Mari Maki Síría Godoy Cardena

**Avaliação da relação entre haplogrupo mitocondrial e
ancestralidade genômica no desenvolvimento de
insuficiência cardíaca em amostra brasileira**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cintia Fridman Rave

**São Paulo
2013**

Mari Maki Síría Godoy Cardena

**Avaliação da relação entre haplogrupo mitocondrial e
ancestralidade genômica no desenvolvimento de
insuficiência cardíaca em amostra brasileira**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cintia Fridman Rave

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP).

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cardena, Mari Maki Síría Godoy

Avaliação da relação entre haplogrupo mitocondrial e ancestralidade genômica no desenvolvimento de insuficiência cardíaca em amostra brasileira / Mari Maki Síría Godoy Cardena. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Cintia Fridman Rave.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.DNA mitocondrial 3.Haplotipos
4.Marcadores genéticos 5.Mutação INDEL 6.Grupos étnicos

USP/FM/DBD-220/13

Dedico esta dissertação...

**A minha mãe Elzi, minha irmã Marribe e ao
meu marido Leandro.**

Pelo amor, incentivo, apoio e compreensão.

Essa conquista também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as graças e bênçãos que Ele tem derramado sobre minha vida;

Muito especialmente, desejo agradecer a minha orientadora Dr^a Cintia Fridman pela paciência, atenção, estímulos, oportunidades e pela confiança depositada em mim desde o princípio... um Muito Obrigada;

Ao Dr Alexandre da Costa Pereira pela confiança, pelos conhecimentos compartilhados, pela dedicação, pela ajuda nas análises estatísticas e por acreditar nesse trabalho;

A minha mais que amada mãe Elzi por investir em minha formação profissional, acadêmica e moral, permitindo a realização de grandes sonhos. Toda a minha gratidão, amor e a alegria de ser sua filha;

Ao meu pai Silvio pelo incentivo, carinho e atenção;

Aos meus irmãos Marribe, Riber, Macrelli e seus companheiros que mesmo de longe sempre mostraram-se interessados e presentes em meus estudos, sempre me dando forças para continuar;

Aos meus sobrinhos Marcello, Sara e Tarlei pelo carinho que nunca faltou;

Ao meu amado marido, Leandro Ferreira por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Graças ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho;

As minhas amigas, Deise, Felícia, Fernanda e Priscilla, pela amizade sincera, pelos ombros amigos e incentivo ao longo destes anos de estudos;

Aos colegas de laboratório Juliana, Renata e Thiago pela companhia e torcida;

Aos professores Dr Sidney Santos e Dr^a Ândrea Riberio-dos-Santos pela colaboração, por me auxiliar nas análises dos INDELs e por ceder um espaço em seu laboratório, Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM), na UFPA (Universidade Federal do Pará), para a realização de uma parte dos meus experimentos, como também sua técnica de laboratório e aluna de mestrado Dayse Alencar, pelos ensinamentos e colaboração nas práticas dos INDELs;

As agências de fomento CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro;

A Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ao Programa de Fisiopatologia Experimental e ao LIM 40 do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho pela disponibilização do espaço e pelo apoio concedido para a realização desse estudo;

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURA

LISTA DE QUADRO

LISTA DE GRÁFICO

LISTA DE TABELA

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. DNA Mitocondrial	2
1.2. Haplogrupos Mitocondriais.....	6
1.3. Marcadores Informativos de Ancestralidade	13
1.4. Insuficiência Cardíaca.....	17
1.4.1. Fisiopatologia.....	17
1.4.2. Classificação da Insuficiência Cardíaca.....	18
1.4.3. Epidemiologia	20
1.4.4. Etiologia	21
1.5. Haplogrupos e Polimorfismos Mitocondriais Associados com Fatores de Risco para a IC	22
1.6. Marcadores Informativos de Ancestralidade Associados com Fatores de Risco para a IC	25
1.7. Aplicações das Informações de Autodeclaração de Cor de Pele, Haplogrupos Mitocondriais e Marcadores de Ancestralidade Genômica Autossômica.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Casuística	32
3.1.1. Pacientes com Insuficiência Cardíaca	32
3.1.2. Controles	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Amplificação do mtDNA	34

3.2.2. Reação de Sequenciamento	35
3.2.3. Avaliação da Ancestralidade Genômica Autossômica.....	36
3.2.4. Análise Estatística.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE OS GRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES	42
4.1.1. Análise da Ancestralidade Genômica Autossômica na Amostra de Estudo.....	43
4.1.2. Caracterização das Sequências Mitocondriais	45
4.1.3. Distribuição dos Haplogrupos Mitocondriais	56
4.1.4. Distribuição da Ancestralidade Genômica Autossômica em relação aos Haplogrupos Mitocondriais nos Grupos de Controles e Pacientes .	60
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO GRUPO DE PACIENTES.....	64
4.2.1. Distribuição dos Haplogrupos Mitocondriais e dos Marcadores de Ancestralidade na Amostra de Pacientes Estratificada por Autodeclaração de Cor de Pele	65
4.2.2. Distribuição da Autodeclaração de Cor de Pele, dos Haplogrupos Mitocondriais e dos Marcadores de Ancestralidade na Amostra de Pacientes Estratificada por Etiologia	74
4.2.3. Análise da Idade Média dos Pacientes para o Início dos Sintomas da IC em Relação aos Haplogrupos Mitocondriais e Etiologia	83
4.2.4. Avaliação da Sobrevida nos Pacientes com IC, em Relação aos Haplogrupos Mitocondriais, Etiologia e Ancestralidade Genômica Autossômica	87
5. CONCLUSÃO	93
6. ANEXO.....	96
7. REFERÊNCIAS.....	115
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	<i>American College of Cardiology</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
AIMs	Marcadores Informativos de Ancestralidade
ATP	Trifosfato de Adenosina
bpm	Batimentos por Minuto
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
CMH	Cardiomiopatia Hipertrófica
DAC	Doença Arterial Coronariana
DC	Doenças Cardiovasculares
DM2	Diabetes Mellitus do Tipo 2
DP	Desvio Padrão
HGDP-CEPH	<i>Human Genome Diversity Cell Line Panel Project</i>
HV	Região Hipervariável
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Insuficiência Cardíaca
I.C. (95%I.C.)	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de Massa Corpórea
INDELs	Polimorfismos do Tipo Inserções-Deleções
MASP2	MBL-Proteases Associadas à Serina 2
mtDNA	DNA Mitocondrial
mtSSB	<i>single-stranded DNA-binding protein</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OR	Odds Ratio
ON	Óxido Nítrico
pb	Pares de Base
rCRS	<i>Revised Cambridge Reference Sequence</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNP	Polimorfismos de um Único Nucleotídeo
STR	Pequenas Repetições em <i>tandem</i>

