararam como pardos foram 104, sendo 45,2% com mtDNA de origem africana, 12,5% de origem europeia e 42,3% de origem ameríndia. Apenas dois pacientes se autodeclararam como amarelos, e 50% obtiveram mtDNA de origem africana e 50% de origem europeia. O teste ANOVA foi utilizado para validar nossa hipótese, foi obtido um p não significativo de $p < 0,0513$; ou seja, quando se estratifica nossa população diabética por autodeclaração, não é significativo quanto a sua origem ancestral, porém sugere uma tendência.

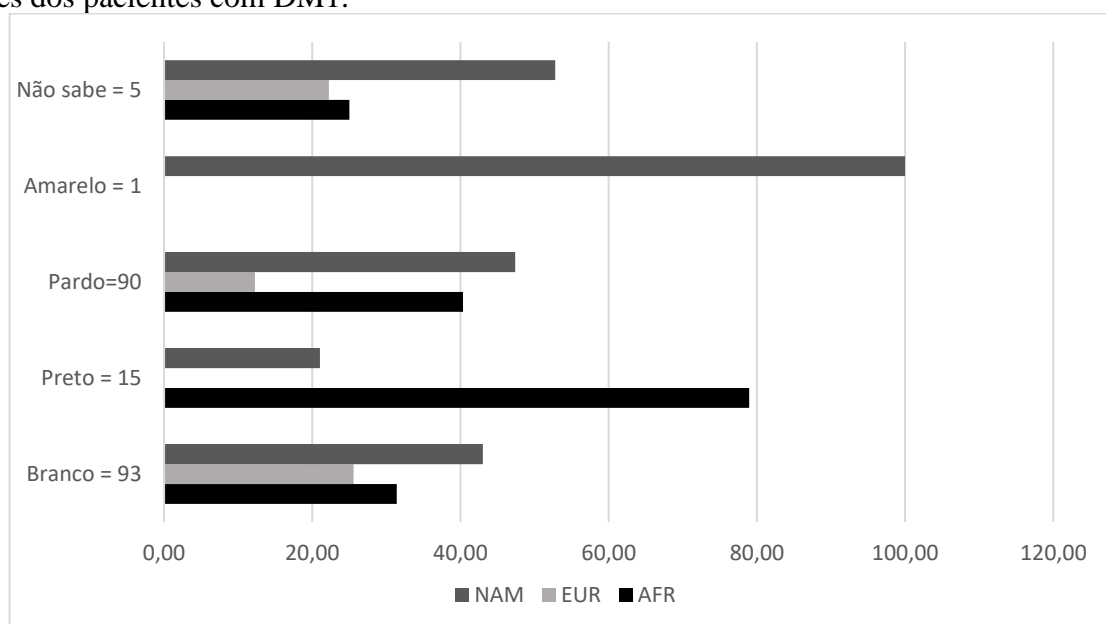
É observado então um maior número de pacientes com ancestralidade matrilinear de origem nativa. Dentro da autodeclaração, os que se autodeclararam brancos possuem a ancestralidade matrilinear predominantemente ameríndia; os com autodeclaração parda possuem uma maior frequência de origem africana, porém com uma distribuição similar com a origem ameríndia; os autodeclarados negros possuem a origem geográfica de seus haplogrupos em maior frequência africana; e o autodeclarado amarelo possui a mesma frequência entre a origem europeia e africana.

4.3.2 Cor autodeclarada nas mães e avós maternas dos pacientes de DM1 e haplogrupos

A ancestralidade referente ao mtDNA é uma herança materna. Dessa forma, a luz de buscar informações sobre a origem ancestral da nossa população diabética, também foi avaliada a distribuição da origem geográfica matrilinear (África [AFR], Europa [EUR] e Nativo Americana [NAM]) por grupos de cor autodeclarada (branco, preto, pardo e amarelo) em mães e avós maternas dos pacientes com DM1.

A heteroidentificação dos pais e avós foi realizada pelos pacientes. Sendo assim, 93 pacientes declararam que sua mãe era branca; 15 preta; 90 parda e 1 amarela. Além disso, cinco pacientes não sabiam classificar a cor de sua mãe. Quando se avalia a distribuição da origem geográfica dos haplogrupos por grupos de cor referida, no grupo classificado como branco, temos 27,96% com haplogrupo de origem africano, 29,03% com origem europeia e 43,01% de origem ameríndia. No grupo classificado como preto, 86,67% possuem origem africana e 13,33% de origem ameríndia. Já o grupo de pardos, 42,22% pertencem aos haplogrupos de origem africana, 10% de origem europeia e 47,48% de origem ameríndia. Um único indivíduo classificou sua mãe como sendo amarela, e seu haplogrupo corresponde ao de origem ameríndia. Já no grupo dos que não sabiam classificar a cor de seus parentes, 20% eram africanos e europeus, enquanto os outros 60% eram de origem ameríndia (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Distribuição da origem ancestral matrilinear por grupos de heteroidentificação em mães dos pacientes com DM1.



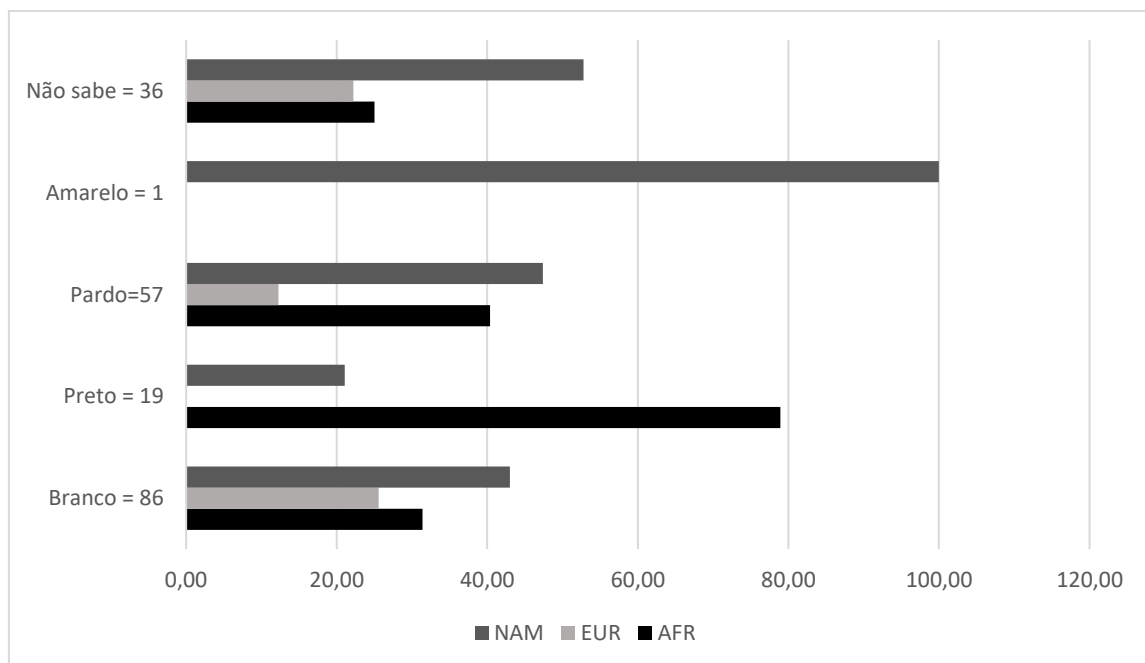
Legenda: NAM: Nativo Americano; EUR: Europeu; AFR: Africano.

Foi realizado o teste de ANOVA para estes resultados, para comparar se há alguma diferença entre as proporções relativas das populações ancestrais. Foi obtido um valor de p significativo, validando nossa hipótese de $p < 0,0436$. Além do ANOVA, foi realizado o teste de Chi-Quadrado, para se avaliar a distribuição esperada dos resultados. Foi obtido um p-value significativo de $p < 0,0002$.

Quando se observa os dados referentes a heteroidentificação de avós, os dados se assemelham aos de heteroidentificação de mães. 86 avós maternas dos pacientes com DM1 foram classificadas como brancas, sendo sua ancestralidade matrilinear composta por 31,4% de origem africana, 25,58% de origem europeia e 43,02% de origem ameríndia. O grupo que foi classificado como preto teve seus haplogrupos com 78,95% de origem africana e 21,05% de origem ameríndia. Os classificados como pardo possuíam seus haplogrupos com 40,35% de origem africana, 12,28% de origem europeia e 47,37% de origem ameríndia. A classificação Amarela teve apenas um representante com o haplogrupo de origem nativa americana. E os que não souberam classificar a cor de suas avós foram 36. Desses, 25% possuíam haplogrupo de origem africana, 22,22% de origem europeia e 52,78% de origem nativa americana (Gráfico 7).

O teste de ANOVA para esta comparação foi significativo ($p = 0,0239$) e o teste de chi-quadrado também significativo com $p < 0,0035$.

Gráfico 7 – Distribuição da origem ancestral matrilinear por grupos de heteroidentificação em avós maternas dos pacientes com DM1



Legenda: NAM: Nativo Americano; EUR: Europeu; AFR: Africano

Assim como nos dados de autodeclaração dos pacientes, a heteroidentificação de suas respectivas mães e avós seguem a mesma tendência. O grupo identificado como branco possui a ancestralidade matrilinear de origem ameríndia; o grupo identificado como negro possui uma maior frequência da origem geográfica africana; pardos também possuem uma frequência semelhante entre origem ameríndia e africana, sendo a primeira a maior, e o indivíduo identificado como amarelo possui a origem geográfica ameríndia.

4.4 Dados de local de nascimento e haplótipos

A população deste estudo apresentou uma distribuição geográfica assimétrica. Dos 204 dados de haplogrupos gerados, 103 eram pertencentes à região Nordeste, 81 da região Sudeste, 13 da região Sul e apenas 7 da região Norte.

A distância genética F_{ST} da população de DM1 foi calculada e por meio do software Arlequin. Os indivíduos foram estratificados de acordo com seu local de nascimento, a fim de responder à pergunta se haveria diferença entre a origem ancestral de acordo com a região geográfica. Com isso, observamos que os valores na parte inferior na Tabela 7 são os resultados de distância, e os valores na parte diagonal superior são os p valor do Teste Exato de Fisher. Após a correção de Bonferroni do p valor, é indicado que não há diferenças entre as populações.

Tabela 7 – Matriz de distância genética F_{ST} e valor de p do Teste Exato de Fisher. A correção de Bonferroni foi aplicada para se ajustar o nível de significância do teste, dividindo o $p < 0,05$ por 6 (6 observações), obtendo um 0,0083.

	DM1_Sudeste	DM1_Nordeste	DM1_Sul	DM1_Norte
DM1_Sudeste	*	0.08583+-0.0030	0.05732+-0.0024	0.43550+-0.0048
DM1_Nordeste	0.00491	*	0.16543+-0.0040	0.70656+-0.0044
DM1_Sul	0.02343	0.01207	*	0.10553+-0.0032
DM1_Norte	-0.00063	-0.01588	0.04725	*

A fim de se investigar se há diferenças estatísticas entre a ancestralidade matrilinear de pacientes diabéticos e a população controle saudável brasileira, foi realizado o Teste Exato de diferenciação de amostras baseado nas frequências de haplótipos. A população diabética e controle foram divididas por local de nascimento e ancestralidade matrilinear. Não foi observado nenhuma diferença significativa entre as frequências de haplótipos encontrados nos

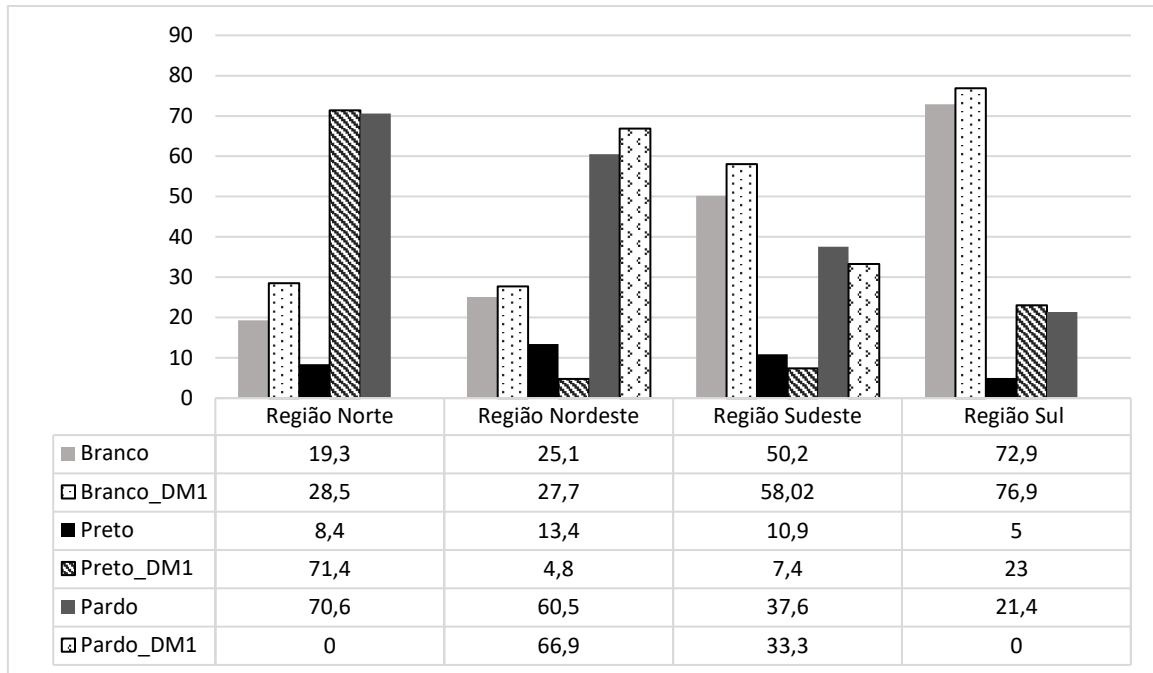
dois trabalhos para cada região geográfica do Brasil para haplótipos de origem ameríndia e africana. Contudo, para os haplótipos de origem europeia, quando comparados as regiões Nordeste e Sudeste deste presente trabalho com o estudo de Alves-Silva *et al.* (2000), é observado um p significativo de 0.00129+-0.0003 e 0.03166+-0.0035 respectivamente.