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Representação gráfica da molécula de mtDNA humano.....	3
Figura 2: Eletroferograma exemplificando uma heteroplasma de ponto.....	5
Figura 3: Eletroferograma exemplificando uma heteroplasma de comprimento na região HV1.....	5
Figura 4: Eletroferograma exemplificando uma heteroplasma de comprimento na região HV3.....	5
Figura 5: Diagrama de evolução de haplogrupos mitocondriais.....	9
Figura 6: Rotas simplificadas da migração humana e distribuição geográfica mundial dos haplogrupos mitocondriais	12
Figura 7: Filogenia simplificada do mtDNA.....	13
Figura 8: Eletroferograma apresentando heteroplasma de comprimento na região 16193 e a transição no nucleotídeo 16189.....	47
Figura 9: Eletroferograma apresentando a heteroplasma de comprimento na região 309 e a inserção de 1C na posição 315	50
Figura 10: Heteroplasma de comprimento na região de AC _s , presente entre os nucleotídeos 515 e 524	51
Figura 11: Heteroplasma de comprimento na região <i>C-Stretch</i> , localizada entre os nucleotídeos 568 e 573	52
Figura 12: Eletroferograma apresentando polimorfismo do tipo inserção na posição 463	55
Figura 13: Eletroferograma apresentando polimorfismo do tipo inserção na posição 16285	55
Figura 14: Eletroferograma apresentando a sequência normal entre o nucleotídeo 16018 ao 16032	56
Figura 15: Distribuição de cada ancestralidade genômica em relação aos haplogrupos mitocondriais e autodeclaração de cor de pele.....	69

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Classificação funcional da IC de acordo com a <i>New York Heart Association (NYHA)</i>	19
Quadro 2: Estagiamento da IC segundo a <i>American Heart Association (AHA)</i>	19
Quadro 3: Classificação da IC de acordo com as formas clínicas.....	20

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1: Representação gráfica da média da ancestralidade genômica dos grupos de controles e pacientes.....	44
Gráfico 2: Distribuição dos haplogrupos mitocondriais nos grupos de controles e pacientes.	57
Gráfico 3: Gráfico representando a distribuição da contribuição da ancestralidade genômica de acordo com os haplogrupos mitocondriais no grupo de controles.....	62
Gráfico 4: Gráfico representando a distribuição da contribuição da ancestralidade genômica de acordo com os haplogrupos mitocondriais no grupo de pacientes.....	62
Gráfico 5: Representação gráfica da distribuição dos haplogrupos mitocondriais de acordo com a autodeclaração de cor de pele.....	67
Gráfico 6: Representação gráfica da distribuição dos marcadores de ancestralidade de acordo com a autodeclaração de cor de pele. ...	68
Gráfico 7: Distribuição da autodeclaração de cor de pele em cada uma das etiologias da IC.....	76
Gráfico 8: Distribuição dos haplogrupos mitocondriais em cada um das etiologias da IC.....	77
Gráfico 9: Distribuição da contribuição de ancestralidade genômica em cada uma das etiologias da IC.	78
Gráfico 10: Curva Kaplan-Meier relativa a idade média dos pacientes para início dos sintomas da IC de acordo com os haplogrupos mitocondriais.	86
Gráfico 11: Curva Kaplan-Meier relativa idade média dos pacientes para o início dos sintomas da IC na etiologia isquêmica de acordo com os haplogrupos mitocondriais.....	86
Gráfico 12: Curva Kaplan-Meier de sobrevida dos pacientes de acordo com os haplogrupos mitocondriais.....	89
Gráfico 13: Curva Kaplan-Meier de sobrevida dos pacientes com etiologia valvar de acordo com os haplogrupos mitocondriais.....	89

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Distribuição e análise estatística da ancestralidade genômica autossômica nos grupos de controles e pacientes.	43
Tabela 2: Análise estatística das variantes da região controle do mtDNA encontradas nos grupos de pacientes e controles.	52
Tabela 3: Inserções e deleções presentes na região controle do mtDNA do grupo de pacientes e controles.	54
Tabela 4: Distribuição e análise estatística dos haplogrupos mitocondriais nos grupos de controles e pacientes.	58
Tabela 5: Distribuição global da ancestralidade genômica autossômica em relação aos haplogrupos mitocondriais no grupo de controles.	61
Tabela 6: Distribuição global da ancestralidade genômica autossômica em relação aos haplogrupos mitocondriais no grupo de pacientes.	61
Tabela 7: Características dos 492 indivíduos que informaram sua autodeclaração de cor de pele.	65
Tabela 8: Distribuição dos haplogrupos mitocondriais e da ancestralidade genômica autossômica de acordo com a autodeclaração de cor de pele.	67
Tabela 9: Percentual da autodeclaração de cor de pele da população brasileira.	70
Tabela 10: Características demográficas e clínicas do grupo de pacientes. ...	75
Tabela 11: Distribuição das etiologias da IC de acordo com a autodeclaração de cor de pele.	76
Tabela 12: Distribuição das etiologias da IC de acordo com os haplogrupos mitocondriais.	77
Tabela 13: Distribuição das etiologias da IC de acordo com a ancestralidade genômica autossômica.	78
Tabela 14: Análise estatística das variáveis: autodeclaração de cor de pele, haplogrupos mitocondriais e marcadores de ancestralidade genômica autossômica estratificada por etiologias da IC.	80

Tabela 15: Avaliação estatística da idade média dos pacientes para início dos sintomas da IC, estratificada por etiologia e de acordo com os haplogrupos mitocondriais.....	85
Tabela 16: Média de dias de vida dos pacientes, estratificada por etiologia e de acordo com os haplogrupos mitocondriais, contados a partir do momento do diagnóstico até o óbito.....	88
Tabela 17: Análise estatística da sobrevida em relação à ancestralidade genômica autossômica.....	90
Tabela 18: Haplogrupos mitocondriais e as proporções de ancestralidade genômica autossômica individual dos 188 controles.....	96
Tabela 19: Haplogrupos mitocondriais, autodeclaração de cor de pele e as proporções de ancestralidade genômica autossômica individual dos 503 pacientes.	101

RESUMO

Cardena MMSG. Avaliação da relação entre haplogrupo mitocondrial e ancestralidade genômica no desenvolvimento de insuficiência cardíaca em amostra brasileira [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

As doenças cardiovasculares lideram as causas de morte em vários países, inclusive no Brasil, sendo a insuficiência cardíaca (IC) uma das enfermidades mais frequentes. Estudos epidemiológicos e de genética têm demonstrado associações entre a origem étnica dos indivíduos e o desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares. O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica no desenvolvimento da IC. Foram avaliados 503 pacientes com IC e 188 controles saudáveis. Os haplogrupos mitocondriais foram obtidos pela análise da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA) e o estudo de ancestralidade genômica foi realizado pela análise de 48 marcadores autossômicos informativos de ancestralidade (AIMs) tipo INDEL. As análises estatísticas foram realizadas com o uso de regressão logística, construção de curvas de Kaplan-Meier e utilizando o método estatístico de *log-rank* (Mantel-Cox). Os resultados dos AIMs evidenciaram contribuições semelhantes de ancestralidade genômica entre os grupos de pacientes e controles, evidenciando a não estratificação populacional da amostra. A comparação dos haplogrupos mitocondriais entre os dois grupos revelou uma associação dos haplogrupos africanos com risco aumentado ($p=0,015$; OR 1,56) para o desenvolvimento da IC, enquanto que os haplogrupos ameríndios foi associado a um menor risco ($p=0,043$; OR 0,71). As análises realizadas apenas dentro do grupo de pacientes revelaram que 74,6% dos indivíduos se autodeclararam como brancos. As etiologias encontradas com maior frequência na nossa amostra foram a hipertensiva (28,6%) e a isquêmica (28,4%). A análise de mtDNA evidenciou que pacientes pertencentes aos haplogrupos africano apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento da IC nas etiologias chagásica ($p=0,012$; OR 2,32) e hipertensiva ($p=0,003$; OR 2,05). Evidenciou também que pacientes dos haplogrupos africanos, principalmente da etiologia isquêmica, desenvolveram IC mais cedo que os demais, e que os pacientes com esses haplogrupos da etiologia valvar apresentaram maior sobrevida no período avaliado. A análise dos AIMs demonstrou que, na etiologia hipertensiva, a maior contribuição da ancestralidade genômica africana conferiu risco aumentado ($p=0,002$; OR 6,07), enquanto que a maior contribuição de ancestralidade genômica europeia conferiu risco diminuído ($p=0,001$; OR 0,16) para o desenvolvimento da IC; os pacientes com maior contribuição de ancestralidade genômica ameríndia apresentaram maior sobrevida no período de 4 anos. O uso de marcadores autossômicos e do DNA mitocondrial fornece estimativas mais precisas da ancestralidade de um indivíduo e/ou população, enquanto que a autodeclaração de cor de pele fornece indiretamente informações importantes sobre aspectos socioeconômicos e culturais. Assim, seria interessante a utilização, especialmente em populações miscigenadas, de

uma construção tridimensional de análise, que poderia fornecer dados mais informativos e complementares em estudos de associação entre etnia e fenótipos e/ou doenças complexas.

Descritores: Insuficiência cardíaca; DNA mitocondrial; Haplotipos; Marcadores genéticos; Mutação INDEL; Grupos étnicos.