4.5 Comparação dos pacientes com DM1 com dados publicados da população brasileira

De acordo com o último PNAD Contínua divulgado pelo IBGE em relação ao quarto trimestre de 2022, a população brasileira era composta por 42,9% de brancos, 10,4% pretos e 45,6% pardos. Segundo o IBGE, desde 30 de novembro de 2021, as estimativas do PNAD Contínua passaram a serem divulgadas com base em um novo método de ponderação, onde declaração de indígenas, amarelas ou sem declaração constam apenas dentro da categoria “Total”. Sendo assim, 1,1% da população brasileira se identifica como sendo indígena, amarelas ou sem declaração (IBGE, 2022).

Quando estratificamos a cor autodeclarada por região geográfica, Região Norte, 19,3% da população se autodeclarava branca, 8,4% preta e 70,6% parda; na Região Nordeste 25,1% se autodeclararam branca, 13,4% preta e 60,5% pardo. Na região Sudeste a proporção de etnia autodeclarada foi de 50,2% para população branca, 10,9% preta e 37,6% parda. Já na Região Sul, é observado 72,9% de autodeclarações para cor branca, 5,0% para preta, e 21,4% da população parda, enquanto a Região Centro-Oeste teve sua população em 36,3% branca, 9,5% preta e 53% parda (Gráfico 8) (IBGE, 2022).

Gráfico 8 – Cor ou raça autodeclarada na população brasileira e população diabética brasileira, estratificada por regiões demográficas (Norte, Nordeste, Sul e Sudeste), segundo último dado publicado pelo PNAD Contínuo (referente ao 4 trimestre de 2022).



Cardena e colaboradores, (2013) analisaram 492 voluntários que fazem parte do programa de saúde do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), na região sudeste do Brasil, dos quais 46,3% (n = 228) apresentaram mtDNA africano; o restante foi distribuído quase uniformemente entre mtDNA ameríndio e europeu, 28,7% (n = 141) e 25% (n = 123), respectivamente, conforme exposto na Tabela 8.

Tabela 8 – Frequência entre etnias autodeclaradas e origem geográfica (Africano, Ameríndio e Europeu) para a população de São Paulo.

Variáveis	Total (n= 492) Etnias autodeclaradas						
		Branco	Pardo	Preto	Amarelo	Indígena	
		N = 367	N = 68	N = 51	N = 5	N = 1	
mtDNA	Africano	228 (46,3)	138 (37,6)	47 (69,1)	41 (80,4)	1 (20,0)	1 (100)
	Ameríndio	141 (28,7)	116 (31,6)	17 (25,0)	6 (11,8)	2 (40,0)	-
	Europeu	123 (25,0)	113 (30,8)	4 (5,9)	4 (7,8)	2 (40,0)	-

Neste estudo, a fim de comparar a frequência haplotípica e distância genética entre os indivíduos das diferentes regiões geográficas dos nossos resultados de pacientes com DM1 e demais indivíduos saudáveis do Brasil, foram utilizados dados já publicados de outros autores, como indicado no Quadro 5.

Para as comparações de frequência haplotípica, foram utilizados estudos das quatro regiões demográficas: Norte - Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Tocantins (NOGUEIRA ., 2017). Sudeste - São Paulo (CARDENA ., 2013); Espírito Santo (DOS REIS , 2019 e SANCHES ., 2013); - Rio de Janeiro (SIMÃO ., 2018) e o Sudeste como um todo (FRIDMAN ., 2014). Nordeste – Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia (SCHANN ., 2017) e Sul - Santa Catarina (PALENCIA ., 2010) e Paraná (POLETTI ., 2019), Além do trabalho de Alves-Silva *et al.*, (2000), que abrange indivíduos do Brasil das quatro regiões demográficas. Já para comparações de distância genética, foram utilizados apenas os dados disponíveis de haplótipos do Sudeste e Sul. A população de DM1 e controle foram estratificada pela região demográfica.

Quadro 5 – Estudos das quatro regiões brasileiras utilizados para comparação de distância genética e frequência haplotípica.

REGIÃO	POPULAÇÃO	REFERÊNCIA
BRASIL	Amazonas, Pará, Rondônia, Acre, Pernambuco, Minas Gerais e Paraná	Alves-Silva <i>et al.</i> , 2000
NORTE	Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Tocantins	Nogueira <i>et al.</i> , 2017
NORDESTE	Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia	Schaan ., 2017
SUDESTE	São Paulo (SP)	Cardena ., 2013
	Espírito Santo	Sanches, 2013
	Espírito Santo	Dos Reis <i>et al.</i> , 2019
	Sudeste	Fridman <i>et al.</i> , 2014
	Rio de Janeiro (RJ)	Simão <i>et al.</i> , 2018
SUL	Santa Catarina	Palencia ., 2010
	Paraná	Poletto <i>et al.</i> , 2019

Para o cálculo da matriz de distância genética (FST), os indivíduos com DM1 foram estratificados pelo seu local de nascimento (DM1_Sudeste; DM1_Sul; DM1_Norte e DM1_Nordeste), enquanto os dados da literatura foram reunidos nos grupos Sudeste_Brasil e Sul_Brasil. Na Tabela 9 podemos observar o resultado, em que os valores de distância se encontram na diagonal inferior, enquanto os valores de p do Teste de Fisher estão na diagonal superior. A correção de Bonferroni foi aplicada, dividindo o valor de $p < 0,05$ por 20, indicando que as populações do Sudeste brasileiro apresentam diferenças com as populações de DM1 do Sudeste e Nordeste, enquanto a população do Sul possuem diferenças com as populações de DM1 do Sudeste e Nordeste.

Tabela 9 – Matriz de distância genética FST e valor de p do Teste Exato de Fisher. A correção de Bonferroni foi aplicada para se ajustar o nível de significância do teste, dividindo o $p < 0,05$ por 20 (20 observações), obtendo um 0,0025.

	Brasil_Sudeste	Brasil_Sul	DM1_Sudeste	DM1_Sul	DM1_Nordeste	DM1_Norte
Brasil_Sudeste	*	0.00010+- 0.0001	0.00040+- 0.0002	0.27562+- 0.0045	0.00000+- 0.0000	0.04930+- 0.0020
Brasil_Sul	0.00733	*	0.00000+- 0.0000	0.75052+- 0.0042	0.00000+- 0.0000	0.05831+- 0.0023
DM1_Sudeste	0.01288	0.02753	*	0.06356+- 0.0023	0.09088+- 0.0029	0.43986+- 0.0045
DM1_Sul	0.00519	-0.00889	0.02278	*	0.15810+- 0.0035	0.10959+- 0.0031
DM1_Nordeste	0.01718	0.02118	0.00487	0.01207	*	0.70864+- 0.0044
DM1_Norte	0.04429	0.04207	-0.00111	0.04725	-0.01588	*

5 DISCUSSÃO

Até o momento não existe nenhum outro estudo acerca do mtDNA de pacientes com DM1 no Brasil. Dessa forma, a fim de comparar nossa população e identificar o componente ancestral dos pacientes, neste trabalho iremos discutir a origem matrilinear de indivíduos com DM1 com indivíduos saudáveis das diversas regiões geográficas do Brasil.

O Brasil possui uma alta diversidade genética em sua população, resultado de cruzamentos interétnicos, até o fim o século XIX, entre três povos de origens geográficas distintas. Os dados obtidos do sequenciamento da região hipervariável do mtDNA de pacientes diabéticos nos revela uma alta diversidade haplotípica e a coexistência das três linhagens matrilineares: ameríndia, africana e europeia. Os haplogrupos de origem ameríndia e africana foram os mais frequentes, o que concorda com estudos de mtDNA no Brasil e a história da colonização (POLETTTO et al., 2019; SOUZA, 2019 e PENA, 2020)

5.1 Caracterização da diversidade haplotípica na população DM1 e brasileira

Alves-Silva e colaboradores, (2000) obtiveram dados de 247 amostras das quatro regiões geográficas do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul); em que 99 indivíduos eram do Sudeste, 50 da região Sul; 48 do Norte e 50 da região Nordeste. O autor descreve que a população brasileira é composta por 33% de indivíduos com origem matrilinear ameríndia, 39% europeia e 28% africana. Nossos dados diferem do estudo de Alves-Silva, o que pode ser explicado por um viés amostral. Enquanto neste estudo, trabalhamos com amostras de pacientes diabéticos que fazem tratamento em ambulatórios e serviços de saúde pública; Alves-Silva utilizou amostras de brasileiros brancos de classe média e alta, sendo então esperado uma maior contribuição de mtDNA europeu (ALVES-SILVA, ., 2000).

A população diabética apresentou uma alta diversidade de haplogrupos, conforme visto no Gráfico 4. O resultado encontrado apresenta uma distribuição mediana das diferenças par a par entre as sequências. Ou seja, demonstra que nossa população apresenta uma distribuição de variedades média, com uma certa variedade entre os haplótipos, o que é esperado em uma população miscigenada, como a brasileira.

Dos 204 haplótipos gerados, 190 eram únicos, alocados em 89 haplogrupos ameríndios, 78 africanos e 37 europeus. Porém, a frequência dos haplogrupos variou conforme a região analisada, sendo a região Norte e Nordeste mais predominante as linhagens de mtDNA de

ascendência ameríndia, já a ascendência europeia foi superior na região Sul e a região Sudeste apresentando uma distribuição semelhante entre africanos e ameríndios. Neste aspecto, nosso trabalho também destoa de Alves-Silva, que encontrou uma maior frequência de haplogrupos de africanos na região Nordeste (ALVES-SILVA, ., 2000).

Alves-Silva e colaboradores, (2000) encontraram os principais haplótipos fundadores dos haplogrupos nativo americanos (A-D) presentes no Brasil, sendo os haplogrupos A, C e D identificados em tribos Guarani. Dos haplogrupos mais frequentes, dentro da fração ameríndia, o A é o predominante para a população brasileira, seguido pelo haplogrupo B, C e D por último. No nosso trabalho, o haplogrupo de origem ameríndia mais comum foi o C (34 haplótipos), seguidos por A, B e D (ALVES-SILVA, ., 2000 e POLETTO et al., 2019).

Os haplogrupos L3e e L1c juntos constituem aproximadamente metade (49%) da fração africana, e, segundo o autor, estão em frequência menor em relação à África Ocidental; enquanto L3d e L1b, que são específicos da África Ocidental, juntos ocorrem à uma frequência de 10% na população brasileira. Na população diabética, os haplogrupos L3e e L1c aparecem em 42% da fração africana, enquanto as frações L3d e L1b aparecem em aproximadamente 13%. Com isso, é sugerido que a maioria das linhagens de mtDNA africanos no Brasil tiveram sua origem a partir da África Central (ALVES-SILVA, ., 2000).

A maioria dos haplótipos da fração europeia correspondem, em muitos casos, a linhagens de mtDNA da Península Ibérica. Porém, Alves-Silva encontraram em seus resultado, sequências para as quais não se poderia prever a ascendência do sudoeste da Europa, como é o caso do haplótipo U5b1, de origem do Norte da Escandinávia. Na população diabética, os haplogrupos U (U3, U4 U5 e U6), que são mais frequentes na população Eurásia aparecem em 21% dentro da fração europeia, sendo o haplogrupo U5a1 o mais comum (37,5%) (ALVES-SILVA, ., 2000 e Eupedia.com).