SUMMARY

Cardena MMSG. *Assessment of the relationship between mitochondrial haplogroup and genomic ancestry in the development of heart failure in Brazilian sample* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in many countries, including Brazil, being the heart failure (HF) one of the most common diseases. Epidemiological and genetic studies have shown associations between the ethnic origin of individuals and the development of various cardiovascular diseases. The aim of this study was to evaluate the relationship between mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in the development of HF. We evaluated 503 patients with HF and 188 healthy controls. The mitochondrial haplogroups were obtained by analysing the control region of mitochondrial DNA (mtDNA) and the study of genomic ancestry was conducted by the analysis of 48 autosomal ancestry informative markers (AIMs) INDEL type. Statistical analyzes were performed using logistic regression, construction of the Kaplan-Meier and using the log-rank test (Mantel-Cox). The results of AIMs showed similar contributions of genomic ancestry among the patients and controls groups, indicating no population stratification of the sample. Comparing mitochondrial haplogroups between the groups, we observed that african haplogroups show increased risk ($p=0.015$, OR 1.56) of development of the HF, while amerindian haplogroup was associated with a reduced risk ($p=0.043$, OR 0.71). The analysis carried out only within the group of patients showed that 74.6% of individuals self-declared as white. The etiologies found with greater frequency in our sample were hypertension (28.6%) and ischemic (28.4%). Analysis of mtDNA showed that patients belonging to african haplogroup have increased risk of the development of HF in chagasic ($p=0.012$, OR 2.32) and hypertensive etiologies ($p=0.003$, OR 2.05). It also showed that patients of african haplogroups, specially of ischemic etiology, developed HF earlier than others, and the patients with this haplogroup of valvular etiology had better survival in the study period. AIMs analysis showed that in hypertensive etiology, the major contribution of african genomic ancestry conferred increased risk ($p=0.002$, OR 6.07), while the major contribution of european genomic ancestry conferred decreased risk ($p=0.001$, OR 0.16) to the development of HF; patients with higher contribution of amerindian genomic ancestry had better survival within 4 years. The use of autosomal markers and mtDNA provides more accurate estimates of ancestry of an individual and/or population, while the self-declared ethnicity, indirectly provides important information about socioeconomic and cultural aspects. Thus, it would be interesting to use, especially in admixed populations, the construction of a three-dimensional analysis, which could provide more informative and complementary data in studies of association between ethnicity and phenotypes and/or complex diseases.

Descriptors: Heart failure; Mitochondrial DNA; Haplotypes; Genetic markers; INDEL mutation; Ethnic groups.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. DNA Mitocondrial

Além do genoma nuclear, as células eucariotas possuem DNA nas mitocôndrias, que são organelas que apresentam membrana dupla e estão presentes no citoplasma, sendo responsáveis por diversos processos, tais como: a oxidação do piruvato, o ciclo de Krebs, o metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos e esteroides. Entretanto, provavelmente sua característica mais importante seja a geração de energia, como o trifosfato de adenosina (ATP) por meio da cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa (DiMauro e Schon, 2003). O número de mitocôndrias por célula varia significativamente de acordo com o tipo de célula e a função biológica que exerce, sendo que cada célula contém, em média, de 10 a 100 mitocôndrias; por sua vez, cada mitocôndria contém, aproximadamente, de 2 a 10 cópias de DNA. Portanto, o DNA Mitocondrial (mtDNA) está presente em aproximadamente 500-2000 cópias por célula (Budowle et al., 2003; Holland e Parsons, 1999).

O genoma mitocondrial é composto por 16.569 pares de base (pb) e apresenta-se como uma dupla fita circular, sendo uma fita rica em purinas, denominada de fita ou cadeia H (*heavy*) e a outra fita rica em pirimidinas, denominada de fita ou cadeia L (*light*) (Anderson et al., 1981). Trata-se de uma molécula que não sofre recombinação e, portanto, seu genoma é herdado maternalmente de forma integral, como um haplótipo (Budowle et al., 2003), salvo raras mutações que podem ocorrer de uma geração a outra (Brandstätter et al., 2004; Howell et al., 1996; Parsons et al., 1997). A sequência completa do genoma mitocondrial humano foi determinada em 1981 por Anderson e colaboradores, posteriormente reanalisada e revisada em 1999 por Andrews e colaboradores, que fizeram correções em 11 posições, renomeando a sequência de *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS), que é a sequência utilizada como padrão, ou referência, até os dias de hoje.

Aproximadamente 92% da molécula do mtDNA é formada por uma região denominada codificadora, onde existem mapeados um total de 37

genes, que codificam constituintes dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e de um complexo da ATP sintase, sendo que treze desses genes codificam proteínas integrantes desses complexos. Os demais genes codificam RNAs transportadores (22 genes) suficientes para a tradução dos RNAs mensageiros mitocondriais e RNAs ribossomais (2 genes) (Anderson et al., 1981; Brandon et al., 2005; Budowle et al., 2003). Uma porção menor, aproximadamente 8% (~1.200pb), do mtDNA é constituída por uma região denominada de “não codificadora”, também conhecida como região controle ou *D-loop*. A denominação de região controle refere-se ao fato desta região conter os promotores para a transcrição gênica e as origens para a replicação da molécula. O termo *D-loop* se refere à fase inicial de replicação, quando a nova fita recém-sintetizada se desprende da fita molde formando uma “alça” ou “*loop*” (Clayton, 1991; Shadel e Clayton, 1997). A estrutura geral da molécula de mtDNA está representada na Figura 1.

Figura 1: Representação gráfica da molécula de mtDNA humano, evidenciando as localizações dos diversos genes na Região Codificante e a Região Controle (*D-loop*). Fonte: Adaptado de Holland, 2012.