Alves-Silva e colaboradores, 2000, mesmo com uma população aleatória de brancos pertencentes a classe média alta, revelou uma contribuição matrilinear surpreendentemente alta de ameríndios e africanos. Isso demonstra que, os brasileiros, ainda carregam a marca genética da fase inicial da colonização. Nossos dados para população diabética brasileira confirma este resultado de Alves-Silva e colaboradores, corroborando para os dados históricos de miscigenação na população brasileira (ALVES-SILVA, ., 2000).

A partir das análises do Teste Exato de diferenciação de amostras baseado nas frequências de haplótipos, as maiores diferenças observadas foram na frequência elevada dos haplogrupos J e R (29% cada) na população diabética na Região Nordeste, ao passo que na população controle estes mesmos haplogrupos aparecem nas frequências de 6% e 0%

respectivamente. Outra diferença marcante, é a frequência de 64% do haplogrupo H na população saudável, enquanto na população diabética aparece em uma frequência de 7%.

Na população diabética do Sudeste, também é encontrada diferenças significativas entre os haplogrupos J e R, além do haplogrupo W, quando comparada com a população controle. Na população diabética, a frequência do haplogrupo J, R e W aparecem como 23%, 15% e 8%, enquanto na população controle está numa frequência de 3%, 0% e 0%.

O haplogrupo H, encontrado em maior frequência na população do sudeste de Alves-Silva é o haplogrupo de longe o mais comum na Europa. Apesar disso, aparece apenas em uma frequência de 7% da nossa população diabética. É descrito na literatura que o haplogrupo R apresenta uma maior frequência dos países da Europa Oriental, assim como o haplogrupo W, presente particularmente comum na metade oriental da Europa, no norte do Cáucaso. Já o haplogrupo J apresenta uma distribuição relativamente uniforme em toda Europa, sendo encontrado com uma maior frequência na Cornualha (20%), País de Gales (15%), Islândia (14%) e Dinamarca (13,5%) (ACHILLI et al., 2004; ALI et al., 2020 e EUPEDIA, 2022).

5.2 Caracterização dos haplogrupos na população DM1 e brasileira por regiões demográficas

Quando estratificamos a população diabética por região de local de nascimento, observamos um padrão distinto das frequências haplotípicas e suas origens geográficas. Nessa sessão iremos abordar essas diferenças com base em estudos de populações brasileira saudáveis encontrados na literatura, como é observado no Apêndice B.

5.2.1 Região Sudeste

Dentre as linhagens de origem africana, Fridman *et al.*, encontrou uma ancestralidade matrilinear africana de 35,2% para populações do Sudeste, enquanto nosso estudo, a região Sudeste apresentou uma ancestralidade matrilinear africana superior (43,2%). O haplogrupo mais comuns encontrada por Sanches e colaboradores no estado do Espírito Santo foram as pertencentes ao haplogrupo L3 (34,9%), sendo o subhaplogrupos L3e o mais encontrado (46,5%). Já na população do Rio de Janeiro, Simão encontrou os subhaplogrupos L1c e L3e, representando aproximadamente 40% dos haplogrupos L. Já no nosso estudo, na região Sudeste, os haplogrupos L1 e L3 apresentaram a mesma frequência (31,4 cada), sendo o

subhaplogrupos L1b1a+189 o mais encontrado (18,1%); enquanto o subhaplogrupos L3e2b+152 o mais frequente (18,1%) (SANCHES *et al.*, 2013; FRIDMAN *et al.*, 2014 e SIMÃO *et al.*, 2018).

A população africana trazida ao Brasil veio principalmente de três regiões: África Centro-Oeste, África Sudoeste e Sudeste da África. Os haplogrupos L1 e L3 encontrados em nosso trabalho são mais frequentes e diversos na África Ocidental e Central, sendo a Etiópia representada por seis linhagens L1b, sendo o subhaplogrupos L1b1a espalhada por etíopes e núbios. Fendt e colaboradores também encontraram o subhaplogrupos L1b1a numa frequência de 4,19% na população ganense, situada na África Ocidental. Já o haplogrupos L3e são encontrados mais frequentes em Angola e Moçambique, em que L3e2 parece ser mais setentrional e ter se espalhado para a África Ocidental, onde predomina o subclado derivado L3e2b (KIVISILD *et al.*, 2004; SALAS *et al.*, 2004 FENDT *et al.*, 2012; e SIMÃO *et al.*, 2018).

Em seu trabalho, Fridman e colaboradores descrevem a composição genética de origem europeia para a região do Sudeste como 27,6%. As amostras do Espírito Santo de origem europeia apresentaram uma maior frequência do haplogrupos H (33,4%) e a menos frequente foi o haplogrupos J (3%). Em nosso trabalho, o haplogrupos H também foi o mais frequente (28,5%), sendo o subhaplogrupos H3 o mais encontrado (40%), enquanto, diferente de Sanches, o haplogrupos J foi o segundo mais frequente (21,4%). Segundo Hernández e colaboradores, 2017, o haplogrupos H3 é característico da região da Península Ibérica, enquanto J1 é comum nas populações da Eurásia Ocidental (SANCHES *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ *et al.*, 2017 e STROBBE *et al.*, 2018).

Já para os haplogrupos de origem nativa americana, a população do Espírito Santo possui uma frequência de 30,4% para os haplogrupos A e C; no estado do Rio de Janeiro a maior frequência pertence ao haplogrupos B (38%). No trabalho publicado por Fridman sobre o mtDNA da região Sudeste, os haplogrupos ameríndios apresentavam uma frequência de 35,2%. No nosso estudo, a frequência de origem ameríndia é similar nestes dois trabalhos, com 39,5% da população do Sudeste apresentando haplogrupos de origem ameríndia, sendo o haplogrupos A o mais comum na região Sudeste (37,5%) (SANCHES, *et al.*, 2013; FRIDMAN *et al.*, 2014 e SIMÃO *et al.*, 2018).

Essa diversidade da frequência de haplótipos na região Sudeste pode ser explicada pelas diferenças na colonização dessa região. Minas Gerais está relacionada fortemente ao Ciclo do Ouro no século XVIII, com a entrada massiva de escravos trazidos da África para trabalhar nas minas. O Rio de Janeiro foi o principal destino de escravos no Brasil até a metade do século

XIX. Já o estado de São Paulo possui uma das populações mais miscigenadas do país, devido à entrada de colonos europeus que ali se fixaram, formando os primeiros assentamentos e se reproduzindo com mulheres indígenas e ameríndias. Mais tarde, o estado de São Paulo recebeu ainda migrantes das regiões Norte e Nordeste, que trouxeram consigo a ancestralidade matrilinear de ameríndios e africanos encontrados em grande número nessas regiões (FRIDMAN *et al.*, 2014).

5.2.2 Região Sul

A Região Sul foi a última região costeira brasileira a ser povoada durante o período colonial, tendo um influxo de colonos europeus significativamente maior que as outras regiões nacionais. Inicialmente tivemos a chegada de ibéricos (principalmente os provenientes dos Açores e outras áreas insulares de Espanha e Portugal), juntamente com os africanos trazidos como escravos, que se uniram aos povos indígenas nativos. Políticas governamentais de incentivo de ocupação territorial levaram a um extenso processo migratório, principalmente de alemães, italianos e poloneses, que ocorreu do início do século XIX até meados do século XX (ÁVILA *et al.*, 2022).

Palência e colaboradores (2010) encontraram uma alta diversidade de sequências para a região controle do mtDNA ($H = 0,9930 \pm 0,0035$), implicando que na população analisada de Santa Catarina os dados podem ser muito informativos em termos de identificação genética forense. Esses dados são corroborados pelo alto valor para poder de discriminação (0,9806) (PALÊNCIA *et al.*, 2010)

A caracterização dos haplogrupos do mtDNA na população catarinense revela frequências de haplogrupos europeus notavelmente mais altas do que a frequência geral encontradas para a população de DM1. Os haplogrupos mais frequentes encontrados por Palência *et al.*, foram o H (27,5%), seguidos dos haplogrupos B, C e T (8,8% cada). Ao todo, a diversidade haplotípica de Santa Catarina revela uma ancestralidade matrilinear de 63,8% europeia, o que condiz com os dados históricos de colonização dessa região, que recebeu um maior fluxo de imigrantes italianos, alemães e portugueses. Nossos dados de DM1 apresentam uma frequência semelhante de haplogrupos de origem europeia (61,5%), o que corrobora com os dados de Palência (PALÊNCIA *et al.*, 2010).

No estado do Paraná, 38,5% da população apresentava haplótipos relacionados ao componente europeu. A prevalência do grupo H, assim como em Santa Catarina concorda com as descrições das linhagens europeias no Brasil, sendo o mais frequente (11,5%). Em nosso

trabalho, o haplogrupo T foi o mais frequente em nossa população da região Sul (23%), o que pode ser explicado pela entrada de imigrantes de outras partes da Europa, caracterizando uma alta diversidade populacional nesta região (POLETTTO *et al.*, 2019).

Em Santa Catarina, os haplogrupos indígenas aparecem bem representados, com uma frequência total de 21,3%, praticamente idêntica à estimada por Alves-Silva (22%). Já na população paranaense é observado uma prevalência de 49,2% de linhagens mitocondriais ameríndias. Observou-se a coexistência dos haplogrupos B e C (15,6% cada) com as maiores frequências, seguidos dos haplogrupos A (13,9%) e D (4,1%). Essa diferença entre a população de Santa Catarina e Paraná pode ser explicada pela história de colonização de cada estado, sendo na população paranaense formada por acasalamento direcional entre o homem europeu e a mulher ameríndia. Para a população geral da região Sul, nosso trabalho revela uma frequência de 30% de ancestralidade matrilinear ameríndia. Contudo, este resultado pode estar enviesado, devido ao nosso baixo N amostral. (ALVES-SILVA, 2000; PALÊNCIA *et al.*, 2010 e POLETTTO *et al.*, 2019).

Em seu trabalho, Alves-Silva e cols demonstraram que a proporção de ancestralidade nativa americana para o Sul do Brasil está ligeiramente inferior quando comparada às outras regiões. Isso pode ser explicado pela entrada de novos haplogrupos causados pelo intenso fluxo gênico associado à migração europeia para esta região, levando à dispersão das linhagens nativas a uma notável redução de suas frequências (ALVES-SILVA, 2000; PALÊNCIA *et al.*, 2010).

Segundo Palência e colaboradores (2010), os haplogrupos africanos L0, L1, L2 e L3 também foram relativamente comuns em Santa Catarina (15,0%). A frequência de haplogrupos africanos em brasileiros catarinenses foi menor do que na população brasileira como um todo (28,0%), mas semelhante à estimada para todo o Sul do país (12,0%). No estudo de Poletto *et al.*, também foi encontrado uma frequência de 12,3% de linhagens africanas. Em nosso estudo, foi identificado apenas um haplogrupo de origem africana (L2b2a), determinando uma frequência de 7%, sendo menor à estimada para o Sul do país (ALVES-SILVA, 2000; PALÊNCIA *et al.*, 2010).

5.2.3 Região Nordeste

O Nordeste brasileiro, apesar de ser uma região importante em termos de imigração e miscigenação étnica, possui poucas informações sobre a composição do mtDNA de sua população. Schaan *et al.*, investigaram 550 indivíduos de oito estados do Nordeste (Piauí,

Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), sequenciamento o mtDNA da região hipervariáveis I, II e III do mtDNA. (SCHAAN *et al.*, 2017).

Os dados de Schaan *et al.*, mostram uma ancestralidade mitocondrial ameríndia mais frequente na população nordestina, representando 43,5% dos indivíduos, seguidas pela africana com 37,8%; europeia 16,6% e asiática não ameríndia 2,1%. Esses dados vão de encontro ao nosso, em que a ancestralidade matrilinear de origem ameríndia representa 46,6%, africana 38,8% e europeia 14,5%. Não foi encontrada linhagem de origem asiática. A maioria dos nossos dados de Nordeste são referentes ao estado do Maranhão (83%), estado não representado por Schaan e colaboradores. Apesar disso, nossos resultados são similares, diferindo dos encontrado por Alves-Silva (AFR= 44%; EUR=34%; NAM=22%), que em seu trabalho representou apenas o estado de Pernambuco (ALVES-SILVA, 2000 e SCHAAN *et al.*, 2017).

Schaan *et al.*, 2017 mostram que dos oito estados investigados, cinco possuíam a ancestralidade ameríndia mais prevalentes (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe e Bahia); seguidos da africana, europeia e asiática não ameríndia. Pernambuco e Alagoas apresentaram uma ancestralidade africana de mtDNA como a mais frequente dado compartilhado por Alves-Silva, que também utilizou dados de Pernambuco em seu estudo. Enquanto Paraíba revelou as mesmas frequências para as linhagens de mtDNA ameríndias e africanas (SCHAAN *et al.*, 2017).

Como já foi demonstrado em outros estudos, a distribuição das linhagens de mtDNA no Brasil é heterogênea, devido ao padrão de distribuição dos grupos ancestrais maternos ao longo do território, e explicada pelo processo de colonização brasileira. Apesar da população nativa ter sido dizimada, a predominância de ancestralidade matrilinear encontrada nos revela a importância desse grupo para a formação da população brasileira. No trabalho de Schaan e cols, o haplogrupo mais frequente foi o A, representado por 34,7%. Já nesse presente estudo, o haplogrupo mais encontrado na população nordestina foi o C, numa frequência de 41,6%. Segundo Schaan *et al.*, isso releva a notável presença e resistência do componente ameríndio apesar dos séculos de dizimação drástica da população nativa (SCHAAN *et al.*, 2017).

Em relação às linhagens africanas, a contribuição mais frequente foi do haplogrupo L3 (52,5%), sendo o seu clado L3e o mais comum (65%); o que é consistente com os achados de Schaan *et al.* Considerando que L3e é conhecido por ter altas frequências na África Centro-Oeste, que foi a principal fonte de escravos trazidos ao Brasil durante o período colonial.

Com relação ao componente europeu, a prevalência dos haplogrupos J, R e U tiveram a frequência de 26,6% ambos. Esse dado vai contra os achados de Schaan e colaboradores, que tiveram a sua maioria de haplogrupos de origem europeia representado pelo haplogrupo H.

Assim como no trabalho de Schaan *et al.*, neste trabalho é observado uma diversidade de haplogrupos de origem europeia, o que demonstra as múltiplas origens dos colonizadores brancos, com um destaque para as populações da Europa Ocidental (SCHAAN *et al.*, 2017).

5.2.4 Região Norte

Segundo Alves-Silva e colaboradores, (2000), estudos utilizando mtDNA mostram que a contribuição genética de ameríndias e africanas para a população brasileira do Norte são maiores do que aquelas previamente observadas com base em marcadores (ALVES-SILVA, .., 2000).

O estudo de Nogueira *et al.*, é o único a caracterizar apenas amostras da região Norte. A autora avalia apenas as regiões hipervariável I, II e III de 116 indivíduos dos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Tocantins. Sendo assim, Nogueira (2017), descreve que a ancestralidade africana encontrada em seu trabalho foi de 36,2%; enquanto Alves-Silva mostra uma frequência de 15%, o que difere dos nossos resultado, com haplogrupos na população diabética possuindo uma frequência de apenas 28% (ALVES-SILVA, 2000 e NOGUEIRA *et al.*, 2017).

Neste presente trabalho, a origem ancestral mais frequente na região Norte foi a ameríndia, (71%). Alves-Silva *et al.* encontrou uma frequência de 54% para a região Norte, enquanto Nogueira *et al.* 57,8%. O haplogrupo C foi o predominante entre essa população, representado por 25,9%. Em nosso trabalho, o haplogrupo mais frequente foi o C1b (40%). Já os dados de haplogrupos de origem europeia, no trabalho de Nogueira *et al.*, foi encontrado numa frequência de 6% enquanto de Alves-Silva encontrou frequência diferente de 31%. Neste trabalho, nenhum indivíduo diabético possuía ancestralidade matrilinear europeia. A baixa representatividade de indivíduos do Norte pode explicar esses achados (ALVES-SILVA, 2000 e NOGUEIRA *et al.*, 2017).

5.3 **Cor autodeclarada na população brasileira e pacientes com DM1**

Segundo Reis *et al.*, a autodeclaração é um conceito subjetivo que leva em consideração principalmente características físicas como cor da pele, tipo de cabelo, formato do nariz e lábios. A classificação como Branco, Pardo ou Preto é consistente em 79% das vezes. Diferentes estudos foram realizados para correlacionar genética e ancestralidade autodeclarada em populações brasileiras, e assim como os dados apontados neste trabalho, eles

apontam discrepâncias e recomendam o uso de marcadores genéticos para uma avaliação adequada do fundo genético ancestral de grupos miscigenados (REIS *et al.*, 2019).

Gomes *et al.* mostra em seu estudo que pacientes com DM1 apresentam a etnia branca autorreferida mais prevalentes quando comparadas com as de pardos, pretos e orientais. É relatado que 54,3% de pacientes se autodeclarando brancos, 35,9% como pardo, 7,8% preto, 1,1% oriental e 0,9% como indígena. Além disso, o trabalho também avalia a ancestralidade autossômica destes pacientes, encontrando uma proporção mediana de ancestralidade europeia mais alta em indivíduos diabéticos (67,8%) do quando comparados com controles (56,3%).

Neste trabalho, o recorte encontrado foi 42,6% de autodeclarados brancos, 50,9% pardos, 5,4% pretos e 0,9% oriental. Dessa forma, quando se compara os dados do último censo demográfico do IBGE, 2010, a população brasileira sendo formada por 47,7% de brancos, 7,6 de preto e 43% pardos, 1,1% amarelos e 0,4% de ameríndios. Esses dados podem ser observado no Apêndice A.

Com base nos dados do Apêndice A, a população brasileira possui uma frequência semelhante entre brancos e pardos (47,7 e 43,1), contudo é possível observar que os dados do estudo de Gomes *et al.* indicam uma incidência de DM1 maior em brancos, diferente do que a observada neste trabalho, em que a população parda foi mais representativa. Essa diferença pode indicar que nossa amostragem de diabéticos está enviesada, uma vez que a maior parte dos nossos indivíduos (50,4%) são provenientes da Região Nordeste, região formada com maior proporção de população parda (60,5%).

Segundo Guerreiro-Junior *et al.*, as diferenças observadas na ancestralidade entre e dentro dos grupos étnicos autodeclarados nas regiões brasileiras podem ser divididas entre alguns fatores. O primeiro seria o tipo de classificação empregada para classificar os indivíduos; a autodeclaração e/ou classificação do entrevistador podem estar subjetivas. Outro ponto são os distintos padrões de miscigenação que ocorreram em cada região; e somando a isso, as práticas sociais de cada local. Sendo assim, Guerreiro-Junior e colaboradores corroboram com os dados de que há uma notável heterogeneidade no padrão de miscigenação dentro e entre os grupos no Brasil, devido à complexidade dos padrões passados e presentes de acasalamento em uma sociedade multiétnica, além da relativa instabilidade das classificações fenotípicas no Brasil (GUERREIRO-JUNIOR *et al.*, 2009).

Cardena e colaboradores, (2013) analisaram 492 voluntários que fazem parte do programa de saúde do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), na região Sudeste do Brasil. 46,3% (n = 228) apresentaram mtDNA africano; o

restante foi distribuído quase uniformemente entre mtDNA ameríndio e europeu, 28,7% (n = 141) e 25% (n = 123), respectivamente.

Assim como este presente estudo, Cardena e colaboradores, (2013), compararam os dados referentes a autodeclaração com os dados de mtDNA, é possível observar que indivíduos que se autodeclararam brancos, 37,6% possuíam mtDNA africano; com os demais se distribuindo igualmente entre mtDNA ameríndio e europeu (31,6% e 30,8% respectivamente). Nossos dados referentes à região Sudeste revelam 47 indivíduos se autodeclarando brancos, sendo 25,5% possuindo mtDNA de origem europeia; 27,6% de origem africana e 46,8% de origem nativa, o que difere da autora (CARDENA *et al.*, 2013).

Dos indivíduos que se autodeclararam pretos e pardos, 80,4% e 69,1% respectivamente tinham mtDNA africano. Já os indivíduos que se autodeclararam pardos, 25% possuíam mtDNA ameríndio. E os indivíduos que se autodeclararam amarelos tinham mtDNA ameríndio e europeu (40% cada um). E o indivíduo que se autodeclarou indígena possuía mtDNA africano. Para a região Sudeste, nosso trabalho não apresentou nenhum indivíduo que se autodeclarou preto, amarelo ou indígena. Contudo, dentro do universo de autodeclarados pardos, 100% possuíam o mtDNA de origem nativa americana (CARDENA *et al.*, 2013).

Os censos demográficos são, atualmente, a única fonte de informação nacional sobre a composição étnica da população brasileira. Contudo, segundo Cardena e colaboradores, (2013), existem algumas dúvidas sobre as informações geradas pela autodeclaração da cor da pele. O primeiro ponto é o grande número de termos que existe no Brasil para identificar as variações da cor da pele entre os extremos branca e negro; e o segundo, se dá pela influência de outras variáveis na classificação étnica, como posição social, percepção subjetiva de cor, escolaridade, sexo, idade e variações regionais e culturais (CARDENA *et al.*, 2013).

Em relação à análise do mtDNA, nossos resultados mostraram que 43,2% da população da Região Sudeste possuía mtDNA de origem africana, sendo que destes, 37,1% se autodeclararam brancos. Esses dados são semelhantes aos encontrados por Cardena e cols, que ao avaliar o mtDNA de indivíduos autodeclarados brancos da Região Sudeste, 37,6% possuíam mtDNA de origem africana. Com isso, é possível concluir que a autodeclaração da cor da pele não está completamente relacionada à ancestralidade matrilinear na população do Sudeste brasileiro (CARDENA *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

- a. A diversidade molecular referente aos dados de mtDNA do Brasil encontrada dentro dos pacientes diabéticos apresentou valores altos. Esses dados estão relacionados com a miscigenação da população brasileira, refletida também em um recorte de pacientes com diabetes melitus tipo 1, em que é relatada incidência maior em indivíduos brancos. Isso reforça a importância de um banco de dados nacional de mtDNA;
- b. Nossos dados demonstram maior contribuição de ancestralidade materna de origem ameríndia, sendo o haplogrupo C o mais comum. Quando estratificamos nossa população estudada por regiões, em todas as regiões demográficas a ancestralidade ameríndia foi a mais frequente, exceto a Região Sudeste, que apresentou uma maior frequência de haplogrupos africanos;
- c. Em relação à cor autodeclarada, é possível concluir que em pacientes com DM1, não se observou relação entre a cor autodeclarada e a origem matrilinear dos pacientes. Isso pode ser explicado devido ao acasalamento assimétrico que ocorreu nas diferentes regiões brasileiras entre homens europeus e mulheres ameríndias e africanas.
- d. Em relação à ancestralidade matrilinear dos pacientes com DM1, a maior contribuição é da origem ameríndia, seguida da africana e por última a europeia. Esses dados vão de encontro com o observado na população brasileira num geral. Porém nossos dados são diferentes do que é observado na ancestralidade autossômica para os pacientes com DM1, que possuem uma frequência maior de ancestralidade europeia. Com isso, é possível inferir que a ancestralidade matrilinear não é a responsável por carrear padrões genéticos em perfil da doença.

REFERÊNCIAS

- ALEOTTI J. V. D.; *et al.*, O uso de inibidores de SGLT 2 no Diabetes Mellitus tipo 1. Monografia para o curso de Medicina. Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Maringá. 2020.
- ALMEIDA, M. R. C., A atuação dos indígenas na História do Brasil: revisões historiográficas. *Rev. Bras. Hist.* [online]. 2017, vol. 37, n.75, pp.17-38. Epub Aug 17, 2017
- ALVES-SILVA, J. *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*, v. 67, n. 2, p. 444-61, 2000.
- ANDREWS, R.M. *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, v. 23, n. 2, p.147, 1999.
- AVILA, E., P. A. *et al.*, Haplotype distribution in a forensic full mtDNA genome database of admixed Southern Brazilians and its association with self-declared ancestry and pigmentation traits. *Forensic Sci Int Genet* 57: 102650. 2022.
- AZULAY, R. S. S.; PORTO, L. C, Silva DA, et al Genetic ancestry inferred from autosomal and Y chromosome markers and HLA genotypes in Type 1 Diabetes from an admixed Brazilian population. *Sci Rep* . 2021; 11 (1): 14157.
- BEHAR, D. M. *et al.* The dawn of human matrilineal diversity. *Am J Hum Genet*. 2008;82(5):1130-1140.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Saúde Suplementar. Diabetes Mellitus: Sintomas, Causas e Tratamento. Disponível em: <http://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/diabetes>. Acesso: 2021.
- BRASIL. Senado Federal. Agência Senado. 19 de abril: povos indígenas lutam por mais visibilidade e valorização. 2023. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/infomaterias/2023/04/19-de-abril-povos-indigenas-lutam-por-mais-visibilidade-e-valorizacao>. Acesso: 2023.
- BRITO COSTA, G. do S. M. de,; Análise dos polimorfismos das regiões hipervariáveis do DNA mitocondrial humano (HV1 e HV2) na população do estado do amapá: aspectos populacionais e forenses. Dissertação para o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. 2019.
- BYBJERG-GRAUHOLM, J. . Distribuição espaço-temporal complexa e ancestralidade genômica de haplogrupos de DNA mitocondrial em 24.216 dinamarqueses. *PloS one* , 13 (12). 2018.
- CARDENA, M. M. S. G, *et al.*, Relação entre a etnia autodeclarada, haplogrupo mitocondrial e ancestralidade genômica em indivíduos do Sudeste brasileiro. *Saúde, Ética & Justiça*. 2013;18(Ed. Especial):62-6.
- COURT, D. S. Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerg Top Life Sci*. 24;5(3):415-426. 2021.