A região controle é caracterizada por apresentar três segmentos altamente polimórficos na população humana, conhecidos como Regiões Hipervariáveis 1, 2 e 3, ou HV1, HV2 e HV3, respectivamente. A região HV1 está localizada entre os nucleotídeos 16024 e 16365, a região HV2 engloba o

segmento dos nucleotídeos 73 ao 340 e a região HV3 está entre os nucleotídeos 438 e 574 (Greenberg et al., 1983; Lutz et al., 1997). O termo hipervariável está relacionado à alta taxa de mutação dessa região, sendo que a taxa de mutação pontual no genoma nuclear é de cerca de 10^{-9} base por ano, enquanto que o mtDNA apresenta uma taxa de mutação que é cerca de 10 vezes mais elevada na região codificante (10^{-8} base por ano) e 100 vezes no *D-loop* (10^{-7} base por ano) (Ingman et al., 2000). Isso se deve ao fato das mitocôndrias serem grandes geradoras de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* (ROS)) e radicais livres provindos da cadeia respiratória, resultando em um ambiente propício as mutações no seu DNA, além da ausência de histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear. Além disso, a enzima DNA *polimerase* mitocondrial possui baixa fidelidade quando comparada à DNA *polimerase* nuclear, e apresenta um mecanismo de reparo do mtDNA com baixa atividade (Brandon et al., 2005; Lee e Johnson, 2006; Maruszak et al., 2006).

As várias moléculas de mtDNA dentro da mitocôndria podem estar em homoplasmia, sem cópias mutadas, ou em heteroplasmia, quando há linhagens diferentes de mtDNA (cópias mutadas e normais) em uma mesma célula, tecido ou órgão. Isso ocorre porque as moléculas de mtDNA se replicam independentemente umas das outras e, portanto, podem sofrer mutações em apenas algumas linhagens (Gray, 1992; Holland e Parsons, 1999).

A heteroplasmia pode se manifestar de duas maneiras: sequência e comprimento (deleção ou inserção). A heteroplasmia de sequência, ou de ponto, tem origem quando duas linhagens de mtDNA diferem pela substituição de uma única base, resultando em uma aparente mistura no sítio heteroplasmático (Figura 2) (Holland e Parsons, 1999; Parson et al., 1998). A heteroplasmia de comprimento é definida quando há variação no número de bases em uma região homopolimérica (tipicamente *C-stretch* [concentração de bases Cs] ou repetições de ACs), podendo formar um padrão característico fora do quadro de leitura a 3' do ponto de heteroplasmia (Figura 3) (Parson et al., 1998). As regiões homopoliméricas de *C-stretch* estão localizadas entre as posições 16184 e 16193 na região HV1, entre os nucleotídeos 303 e 315 em HV2, e entre 568 e 573 em HV3 (Bini e Pappalardo, 2005; Parson et al., 1998;

Torroni et al., 1994). Na região HV3, entre os nucleotídeos 515 e 524, pode ser observada a ocorrência de heteroplasmia de comprimento com adição ou deleção de dinucleotídeos AC_s (Figura 4) (Chung et al., 2005; Lutz et al., 2000a).

Figura 2: Eletroferograma exemplificando uma heteroplasmia de ponto. A: Indivíduo com heteroplasmia de ponto na posição 16278, com a presença das bases T e C. B: Indivíduo com heteroplasmia de ponto na posição 16241, com a presença das bases A e G.

Figura 3: Eletroferograma exemplificando uma heteroplasmia de comprimento na região HV1. A: Indivíduo sem a heteroplasmia de comprimento. B: Indivíduo com heteroplasmia de comprimento devido à presença de um C na posição 16189 (ao invés do T) e a inserção de 1C na posição 16193, resultando em um trecho heteroplasmático, que resulta na leitura fora de fase a 3' do ponto de heteroplasmia.

Figura 4: Eletroferograma exemplificando uma heteroplasmia de comprimento na região HV3. A: Indivíduo sem a heteroplasmia de comprimento, com 5 conjuntos de dinucleotídeos AC. B: Indivíduo com heteroplasmia de comprimento devido à inserção de um dinucleotídeo AC na posição 524. C: Indivíduo com heteroplasmia de comprimento devido à deleção de um dinucleotídeo AC na posição 524.

Outra característica importante do mtDNA é a herança exclusivamente materna, fenômeno que pode ser explicado pela existência de um processo interno de degradação de mitocôndrias masculinas no momento da fecundação (Sutovsky et al., 1999; White et al., 2008). Deste modo, uma mãe carregando uma mutação no mtDNA irá passá-la para todos os seus filhos (independente do sexo), mas apenas suas filhas irão transmiti-la aos seus descendentes. Portanto, o perfil do mtDNA não é exclusivo de um indivíduo, mas compartilhado por todos os parentes biológicos ligados pelo lado materno, que apresentarão a mesma sequência de mtDNA (Case e Wallace, 1981; Giles et al., 1980; Hutchinson et al., 1974).

Entretanto, alguns estudos mostraram que podem ocorrer diferenças pontuais de sequências no mtDNA dentro de uma mesma linhagem materna em posições específicas que apresentam alta taxa de mutação (*hotspots*) (Brandstätter et al., 2004; Howell et al., 1996; Parsons et al., 1997). Estudos evidenciam também que diferenças na presença ou não de heteroplasmias entre as sequências de indivíduos de uma mesma linhagem materna podem ser consequências da chamada “hipótese do gargalo” ou *bottleneck*, sugerindo que, em algum momento da oogênese, ocorra amplificação seletiva de um pequeno número de moléculas de mtDNA, permitindo que um genótipo presente em baixo nível na mãe se torne predominante na geração seguinte (Bendall et al., 1996; Lutz et al., 2000b; Marchington et al., 1997).