- CHANG, X., Haplogrupos de DNA mitocondrial e suscetibilidade a neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* , 112 (12), 1259–1266. 2020.
- CHOWDHURY, A., S., *et al.* Role of Mitochondrial Nucleic Acid Sensing Pathways in Health and Patho-Physiology. *Front Cell Dev Biol* 10: 796066. 2022.
- DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-86; 1993.
- DIAZ-VALENCIA, P. *et al.* Covariation of the incidence of type 1 diabetes with country characteristics available in public databases. *PLoS One*.10(2):e0118298. 2015.
- DiMARCO, M. (re)Producing mtEve. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 83:101290. 2020.
- DOS REIS, R. S. *et al.* A view of the maternal inheritance of Espírito Santo populations: The contrast between the admixed and Pomeranian descent groups. *Forensic Sci Int Genet*, v. 40, p. 175-181, 2019.
- DUARTE, F. B. Linguistic Diversity in Brazil: the current situation of the amerindian languages. *Caletroscópio*. 2318 – 4574. v. 4. Nº Especial. 2016. Disponível em: <https://periodicos.ufop.br/caletroscopio/article/view/3665/2885>
- DÜR, A. *et al.* Fine-Tuning Phylogenetic Alignment and Haplogrouping of mtDNA Sequences. *Int J Mol Sci.* 22(11):5747. 2021.
- EGITO, A. A., diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação. Tese para o Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. 2007.
- Eupedia: Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups frequencies by country in Europe, the Near East & North Africa. Eupedia, 2023. https://www.eupedia.com/europe/european_mtdna_haplogroups_frequency.shtml , Acesso: 2023.
- FAUSTO, B. História do Brasil cobre um período de mais de quinhentos anos, desde as raízes da colonização portuguesa até nossos dias. 14 ed. – São Paulo: Edusp, 2012. p. 688
- FERREIRA, L.B., *et al.* Y-STR diversity and ethnic admixture in White and Mulatto Brazilian population samples. *Genetics and Molecular Biology* 29; 605-607. 2006.
- FOLEY, R. N., *et al.* End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System. *J Am Soc Nephrol*; 18(10): p. 2644-8. 2007.
- FOSS-FREITAS M. C. *et al.* Neuropatia autonômica: Uma complicação de alto risco no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*; 52(2): 398-406. 2008.
- FRIDMAN, C. *et al.* Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil. *Int J Legal Med*, v. 128, n. 4, p. 589-93, 2014.
- GOMES, L.. Escravidão: do primeiro leilão de cativos em Portugal à morte de Zumbi dos Palmares, volume 1. Rio de Janeiro: Globo Livros, 2019.

- GOMES, M. B; *et al.* Self-reported color-race and genomic ancestry in an admixed population: A contribution of a nationwide survey in patients with type 1 diabetes in Brazil. *Diabetes Res Clin Pract.* 21:140:245-252. 2018.
- GOMES, M. B.; *et al.* Diabetes Tipo 1 No Brasil. 1 ed. - Rio de Janeiro: Clannad, 2019. 428 p.
- GONÇALVES, V. F. *et al.* Identification of Polynesian mtDNA haplogroups in remains of Botocudo Amerindians from Brazil. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(16):6465-6469.
- GONÇALVES, V. F. *et al.* Recovering mitochondrial DNA lineages of extinct Amerindian nations in extant homopatric Brazilian populations. *Investig Genet.* 2010 Dec 1;1(1):13.
- GONTIJO, C. C., Composição genética de duas populações afro-derivadas brasileiras inferidas a partir de marcadores informativos de ancestralidade. Dissertação para o Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília. 2008.
- GUDISEVA, H.V. A associação de haplogrupos de DNA mitocondrial com GPAA em afro-americanos. *Pesquisa experimental do olho* , 181 , 85-89. 2019.
- HAGELBERG, E. *et al.* Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc Biol Sci.* 1999 Mar 7;266(1418):485-92.
- HARARI, Y.N. Sapiens—uma breve história da humanidade. *Trad. de Sapiens—a.* 2015.
- HAYASHI, A. A., *et al.*, **Disbiose intestinal e a relação com a patogênese de doenças autoimunes.** Monografia para o curso de Nutrição. Centro Universitário de Brasília. Brasília. 2020.
- HEFTI, E. *et al.* Mitochondrial DNA heteroplasmy in cardiac tissue from individuals with and without coronary artery disease. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2018;29(4):587-593.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA . Censo Brasileiro de 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Conheça o Brasil – Cor ou Raça. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18319-cor-ou-raca.html>. Acesso: 2021.
- _____Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) 2022. Disponível em: Acesso: 2023.
- KLEIN R. *et al.* The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102(4): p. 520-6.
- LAWLESS, C. *et al.*, The rise and rise of mitochondrial DNA mutations. *Open Biology.* v. 10. 2020.
- LINS, T. C., *et al.* Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *American Journal of Human Biology* 22, 187-192. 2010.
- MANTA, F. S. N., Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLOS ONE* 8(9): e75145. 2013.

MELO, E. C., Entre territórios e terreiros: yorubá, velhos deuses no novo mundo. Dissertação para o Programa de Pós-graduação em Geografia. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.

MIRANDA, R. C., Relevância da informação associada dos segmentos (HVS-1, HVS-2 e HVS-3) da região hipervariável do DNA mitocondrial na determinação de haplogrupos de ancestralidade. Monografia para o curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2017.

MITOMAP. A human mitochondrial genome database. Disponível em: <https://mitomap.org/MITOMAP>. Acesso: 2021.

MOLNAR, M. J.; KOVACS, G. G. Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol*, v. 145, p. 147-155, 2017.

NEGRATO, C. A., *et al.* Increasing incidence of type 1 diabetes between 1986 and 2015 in Bauru, Brazil. *Diabetes Res Clin Pract.* 127:198-204. 2017.

NOGUEIRA, T. L. S. *et al.* mtDNA control region analysis of North Brazilian population. *Forensic Sci Int Genet.*, v. 6, p. e169-e170, 2017.

OSORIO, Rafael Guerreiro. O sistema classificatório de “cor ou raça” do IBGE. *IPEA*: Brasília, novembro de 2003.

PAIM, A., Momentos Decisivos da História do Brasil. São Paulo: Martins Fontes, 2000.

PAIVA, C. *et al.* Publicação crítica do Recenseamento Geral do Império do Brasil de 1872 (Relatório Provisório). Núcleo de Pesquisa em História Econômica e Demográfica -NPHEd. 2012. disponível em: <http://www.nphed.cedeplar.ufmg.br/wp-content/uploads/2013/02/Relatorio_preliminar_1872_site_nphed.pdf>.

PALENCIA, L. *et al.*, Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input. *Int J Legal Med*, v. 124, n. 4, p. 331-6, 2010.

PAYNE, B. A. I. *et al.* Chinnery, Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA, *Human Molecular Genetics*. V. 22, 2, p. 384–390. 2013.

PENA, S. D. J. *et al.* Genetic admixture in Brazil. *Am J Med Genet Part C*. 2020; 184C: 928– 938.

PENA, S. D. J. *et al.* The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. Belo Horizonte, v.6, n. 1 *PLOS ONE*. 2011,

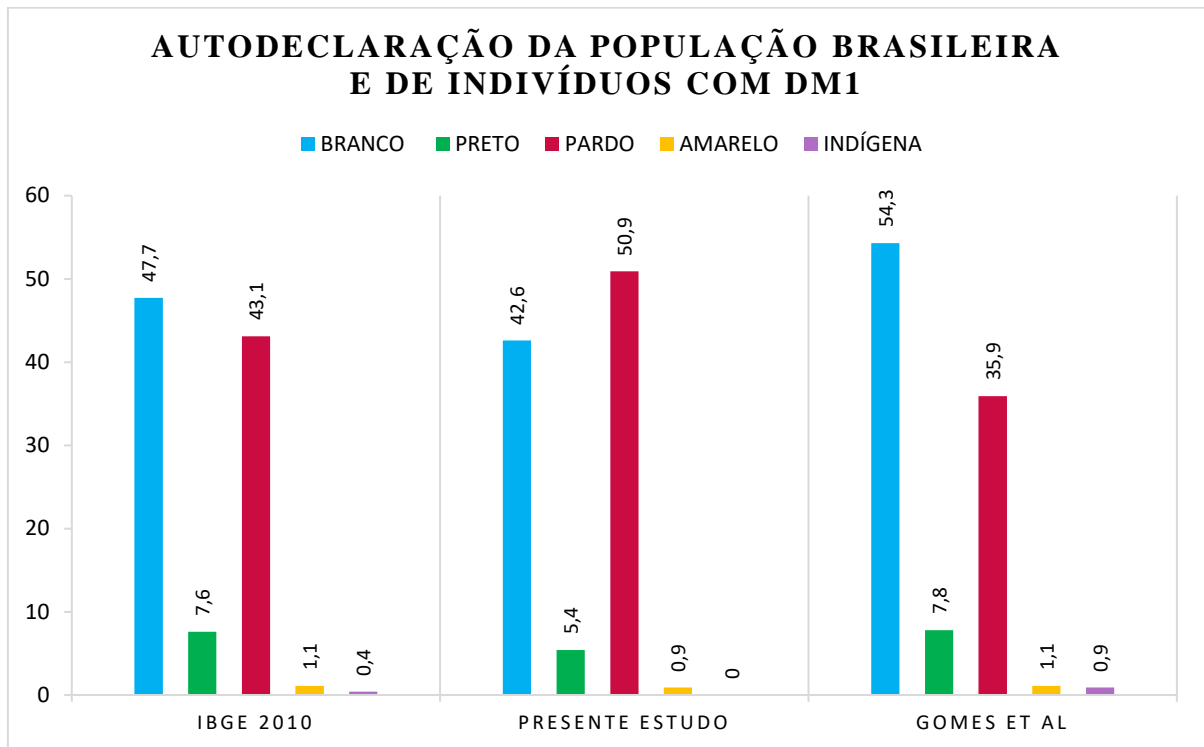
POLETTI, M. M. *et al.* Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Parana state-increasing the Brazilian forensic database. *Int J Legal Med*, v. 133, n. 2, p. 347-351, 2019.

PRADO JÚNIOR, C., História econômica do Brasil, São Paulo, Editora Brasiliense, 26ª ed. 1976.

RAMOS, A., introdução à Antropologia brasileira, 1.º volume – 2.ª ed., Rio de Janeiro, Livraria Editora Casa do Estudante do Brasil, 1951.

- REIS, J.J. A presença negra: encontros e conflitos. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro, 2000.
- RIBEIRO, L. M. P., Yorubás e Malês: conflito e aliança no Brasil escravocrata. São Paulo, n 18 *Revista lusófona de ciência das religiões*. (2013)
- RODENBURG, R. J. Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis*. 34(2):283-92. 2011.
- RODRIGUES, R. N. Os africanos no Brasil [online]. Rio de Janeiro: Centro Edelstein de Pesquisas Sociais, 2010. 303 p. ISBN: 978-85-7982-010-6..
- SALZANO, F. M.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genetics and Molecular Biology*, Rio Grande do Sul, v. 37, n. 1 SUPPL. 1, p. 151–170, 2014.
- SANCHES, N. M. *et al.* Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Espírito Santo state, Brazil. *Mol Biol Rep*, v. 41, p. 6645-6648, 2014.
- SANTOS, H. C.; ., & Brazilian EPIGEN Project Consortium. Um conjunto mínimo de marcadores informativos de ancestralidade para determinar proporções de mistura em uma população americana mista: o conjunto brasileiro. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 24 (5), 725–731. 2016.
- SCHAAN, A. P. *et al.* mtDNA structure: the women who formed the Brazilian Northeast. *BMC Evol Biol*, v. 17, n. 1, p. 185, 2017.
- SIMÃO, F. *et al.* Defining mtDNA origins and population stratification in Rio de Janeiro. *Forensic Sci Int Genet*, v. 34, p. 97-104, 2018.
- Slave Voyages - "Slave Voyages". *Slavevoyages.Org*, 2023, <https://www.slavevoyages.org/>. Acessado em 11 maio 2022.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. O que é diabetes? Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/oque-e-diabetes>. Acesso: 2021.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C., *et al.*, Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.
- VAINFAS, R. História indígena: 500 anos de despovoamento. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro, 2000.
- WALLACE, D. C. *et al.* Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(11):a021220.
- WEI, W. *et al.*, Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity. *Science* 364, 2019.



APÊNDICE A – Distribuição por autodeclaração da população brasileira referentes aos dados do IBGE, e dados de pacientes com DM1 do presente estudo e Gomes *et al.* 2018.



APÊNDICE B – Frequência de ancestralidade matrilinear por Estado ou região demográfica no Brasil para população saudável e população com DM1.

REGIÃO	POPULAÇÃO	N	NAM (%)	AFR (%)	EUR (%)	ASI (%)	REFERÊNCIA
Norte	Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Roraima e Tocantins	116	57,8	36,2	6,0	-	Nogueira <i>et al.</i> , 2017
	DM1	7	71,4	28,5	-	-	Presente estudo
Nordeste	Piauí	174	52,3	36,2	9,8	1,7	Schaan <i>et al.</i> , 2017
	Ceará	52	51,9	30,8	11,5	5,8	Schaan <i>et al.</i> , 2017
	Rio Grande do Norte	276	45,7	35,1	15,6	3,6	Schaan <i>et al.</i> , 2017
	Paraíba	21	38,1	38,1	23,8	-	Schaan <i>et al.</i> , 2017
	Pernambuco	64	30,3	40,8	28,9	-	Schaan <i>et al.</i> , 2017
	Sergipe	4	75	25	-	-	Schaan <i>et al.</i> , 2017
	Bahia	7	71,4	28,6	-	-	Schaan <i>et al.</i> , 2017
	DM1	103	46,6	38,8	14,5	-	Presente estudo
Sudeste	São Paulo (SP)	492	28,7	46,3	25	-	Cardena <i>et al.</i> , 2013
	Espírito Santo	97	23,7	43,3	32	1	Sanches, 2013
	Sudeste	290	36,9	35,2	27,6	0,3	Fridman <i>et al.</i> , 2014
	Rio de Janeiro (RJ)	205	26	42	31	1	Simão <i>et al.</i> , 2018
	DM1	81	39,5	43,2	17,2	-	Presente estudo
	Santa Catarina	80	21,3	15	63,8	-	Palencia <i>et al.</i> , 2010
	Paraná	122	49,2	12,3	38,5	-	Poletto <i>et al.</i> , 2019
	DM1	13	30,7	7,7	61,5	-	Presente estudo

APÊNDICE C – Trabalho apresentado no XXXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica, realizado em São Paulo, agosto de 2023.

ESTUDO PILOTO SOBRE A ANCESTRALIDADE MATERNA INFERIDA A PARTIR DO mtDNA EM UMA POPULAÇÃO COM DIABETES TIPO I MISCIGENADA DO BRASIL

Livia Laife Ferreira¹; Bivie Lolole¹; Alessandra Dias¹; Igor Josué Barbosa Adilela¹; Macinda Nguldi¹; Roscane Sousa Azeiteiro²; Dayce Aparecida da Silva¹; Marília Brito Gomes¹.

**1 – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)
2 – Universidade Federal do Maranhão (UFMA)**

Introdução

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune crônica poligênica hereditária, que ocorre em função da destruição das células beta pancreáticas, gerando deficiência insulínica. Uma das estratégias para se investigar a origem genética do DM1 é o estudo do DNA mitocondrial (mtDNA), que segundo Cardena, é um bom marcador para inferir a provável origem ancestral por meio das regiões hipervariáveis (HVs). O Brasil é um país com importante diversidade genética devido à sua colonização com diferentes fluxos migratórios e miscigenação entre indivíduos indígenas. É así o momento, nenhuma avaliação do mtDNA em pacientes com DM1 foi realizada no Brasil. Assim, este estudo teve como objetivo analisar a origem genética materna do DM1 em uma população etnicamente miscigenada.


Metodologia

- mtDNA de 204 pacientes não aparentados com DM1 das regiões Nordeste, Sudeste e Sul foram analisados;
- Foiem coletado dados clínicos e inquérito sobre ancestridade familiar.


EXTRAÇÃO DE DNA

DNA extraído a partir do sangue genômico utilizando o kit comercial SP-CLIA Symphony de acordo com as diretrizes do fabricante (Qiagen, EUA).


PCR



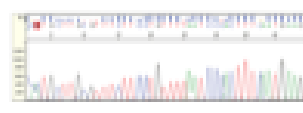
ELETOFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,2%



SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CONTROLE



ANÁLISE



Resultados

Tab. 1. Frequência de descendência materna entre pacientes com DM1 e Brasil, e sua distribuição por região (dados obtidos por análise ancestral).¹

Parentesco	DM1 BRASIL	NORDESTE	SUDESTE	SUL
Tamanho amostral	204	111	83	10
Índice haplótipos únicos	180	100	76	40
Haplótipo				
I	203	109	143	98
II	23	18	26	4
III	36	28	23	19
HV1 de outros países/continentes	240	133	143	11

Tab. 2. Percentagem de haplogrupos de indivíduos com DM1, e sua distribuição por região.



Haplótipo	N (%)	Região Nordeste	Região Sudeste	Região Sul
Melhores Representantes				
I	89 (50,0%)	62 (55,8%)	52 (62,6%)	4 (40,0%)
II	21 (11,9%)	6 (5,4%)	12 (14,5%)	3 (30,0%)
C	30 (16,7%)	13 (11,7%)	7 (8,4%)	3 (30,0%)
D	34 (18,7%)	21 (18,9%)	10 (12,0%)	3 (30,0%)
E	14 (7,6%)	10 (9,0%)	3 (3,6%)	1 (10,0%)
Outros	88 (48,3%)	43 (38,6%)	38 (46,0%)	7 (70,0%)
II	7 (3,8%)	3 (2,7%)	4 (4,8%)	0 (0,0%)
I1	16 (8,8%)	7 (6,3%)	11 (13,3%)	0 (0,0%)
I2	30 (16,6%)	10 (9,0%)	8 (9,6%)	1 (10,0%)
I3	33 (18,1%)	20 (18,0%)	12 (14,5%)	0 (0,0%)
População	33 (18,1%)	16 (14,4%)	14 (17,0%)	8 (80,0%)
H	1 (0,5%)	1 (0,9%)	4 (4,8%)	2 (20,0%)
HV	2 (1,1%)	1 (0,9%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)
J	6 (3,3%)	4 (3,6%)	3 (3,6%)	1 (10,0%)
K	6 (3,3%)	4 (3,6%)	1 (1,2%)	1 (10,0%)
T	4 (2,2%)	0 (0,0%)	1 (1,2%)	3 (30,0%)
U	6 (3,3%)	6 (5,4%)	2 (2,4%)	1 (10,0%)
W	2 (1,1%)	0 (0,0%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)
TOTAL	100%	100%	100%	100%

Tab. 3. Base de dados de identificação de migrações maternas nas regiões de haplogrupos para as Regiões Nordeste e Sudeste, comparando ancestralidade de pacientes com DM1 e população brasileira.

HAPLOGRUPO	NORDESTE (DM1)		NORDESTE (BRASIL)		SUDESTE (DM1)		SUDESTE (BRASIL)	
	N	%	N	%	N	%	N	%
I	109	98,2%	100	98,2%	143	98,5%	98	98,2%
II	18	16,2%	18	17,8%	26	18,2%	4	4,0%
C	28	25,2%	28	27,8%	23	16,0%	19	19,0%
D	21	18,8%	21	20,8%	7	5,0%	3	3,0%
E	10	9,0%	10	9,9%	3	2,1%	1	1,0%
Outros	43	38,6%	43	42,0%	38	27,0%	7	7,0%
I1	7	6,3%	7	6,9%	11	7,9%	0	0,0%
I2	10	9,0%	10	9,9%	8	5,7%	1	1,0%
I3	20	18,2%	20	19,6%	12	8,6%	0	0,0%
H	1	0,9%	1	0,9%	4	2,9%	2	2,0%
HV	1	0,9%	1	0,9%	1	0,7%	0	0,0%
J	4	3,6%	4	3,9%	3	2,1%	1	1,0%
K	4	3,6%	4	3,9%	1	0,7%	1	1,0%
T	0	0,0%	0	0,0%	1	0,7%	3	3,0%
U	6	5,4%	6	5,9%	2	1,4%	1	1,0%
W	0	0,0%	0	0,0%	1	0,7%	0	0,0%
TOTAL	111	100%	102	100%	143	100%	98	100%

Tab. 4. Base de dados de identificação de migrações maternas nas regiões de haplogrupos para as Regiões Nordeste e Sudeste, comparando ancestralidade de pacientes com DM1 e população brasileira.

HAPLOGRUPO	NORDESTE (DM1)		NORDESTE (BRASIL)		SUDESTE (DM1)		SUDESTE (BRASIL)	
	N	%	N	%	N	%	N	%
I	109	98,2%	100	98,2%	143	98,5%	98	98,2%
II	18	16,2%	18	17,8%	26	18,2%	4	4,0%
C	28	25,2%	28	27,8%	23	16,0%	19	19,0%
D	21	18,8%	21	20,8%	7	5,0%	3	3,0%
E	10	9,0%	10	9,9%	3	2,1%	1	1,0%
Outros	43	38,6%	43	42,0%	38	27,0%	7	7,0%
I1	7	6,3%	7	6,9%	11	7,9%	0	0,0%
I2	10	9,0%	10	9,9%	8	5,7%	1	1,0%
I3	20	18,2%	20	19,6%	12	8,6%	0	0,0%
H	1	0,9%	1	0,9%	4	2,9%	2	2,0%
HV	1	0,9%	1	0,9%	1	0,7%	0	0,0%
J	4	3,6%	4	3,9%	3	2,1%	1	1,0%
K	4	3,6%	4	3,9%	1	0,7%	1	1,0%
T	0	0,0%	0	0,0%	1	0,7%	3	3,0%
U	6	5,4%	6	5,9%	2	1,4%	1	1,0%
W	0	0,0%	0	0,0%	1	0,7%	0	0,0%
TOTAL	111	100%	102	100%	143	100%	98	100%


Financiamento:



BRIEF REPORT

Open Access



A pilot study of mitochondrial genomic ancestry in admixed Brazilian patients with type 1 diabetes

Livia Leite Ferreira¹, Anna Beatriz Rodrigues Gonçalves², Igor Josué Barbosa Adiala¹, Silvia Loiola¹, Alessandra Dias², Rossana Sousa Azulay⁴, Dayse Aparecida Silva¹ and Marília Brito Gomes^{3*} 

Abstract

Interactions between multiple genes and environmental factors could be related to the pathogenesis of type 1 diabetes (T1D). The Brazilian population results from different historical miscegenation events, resulting in a highly diverse genetic pool. This study aimed to analyze the mtDNA of patients with T1D and to investigate whether there is a relationship between maternal ancestry, self-reported color and the presence of T1D. The mtDNA control region of 204 patients with T1D residing in three geographic regions of Brazil was sequenced following the International Society for Forensic Genetics (ISFG) recommendations. We obtained a frequency of Native American matrilineal origin (43.6%), African origin (38.2%), and European origin (18.1%). For self-declared color, 42.6% of the patients with diabetes reported that they were White, 50.9% were Brown, and 5.4% were Black. Finally, when we compared the self-declaration data with maternal ancestral origin, we found that for the self-declared White group, there was a greater percentage of haplogroups of Native American origin (50.6%); for the self-declared Black group, there was a greater percentage of African haplogroups (90.9%); and for the Brown group, there was a similar percentage of Native American and African haplogroups (42.3% and 45.2%, respectively). The Brazilian population with diabetic has a maternal heritage of more than 80% Native American and African origin, corroborating the country's colonization history.

Keywords: Type 1 diabetes, Mitochondrial DNA, Admixed, Population

Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is an inherited polygenic chronic autoimmune disease caused by immune destruction of pancreatic beta cells, resulting in insulin deficiency [1,2,3]. Most genes associated with T1D susceptibility are related to the immune response [4]. Genetic variation in the region known as the human leukocyte antigen complex (HLA), especially in class II HLA antigens, is associated with genetic risk in T1D patients [4,5,6]. Generally, the risk conferred by HLA system genes that is more prevalent in White, Caucasian, and European-American individuals [2, 3, 5].

Another molecular marker that could be included in ancestry studies in patients with T1D is mitochondrial DNA (mtDNA). Mitochondria are membranous organelles, formed by a double membrane, present in almost all eukaryotic cells [7,8,9]. They are fundamental for a variety of biological functions, being responsible for regulating a wide range of cellular processes such as ATP production through oxidative phosphorylation (OXPHOS), apoptosis, β -oxidation of fatty acids, calcium homeostasis regulation, production of reactive oxygen species (ROS), and iron-sulfur cluster biogenesis [7,8,9].

Mitochondria have their own DNA, mtDNA, which in mammals is present in thousands of copies per cell and is inherited in a non-Mendelian maternal manner. mtDNA is a circular double-stranded DNA molecule, consisting of a heavy strand (H) and a light strand (L), without histones and organized into nucleoprotein complexes called nucleoids. It has a size of 16.5 kb, containing 37 genes responsible for encoding 13 protein subunits of the OXPHOS system, as well as two rRNAs and a set of 22 tRNAs for mitochondrial translation [7, 8]. In addition to the coding region, mtDNA contains a non-coding control region, a short displacement loop, a hypervariable segment (HVS) known as the D-loop, which houses almost all mtDNA replication and transcription [9, 10].