O estudo do mtDNA vem adquirindo importância crescente em várias áreas, tais como: estudos populacionais, filogenéticos, clínicos e de genética forense (Bandelt et al., 2012; Chen et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Hudson et al., 2013; Maruszak et al., 2012).

1.2. Haplogrupos Mitocondriais

Dados genéticos atuais suportam a hipótese de uma origem única para os Homens Modernos, a partir de uma população de *Homo sapiens* ancestral originária da África há ~150-200 mil anos (modelo *Out of Africa*) (Jin e Su, 2000; Templeton, 2002). Estudos de filogenia do mtDNA têm desempenhado

um papel fundamental nesse modelo, corroborando a ideia de que as populações humanas modernas resultaram de uma diferenciação relativamente recente (Cann, 2001; Cavalli-Sforza e Feldman, 2003; Mellars, 2006).

O estudo que estimulou a utilização do mtDNA em genética populacional foi publicado por Cann e colaboradores em 1987 que, analisando 147 amostras provenientes de várias regiões geográficas, demonstraram que as amostras africanas possuíam maior diversidade que as remanescentes e se localizavam na raiz da árvore filogenética (Cann et al., 1987). Com esse estudo, coube a interpretação de que a população africana era a mais antiga dentre todas, sendo favorável à hipótese de *Out of Africa*. Tal estudo permitiu ainda deduzir o tempo decorrido desde que a linhagem feminina migrou do leste da África, em direção a diferentes continentes, cerca de 150-200 mil anos. Ao longo desse trajeto de migrações e ocupações dos continentes, houve acúmulo de mutações que hoje aparecem em altas frequências nas populações e são vistas como polimorfismos continente-específicos (Behar et al., 2008).

Assim, o mtDNA humano funciona como um registro molecular da história genealógica e das migrações das mulheres, que transmitiram o seu mtDNA ao longo de várias gerações (Torroni et al., 2006). Por meio de uma análise detalhada do genoma mitocondrial em diferentes populações foi possível chegar às seguintes conclusões: a) todas as mutações se originaram de uma única árvore genômica; b) muitas das mutações no mtDNA estão altamente relacionadas com a origem étnica e geográfica de um indivíduo e c) o maior número de polimorfismos é encontrado na população africana, que deu origem às demais (Ingman et al., 2000; Nelson et al., 2007; Wallace et al., 1999).

Em 1993, Torroni e colaboradores introduziram um conceito fundamental na área de genética populacional mitocondrial denominado “haplogrupo”. Esse era um estudo populacional com nativos americanos que visava esclarecer a origem, dimensão e tempo das migrações ancestrais para o Novo Mundo a partir da Ásia (Torroni et al., 1993a).

Para definir haplogrupo mitocondrial primeiramente temos que definir haplótipo, que é o conjunto de polimorfismos de um indivíduo. Esses polimorfismos são definidos a partir da comparação da sequência de mtDNA do

indivíduo em questão com uma sequência padrão (ou referência); atualmente a sequência padrão utilizada é a *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) (Andrews et al., 1999). Com isso, podemos agora definir haplogrupo: um haplogrupo refere-se a um grupo de haplótipos que compartilham polimorfismos comuns, que refletem o grupo étnico e a origem geográfica daquela linhagem materna (Budowle et al., 2003; Torroni et al., 1993a). Na prática, um haplogrupo mitocondrial engloba diversos haplótipos que podem ser diferentes, mas que possuem os polimorfismos mínimos específicos daquele grupo. Conforme o aumento no número de diferentes populações estudadas, polimorfismos adicionais população-específicos vão sendo descritos e, portanto, os haplogrupos mitocondriais vão sendo constantemente rearranjados e subdivididos em subhaplogrupos mitocondriais. A Figura 5 ilustra um diagrama de evolução dos haplogrupos mitocondriais de acordo com os polimorfismos encontrados.

Figura 5: Diagrama de evolução de haplogrupos mitocondriais. Os números que se encontram em cada ramificação são os polimorfismos indispensáveis que devem ser encontrados no haplogrupo que foi originado, ou no subhaplogrupo originado. Modelo montado de acordo com as publicações até 2007 (essa figura é parte de um diagrama cedido por Bruno Maia Carvalho, Laboratório de Genética Médica, Universidade Federal do Pará).

Com o estudo de Torroni e colaboradores (1993) foi iniciado o estabelecimento da nomenclatura dos haplogrupos mitocondriais, com as quatro primeiras letras do alfabeto (A, B, C, e D) (Torroni et al., 1993a). Subsequentemente, os demais haplogrupos mitocondriais, de outras populações de diferentes continentes que foram sendo caracterizados, foram designados usando as outras letras do alfabeto, e serão discutidos adiante.

Para distinção da nomenclatura dos haplogrupos mitocondriais, os subhaplogrupos são denominados pelas letras do haplogrupo seguida por números, como por exemplo, os subhaplogrupos U1 e U2, pertencentes ao

haplogrupo mitocondrial U. Os dois subhaplogrupos compartilham os polimorfismos que caracterizam o haplogrupo mitocondrial U, porém os indivíduos do subhaplogrupo U1 compartilham um ou vários polimorfismos adicionais, que são diferentes dos polimorfismos compartilhados pelos indivíduos pertencentes a U2. A nomenclatura para os subagrupamentos adicionais segue a regra letra-número-letra-número, em ordem crescente alfabética e numérica a partir do último grupo publicado (van Owen e Kayser, 2009), como exemplificado na Figura 5.