Thus, mtDNA has many effects, including adaptive mechanisms to deal with environmental changes and mechanisms related to cellular physiology, growth characteristics and inflammatory systems. All the abovementioned actions have a great impact on a broad range of metabolic and degenerative diseases, such as cancer, diabetes, and aging, which are related to polymorphisms and mutations in these genes [11,12,13,14].

According to Cardena, mtDNA through hypervariable regions (HVS) could be a good marker for inferring probable maternal geographic origin [15]. Brazil has important genetic diversity due to its colonization of different migratory flows and miscegenation between Native American, European, and African individuals [16, 17]. Therefore, to date, no evaluation of mtDNA in patients with T1D has been carried out in Brazil. Thus, this pilot study aimed to

analyze the maternal genetic origin of patients with T1D in a highly admixed population.

Materials and methods

This study, with 204 anonymized and not related to each other individuals with T1D, was derived from a nationwide multicenter cross-sectional study with 1760 patients conducted in five geographical regions (North, Northeast, Midwest, Southeast and South), as previously described [1]. The present sample ($n = 204$) comprised 86 men [42.2%]; 118 women [57.8%]) who had a mean age of 27.7 ($SD \pm 11.28$) years at diagnosis of 13.2 years ($SD \pm 8.29$) and a mean duration of diabetes of 13.5 years ($SD \pm 8.43$). The distribution of the studied population according to the geographic regions of Brazil is described in Fig. 1.

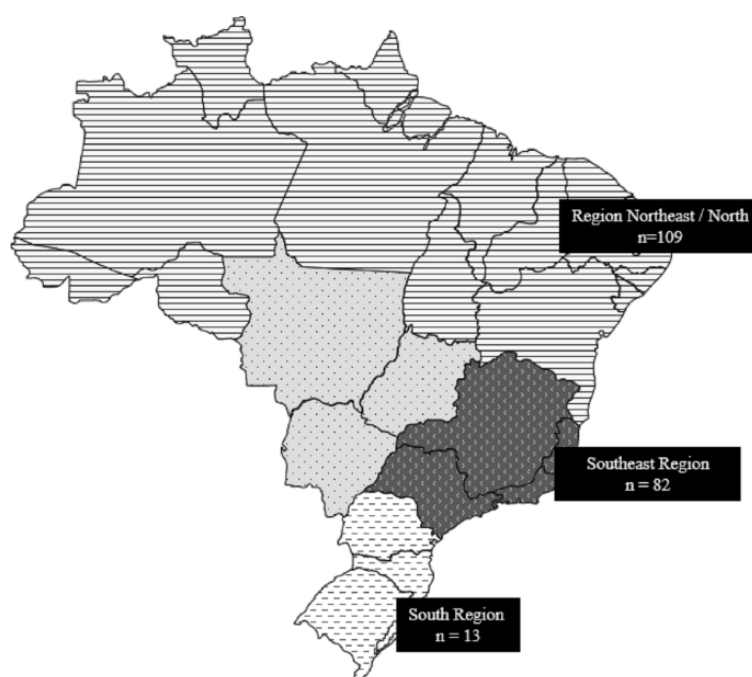


Fig1: Map of Brazil's geopolitical regions with a number of samples by region: Northeast Region (102) and North Region (7), together totaling 109 samples, Southeast Region: 82 samples; South Region: 13 samples. The samples from the North Region were added to the samples from the Northeast Region, due to their low sample number

The control region of mtDNA, between positions 16024 to 576, was amplified and sequenced. Conventional PCR was used for amplification using the L15900 and H639 primers at a concentration of 0.2 μ M each. The control region was sequenced using the L15900, L16555, L314, H159 and H639 primers at a concentration of 0.25 μ M each. Electrophoresis was performed on an ABI PRISM® 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, CA, USA). All forward and reverse sequences were aligned with the revised Cambridge Reference

Sequence (rCRS) using the SeqScape Version 2.7 program (Applied Biosystems, CA, USA) following the updated nomenclature guidelines for mtDNA. The EMPOP program was used to assign sequences to haplotypes according to the most up-to-date version of the phylogenetic tree of the mtDNA, Phylotree.

Approval was obtained before the start of the study by the Research Ethics Committee of the HUPE-UERJ (Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro) with the number CAAE 53563115.2.1001.5259. All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 1964 and later versions. Informed consent was obtained from all patients prior to recruitment.

Results and discussion

The percentages of mtDNA haplogroups observed in patients with T1D in Brazil were Amerindian 43.6% (89 patients), African 38.2% (78 patients) and European 18.1% (37 patients). The most frequent haplogroup in the studied population was Amerindian origin C (34 patients; 16.7%), followed by African origin L3 (33 patients; 16.2%). The most common haplogroups of European ancestral origin in the population were U and J, which were observed in 8 patients (3.92%) for each haplogroup (Table 1).

Table 1: Haplogroup percentage in the overall studied population stratified by region

Haplogroup	N (%)	Brazilian geographic regions			Haplogroup	N (%)	Brazilian geographic regions		
		Northeast/ North Region	Southeast Region	South Region			Northeast/ North Region	Southeast Region	South Region
Native American	89 (43.6%)	52 (47.7%)	32 (39.0%)	4 (30.8%)	Native American	89 (43.6%)	52 (47.7%)	32 (39.0%)	4 (30.8%)
A	10.29%	8.26%	14.63%	0.00%	A	21	9	12	0
B	9.80%	11.01%	8.54%	7.69%	B	20	12	7	1
C	16.67%	19.27%	12.20%	15.38%	C	34	21	10	2
D	6.86%	9.17%	3.66%	7.69%	D	14	10	3	1
	43.63%	47.71%	39.02%	30.77%		89	52	32	4
African	78 (38.2%)	42 (38.5%)	36 (44.0%)	1 (7.7%)	African	78 (38.2%)	42 (38.5%)	36 (44.0%)	1 (7.7%)
L0	3.43%	2.75%	4.88%	0.00%	L0	7	3	4	0
L1	8.82%	6.42%	13.41%	0.00%	L1	18	7	11	0
L2	9.80%	9.17%	10.98%	7.69%	L2	20	10	9	1
L3	16.18%	20.18%	14.63%	0.00%	L3	33	22	12	0
	38.24%	38.53%	43.90%	7.69%		78	42	36	1
European	37 (18.1%)	15 (13.8%)	14 (17.0%)	8 (61.5%)	European	37 (18.1%)	15 (13.8%)	14 (17.0%)	8 (61.5%)
H	3.43%	0.92%	4.88%	15.38%	H	7	1	4	2
HV	0.98%	0.92%	1.22%	0.00%	HV	2	1	1	0
J	3.92%	3.67%	3.66%	7.69%	J	8	4	3	1
R	2.94%	3.67%	1.22%	7.69%	R	6	4	1	1
T	1.96%	0.00%	1.22%	23.08%	T	4	0	1	3
U	3.92%	4.59%	2.44%	7.69%	U	8	5	2	1
W	0.98%	0.00%	2.44%	0.00%	W	2	0	2	0
	18.14%	13.76%	17.07%	61.54%		37	15	14	8
Total	100%	100%	100%	100%	Total	204	109	82	13

Maternal lineages of African, European and Amerindian descent are expected to occur at different frequencies in Brazilian regions due to different interethnic crossings during the colonization period.

The most frequent subhaplogroup of Native American origin in the studied patients with T1D was C1b (24 patients, 11.7%), which was observed in 15 patients from the Northeast Region, 2 from the South Region and 7 from the Southeast Region. C1b is often defined as “Pan American”, as it is found in both North and South American Native Americans of Beringian origin. The C1 haplogroup was also the most frequently found in Botocudo origin (Brazil) individuals [18]. However, when comparing our results with those of other countries in South America, the most frequent haplogroup in Colombia was A2 (40%), while in our study population, it accounted for only 10.3% [18, 19].

The most frequent subhaplogroups of African origin in the studied patients with T1D were L3e and L1c (19 patients [9.3%] and 14 patients [6.8%], respectively). These subhaplogroups constitute approximately half of the African fraction of the Brazilian population (49%) studied by Alves-Silva and originated from Central Africa [20, 21].

Regarding haplogroups of European origin, our results revealed that haplogroups U and J were the most frequent ($n = 8$; 3.9% both). For the most common subhaplogroups, we found R0 ($n = 6$; 2.9%), which is frequently found in Western Europe [22].

To determine whether there is any relationship between self-reported color and matrilineal ancestry haplogroups, we determined the distribution of the ancestry origins of the matrilineal lineages (African [AFR], European [EUR] and Native America [NAM]) by groups of self-reported colors (White, Black, Brown and Yellow) in patients with T1D, as shown in Fig. 2.

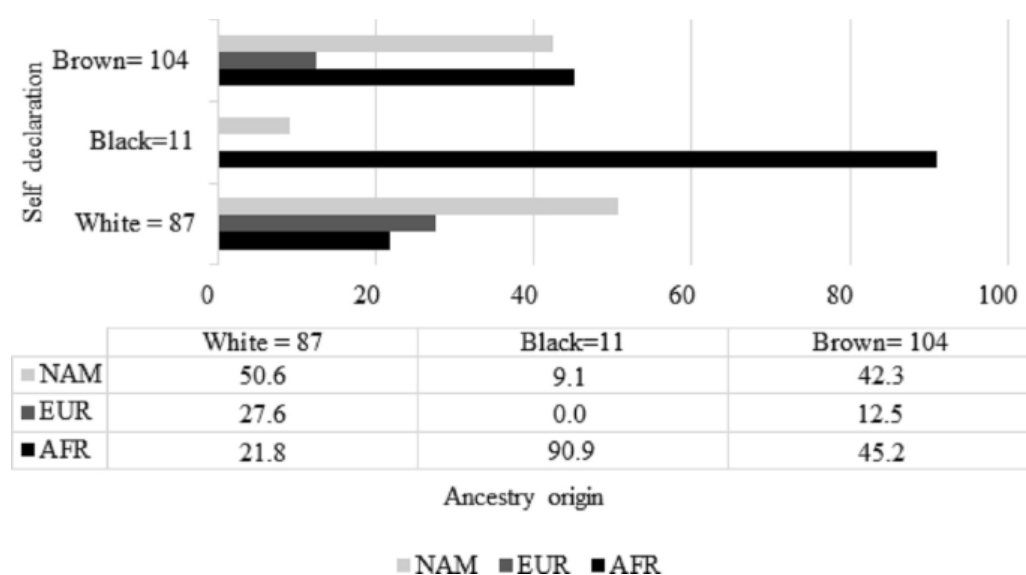


Fig 2: Distribution of matrilineal ancestral origin by self-reported color groups in patients with

T1D (NAM: Native American; AFR: African; EUR: European)

In the present study, 42.6% ($n = 87$) of the patients self-declared White, 5.4% Black ($n = 11$) and 50.9% Brown ($n = 104$). Our data are similar to those of the last IBGE demographic census, 2010, which revealed that the Brazilian population comprises 47.7% Whites, 7.6% Blacks, 43% Browns, 1.1% Yellows and 0.4% Native Americans [23].

Additionally, in the present study, we observed a greater number of patients of native American origin with matrilineal ancestry. According to self-declaration, those who declared themselves White had predominantly Native American matrilineal ancestry (50.6%; 44 patients); those who declared themselves to be Brown had a similar frequency of African and Native American matrilineal ancestry (45.2% and 42.3%; 47 patients and 43 patients, respectively); and those who declared themselves Black had matrilineal ancestry of African origin (90.9%; 10 patients). ANOVA was used to validate our hypothesis, and a p value of 0.0513 indicated a tendency.

Conclusion

The present study of patients with T1D revealed that matrilineal ancestry of Native American origin was the most common, followed by that of African and European ancestry. Our data corroborate those of other studies, confirming the influence of Brazil's historical colonization period on the formation of the genetic pool of the Brazilian population. Further studies with a large sample of patients with T1D in all geographic regions are needed to investigate this pattern for a better definition of the role of DNAmT in the pathogenesis of the disease.

Availability of data and materials

The used datasets and/or analyzed during the current study are available with the corresponding author upon reasonable request.

Abbreviations

ISFG:

International Society for Forensic Genetics

T1D:

Type 1 diabetes

HLA:

Histocompatibility leukocyte antigen system

mtDNA:

Mitochondrial DNA

HVS:

Hypervariable segments

rCRS:

Control region

PCR:

Polymerase chain reaction

OXPHOS:

Oxidative phosphorylation

AFR:

African

EUR:

European

NAM:

Native American

References

1. Gomes MB, et al. Self-reported color-race and genomic ancestry in an admixed population: a contribution of a nationwide survey in patients with type 1 diabetes in Brazil. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;21(140):245–52.
2. Dimeglio LA, et al. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2018;391(10138):2449–62.
3. Bluestone JA, et al. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature.* 2010;464(7293):1293–300.
4. Atkinson MA, et al. Diabetes tipo 1. *Lancet.* 2014;383(9911):69–82.
5. Maahs D, et al. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2010;39(3):481–97.
6. Norris JM, et al. Type 1 diabetes-early life origins and changing epidemiology. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8(3):226–38.
7. Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson NG. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Lett.* 2021;595(8):976–1002.
8. Stocco A, Coppedè F. Mitochondrial DNA methylation and human diseases. *Int J Mol Sci Published.* 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22094594>.
9. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA distribution mutations, and elimination. *Cells.* 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8040379>.