A seguir, daremos uma ideia simplificada de como foram as ramificações que originaram os principais haplogrupos mitocondriais que existem atualmente. Para maiores detalhes de cada haplogrupo mitocondriais e seus subhaplogrupos, sugere-se a utilização da árvore filogenética disponível no site *PhyloTree* (<http://www.phylotree.org/>) (van Owen e Kayser, 2009).

As linhagens mitocondriais africanas, mais especificamente as do leste, são as mais diversificadas e, portanto, as mais antigas, e estima-se que tenham cerca de 150-200 mil anos (Mellars, 2006). A linhagem africana é atualmente classificada em sete haplogrupos mitocondriais: L0 (mais antigo), L1, L2, L3, L4, L5 e L6 (linhagem mais recente) (van Owen e Kayser, 2009).

Apesar de a África ser importante como o berço da humanidade, ainda continuam a ser assunto controverso as rotas de dispersão para o resto do mundo (Behar et al., 2008). Existem duas hipóteses principais de rota. A primeira é que a expansão inicial ocorreu via norte da África e do vale do Nilo, com dispersões subsequentes tanto para o oeste da Europa, quanto para o leste em direção à Ásia (Hublin, 2000; Lahr e Foley, 1998). A segunda diz que a dispersão inicial ocorreu da Etiópia, do outro lado do Mar Vermelho, e então para o norte através da Arábia e para o leste ao longo da costa do sul da Ásia para a Austrália, a chamada rota "do sul" ou "costeira" (Foley e Lahr, 1997; Lahr e Foley, 1998; Stringer, 2000). Atualmente, a primeira hipótese é a mais aceita (Forster e Matsumura, 2005; Mellars et al., 2006).

Em termos de mtDNA, sabe-se que a linhagem mitocondrial da qual se derivou toda a diversidade observada fora de África é a L3. Essa migração ocorreu cerca de 60.000 anos atrás em direção a Eurásia, tendo sido ramificada e dado origem a dois haplogrupos mitocondriais, M e N que, por sua

vez, ramificaram-se em tantos outros haplogrupos (Figura 6) (Torroni et al., 2006).

Na Europa, o haplogrupo mitocondrial N deu origem aos haplogrupos R, I, W e X e, logo na sequência, o haplogrupo R deu origem aos haplogrupos H, J, T, U, e V, que são encontrados principalmente em populações europeias. Essa irradiação das linhagens europeias ocorreu aproximadamente entre 40-50 mil anos (Mitomap, 2013; Torroni et al., 2006).

Da mesma forma que ocorreu na Europa, cerca de 40.000 anos atrás na Ásia a linhagem N deu origem ao haplogrupo A e Y, o haplogrupo M deu origem a diversos haplogrupos, sendo que os principais são C, D, G e Z, e o haplogrupo R ramificou-se também nos haplogrupos B e F (Kong et al., 2006; Wallace et al., 1999). Em seguida, houve a migração humana para a região da Sibéria, onde apenas os haplogrupos A, C, D e G tornaram-se prevalentes. As condições geladas da época ajudaram a expandir o território da humanidade primitiva. Uma placa maciça de gelo, associada a níveis do mar mais baixos formou uma ponte entre a Sibéria e o Alasca denominada Beringia (Bailliet et al., 1994; Horai et al., 1993; Shields et al., 1993; Torroni et al., 1993b). Por volta de 16-20 mil anos, houve migração de indivíduos dessa região para a costa oeste da América do Norte, ocorrendo assim a dispersão dos haplogrupos A, C e D para as Américas (Torroni et al., 1993b; van Owen e Kayser, 2009). Evidências apontam para o fato de que o haplogrupo B tenha chegado ao continente americano mais recentemente por meio de uma rota alternativa contornando a Sibéria; isso porque esse haplogrupo é potencialmente ausente na Sibéria e raro no norte da América do Norte, e a sua diversidade de sequência em nativos americanos é menor do que a dos haplogrupos A, C ou D (Mishmar et al., 2003; Wallace et al., 1999). Há também o haplogrupo X encontrado no centro-norte da América do Norte que é parente distante do haplogrupo X europeu e, por isso, provavelmente, também chegou à América por meio de uma rota do norte. Este haplogrupo é encontrado em baixas frequências no Norte da África, nas regiões oeste e central da Ásia, na Europa e no extremo norte do continente americano (Brown et al., 1998; Reidla et al., 2003; Wallace et al. 1999).

Um resumo da história migratória dos principais haplogrupos mitocondriais pode ser observado na Figura 6.

Figura 6: Rotas simplificadas da migração humana e distribuição geográfica mundial dos haplogrupos mitocondriais. Fonte: Mitomap, 2013 (<http://www.mitomap.org>).

Com isso, podemos inferir, de acordo com a classificação atual que, os haplogrupos L0, L1, L2, L3, L4, L5 e L6 são africanos, enquanto os haplogrupos A, B, C, D, E, F, G, M, N, Z e Y estão associados com populações asiáticas e ameríndias, e os haplogrupos H, HV, I, J, K, R, T, U, V, W e X estão tipicamente associados com populações europeias; a maioria dos nativos americanos pertence aos haplogrupos A, B, C, D e X, e o haplogrupo S é mais encontrado nas populações da Melanésia (ilhas que se encontram próximas da Austrália) juntamente com os haplogrupos P e Q (Biffi et al., 2010; Ruiz-Pesini et al., 2007; van Owen e Kayser, 2009). A filogenia simplificada dos haplogrupos pode ser observada na Figura 7.