10. Mohamed Yusoff AA, Mohd Khair SZN, Wan Abdullah WS, Abd Radzak SM, Abdullah JM. Somatic mitochondrial DNA D-loop mutations in meningioma discovered: a preliminary data. *J Cancer Res Ther.* 2020;16(6):1517–21. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1132_16.
11. Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human radiation and disease. *Cell.* 2015;163(1):33–8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.067>.
12. Aboulmaouhib B, Kastenmüller G, Suhre K, et al. First mitochondrial genome-wide association study with metabolomics. *Hum Mol Genet.* 2022;31(19):3367–76. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab312>.
13. Liu E, Kaidonis G, Gillies MC, et al. Mitochondrial haplogroups are not associated with diabetic retinopathy in a large Australian and British Caucasian sample. *Sci Rep.* 2019;9(1):612. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37388-8>.
14. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a021220. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220>.
15. Cardena MMSG, et al. Relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroup and genomic ancestry in individuals from southeast of Brazil. *Ética Justiça.* 2013;18:62–6.
16. Lins TC, et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol.* 2010;22:187–92.
17. Pena SDJ, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *Belo Horizonte.* 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063PLOSONE>.
18. Gonçalves VF, et al. Identification of polynesian mtDNA haplogroups in remains of Botocudo Amerindians from Brazil. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(16):6465–9.
19. Salas A, et al. The mtDNA ancestry of admixed Colombian populations. *Am J Hum Biol.* 2008;20:584–91.
20. Alves-Silva J, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):444–61.
21. Poletto MM, et al. Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Parana state-increasing the Brazilian forensic database. *Int J Legal Med.* 2019;133(2):347–51.
22. Álvarez-Iglesias V, et al. New population and phylogenetic features of the internal

variation within mitochondrial DNA macro-haplogroup R0. PLoS ONE. 2009;4(4):1–9.

23. Ibge—Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Censo Brasileiro de 2010 Rio de Janeiro IBGE. 2012

Acknowledgements

The authors would like to thank the volunteers who donated their samples for this study and to the Brazilian Type 1 Diabetes Study Group (BrazDiab1SG) (Additional Table 1).

Funding

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Grant number 88887.602580/2021-00; FAPERJ (Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), Grant number 260003/001128/2020, 26/200.521/2023 and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil) (grant number 563753/2010-2 and 304367/2021-4).

Author information

Authors and Affiliations

1. DNA Diagnostic Laboratory, IBRAG, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Lívia Leite Ferreira, Igor Josué Barbosa Adiala, Silvia Loiola & Dayse Aparecida Silva

2. Forensic Science and Technology Laboratory, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Anna Beatriz Rodrigues Gonçalves & Alessandra Dias

3. Department of Internal Medicine, Diabetes Unit, Rio de Janeiro State University (UERJ), Boulevard 28 Setembro 77, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Marília Brito Gomes

4. Service of Endocrinology, University Hospital of the Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

Rossana Sousa Azulay

Contributions

RSA, DAS and MBR contributed to the study design and study conception. Material preparation and data collection were performed by RSA, DAS and MBR. LLF, SL, ABRG, ASD, and IJBA conducted the analyses. The first draft of the manuscript was written by LLF. All the authors have read and approved the final manuscript.

Ethics declarations

Ethics approval and consent to participate

Approval was obtained before the start of the study by the Research Ethics Committee of the HUPE-UERJ (Pedro Ernesto University Hospital, State University of Rio de Janeiro) with the number CAAE 53563115.2.1001.5259. All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 1964 and later versions.

Informed consent

Informed consent was obtained from all patients prior to recruitment.

Competing interests

All the authors declare that they have no competing interests.

Additional information

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Cite this article

Ferreira, L.L., Gonçalves, A.B.R., Adiala, I.J.B. *et al.* A pilot study of mitochondrial genomic ancestry in admixed Brazilian patients with type 1 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* **16**, 130 (2024). <https://doi.org/10.1186/s13098-024-01342-8>

Received: 25 March 2024. Accepted: 01 May 2024. Published: 15 June 2024.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-024-01342-8>

ANEXO A – TCLE**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TÍTULO DO PROJETO:**

Associação de alelos do sistema principal de Histocompatibilidade com ancestralidade autossômica, do cromossoma Y e do DNA mitocondrial em pacientes com diabetes tipo 1: relação com a cor autodeclarada em pais e avós.

COORDENADOR GERAL DO PROJETO: Prof. Dra. Marília de Brito Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL DO CENTRO: Dra. Marília de Brito Gomes

LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

O Sr (a) está sendo convidado (a) para participar de um estudo multicêntrico acadêmico sob a coordenação geral da Prof. Dra. Marília de Brito Gomes (UERJ)

Os objetivos deste estudo estão descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. É importante que você entenda por que o estudo está sendo realizado e o que ele envolverá. Portanto, leia com calma e atenção e analise cuidadosamente estas informações antes de decidir se você deseja participar. Não hesite em fazer perguntas para a equipe do estudo caso algum ponto não esteja claro ou se você desejar mais informações.

O Sr(a) deve ler e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes que quaisquer atividades relacionadas ao estudo possam ser realizadas.

OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar a prevalência das complicações crônicas microvasculares e macrovasculares (retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica e autonômica cardíaca e doença cardiovascular) em pacientes diabéticos tipo 1 (DM1) em acompanhamento em unidades ambulatoriais e

hospitais públicos conveniados ao Sistema Único de Saúde (SUS) e avaliação dos custos da doença.

Identificar marcadores demográficos, clínicos e laboratoriais das complicações crônicas relacionadas ao DM1.

Avaliar a predisposição genética ao DM1 conferida pelo sistema de histocompatibilidade [HLA] e avaliar a distribuição dos diferentes marcadores genéticos de risco e proteção para as complicações crônicas do diabetes (nefropatia e retinopatia diabética), incluindo os marcadores genéticos de ancestralidade, nos pacientes portadores de DM 1 e em controles não diabéticos

Os pacientes responderão a um questionário (em anexo) com perguntas sobre sua ancestralidade (pais, avós e bisavós).

A partir dos resultado de prevalência e dos custos da doença e de suas complicações e das disponibilidades de intervenção de cada centro, avaliaremos a possibilidade de instituímos estratégias terapêuticas em parceria com o SUS.

DADOS E PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS:

- Coleta de dados referentes à doença através de um questionário, exame físico e de fundo de olho;
- Dados sobre ancestralidade (pais, avós e bisavós) coletados por um questionário;
- Coleta de sangue de 10 ml de sangue para análise bioquímica (lipidograma, creatinina e ac.úrico pelo centro e TSH (caso haja disponibilidade do centro);
- Coleta de sangue 6 ml para análise da HbA1c (caso o centro não realize por HPLC-BIORAD) e de 12 ml para análise de PCR-US, TSH (caso o centro não faça) e armazenamento de amostras
- Coleta de 10 ml de sangue para análise dos polimorfismos genéticos descritos acima;
- Coleta de 2 amostras randômicas de urina para análise de microalbuminúria;

Todo o material coletado (sangue e urina) será utilizado para as análises do presente estudo. O material será encaminhado ao laboratório ao laboratório da Disciplina de Diabetes da

UERJ para análise de TSH, (caso o centro não faça), PCRUS e HbA1c (caso o centro não realize por HPLC-BIORAD). O material coletado para análise dos polimorfismos genéticos será encaminhado ao Laboratório de Histocompatibilidade (HLA) da UERJ para extração do DNA. As amostras de DNA serão armazenadas no laboratório de HLA da UERJ para análise de futuros marcadores genéticos de risco de complicações da doença. As amostras de soro serão armazenadas no Laboratório da Disciplina De Diabetes e Metabologias da UERJ. Toda nova pesquisa a ser feita com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição

A avaliação cardiovascular será realizada pelos métodos descritos abaixo sendo comum Eletrocardiograma (ECG) de repouso.

CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS COLETADOS:

Todas as informações coletadas serão mantidas em caráter sigiloso e utilizadas apenas para fins científicos.

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Se o Sr (a) aceitou inicialmente em participar do estudo e depois decidiu sair por qualquer razão, você não terá nenhum prejuízo em seu atendimento dentro deste hospital.

CUSTOS:

Não haverá nenhum custo para você participar do estudo.

RISCOS E BENEFÍCIOS:

RISCOS: Sua participação neste estudo não vai prejudicar o tratamento da sua doença, nem causar nenhum dano ao Sr (a).

BENEFÍCIOS: Não haverá nenhum benefício direto se o Sr (a) participar deste estudo, porém a pesquisa produzirá resultado que poderão ajudar outros pacientes no futuro.

CONTATO:

Se o Sr (a) tiver dúvida ou necessitar de esclarecimentos sobre a pesquisa, por favor, entre em contato com a Dr (a) Marilia Gomes através dos telefones 28688224, 23342374.

Para obter informações adicionais sobre seus direitos como sujeito de pesquisa referente à sua participação neste estudo, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital “Pedro Ernesto localizado na Av 28 setembro 77 térreo, CEP 20551-030, Brasil, no telefone 28688253. .

CONSENTIMENTO:

Confirmo que após receber todas as informações referentes ao estudo, inclusive os riscos e benefícios, ler e entender o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tirar todas as minhas dúvidas, concordo em participar voluntariamente do estudo.

PACIENTE:

Nome completo
Assinatura
Data:

ANEXO B – QUESTIONÁRIO

Nome do Paciente		
Sexo : (1) Masculino (2) Feminino	<input type="checkbox"/>	
Registro no Centro	_____	
Cidade	_____	Data Nascimento -----/----- -----/-----
Tempo de acompanhamento no centro (meses)	_____	
Cor do Pai	(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Cor da Mãe	(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
O seu pai nasceu no Brasil ? (Se for estrangeiro, pule a próxima questão)	(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Estado do Brasil onde seu pai nasceu:		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Caso o pai não seja brasileiro , em qual país estrangeiro nasceu?		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que seu pai nasceu?	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A sua mãe nasceu no Brasil ? (Se for estrangeira, pule a próxima questão)		(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Estado do Brasil onde sua mãe nasceu:			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Caso sua mãe não seja brasileira, em qual país estrangeiro nasceu?			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que sua mãe nasceu?	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Cor do Avô Materno:		(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Cor da Avó Materna:		(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
O seu avô materno nasceu no Brasil ? (Se for estrangeiro, pule a próxima questão)		(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Estado do Brasil onde seu avô materno nasceu:			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Caso seu avô materno não seja brasileiro, em qual o país estrangeiro nasceu?			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que seu avô materno nasceu?	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A sua avó materna nasceu no Brasil ? (Se for estrangeira, pule a próxima questão)		(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Estado do Brasil onde sua avó materna nasceu:			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Caso sua avó materna não seja brasileira, em qual país estrangeiro nasceu?			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que sua avó materna nasceu?	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Cor do Avô Paterno:		(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Cor da Avó Paterna:		(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
O seu avô paterno nasceu no no Brasil ? (Se for estrangeiro, pule a próxima questão)		(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Estado do Brasil onde seu avô paterno nasceu:			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

Caso seu avô paterno não seja brasileiro, em qual o país estrangeiro nasceu?			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que seu avô paterno nasceu?	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A sua avó paterna nasceu no Brasil ? (Se for estrangeira, pule a próxima questão)		(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Estado do Brasil onde sua avó paterna nasceu:			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Caso sua avó paterna não seja Angolana, em qual o país estrangeiro nasceu?			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que sua avó paterna nasceu?	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Cor dos Bisavós Maternos:		(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Os seus bisavós maternos nasceram no Brasil (Se forem estrangeiros, pule a próxima questão)		(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe	<input type="checkbox"/>
Estado Brasil onde seus bisavós maternos nasceram:			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Caso seus bisavós maternos não sejam brasileiros , em qual país estrangeiro nasceram?			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que seus	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

bisavós maternos nasceram?			
Cor dos Bisavós Paternos:	(1) Branca (2) Preta (3) Parda/mulata (4) Amarela/Oriental (5) Indígena (9) Não Sabe		<input type="checkbox"/>
Os seus bisavós paternos nasceram no Brasil ? (Se forem estrangeiros, pule a próxima questão)	(1)Sim (2)Não (9) Não Sabe		<input type="checkbox"/>
Estado do Brasil Angolano onde seus bisavós paternos nasceram:			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Caso seus bisavós paternos não sejam brasileiros , em qual país estrangeiro nasceram?			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
A. Sabe informar a região deste país estrangeiro que seus bisavós paternos nasceram?	B. Caso saiba, informar esta região:	A. (1)Sim B.- (2)Não	A. <input type="checkbox"/> B. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>