Figura 7: Filogenia simplificada do mtDNA ilustrando o uso de letras do alfabeto para a designação de haplogrupo. A raiz da árvore é indicada pela inscrição mt-mRCA (*matrilineal most recent common ancestor*), o mais recente ancestral comum matrilinear de todos os seres humanos. Os haplogrupos L são as linhagens mais antigas. Haplogrupo L3 deu origem aos haplogrupos M e N, que abrangem toda a variação observada fora da África. Os haplogrupos com asterisco representam todas as linhagens descendentes com um clado particular. Fonte: Phylotree, 2013 (<http://www.phylotree.org>).

1.3. Marcadores Informativos de Ancestralidade

A estrutura genética de uma população é um espelho dos eventos demográficos e evolutivos ocorridos em um dado local, como por exemplo, migrações e miscigenações, e traz consigo marcas da deriva genética e de seleção natural (Pashou et al., 2007). A estrutura genética pode ser estimada com base no entendimento da distribuição da diversidade humana em diferentes populações, por meio de marcadores haplotípicos, como o DNA mitocondrial e o cromossomo Y, ou de marcadores de cromossomos autossômicos (Royal et al., 2010).

Entretanto, os marcadores haplotípicos refletem apenas uma fração do total de ancestralidade genética de qualquer indivíduo, pois o DNA mitocondrial é herdado maternalmente e o cromossomo Y herdado paternalmente, enquanto que os marcadores autossômicos fornecem informações mais completas sobre a ancestralidade individual pois são biparentais, ou seja, com segmentos herdados maternal e paternalmente (Royal et al., 2010).

Alguns marcadores autossômicos são denominados de Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs, do inglês *Ancestry Informative Markers*) e são conceituados como marcadores moleculares que apresentam diferenças significativas de frequências alélicas entre duas ou mais populações distintas, sendo que a medida usada para estimar a ancestralidade genômica populacional ou individual é uma medida simples denominada delta (δ), que reflete essa diferença (Chakraborty et al., 1992; Parra et al., 2003; Shriver et al., 1997).

Qualquer tipo de marcador molecular pode ser considerado um AIMs, contanto que satisfaça a condição de diferença de frequência alélica entre populações, sendo que os mais utilizados são os polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* (SNPs)), pequenas repetições em *tandem* (*short tandem repeats* (STRs)) e os polimorfismos do tipo inserções-deleções (INDELs) (Pfaff et al., 2004; Santos et al., 2010).

Um marcador ideal para distinguir uma população de outras, ou estimar proporções de ancestralidade genômica autossômica em amostras miscigenadas, seria aquele em que um alelo se encontra fixado em uma população enquanto o outro alelo esteja fixado para as demais, fazendo com que δ seja igual a 1,00 (Pfaff et al., 2004). Entretanto, tais alelos são raros quando se aborda duas ou mais populações parentais (Pfaff et al., 2004). Portanto, a diferença de frequência alélica (δ) indicada para que um AIM seja considerado adequado para estimar a ancestralidade genômica deve ser de valores superiores a $\delta \geq 0,30$; todavia quanto maior o valor de delta, mais informativo é o marcador (Collins-Schramm et al., 2002; Parra et al., 1998; Shriver et al., 1997).

Existem diversos tipos de painéis de AIMs, podendo ser compostos por marcadores do tipo SNPs, STRs ou INDELs. Atualmente, existem vários kits de painéis comercializados com diferentes quantidades de marcadores (30 AIMs, 48 AIMs, 4.300 AIMs, etc) (Giolo et al., 2012; Pepinski et al., 2013; Tandon et al., 2011), e vários painéis produzidos *in house* (Enoch et al., 2006; Pereira et al., 2012; Santos et al., 2010).

Diversos estudos utilizam como informações de populações parentais as do projeto internacional HapMap (Galanter et al., 2012). O HapMap tem, até o

momento, genotipados quase três milhões de SNPs de ancestralidade africana, europeia e asiática; entretanto, existem poucos dados disponíveis de outras populações, principalmente de nativos americanos (Galanter et al., 2012; Winkler et al., 2010). Alguns estudos preferem utilizar as informações de populações parentais originadas do projeto *Human Genome Diversity Cell Line Panel* (HGDP-CEPH) (Enoch et al., 2006; Manta et al., 2013; Tandon et al., 2011), que contém 1050 indivíduos de 52 populações do mundo (Manta et al., 2013). Alternativamente, alguns grupos preferem construir seus próprios painéis de populações parentais de acordo com a população estudada (Pereira et al., 2012; Santos et al., 2010).

É importante salientar que, ao se construir painéis de populações parentais, é preciso considerar sempre os primeiros colonizadores da região avaliada para garantir a inclusão de informações genéticas fiéis àquela população estudada (Galanter et al., 2012; Winkler et al., 2010). Por exemplo, no caso da população brasileira, a ancestralidade genômica autossômica ameríndia não deve ser avaliada em painéis que tenham como populações parentais, as populações ameríndias do México, Peru, etc, já que essas populações apresentam variações genéticas distintas da nossa (Price et al., 2007; Silva-Zolezzi et al., 2009; Winkler et al., 2010). Nesse caso, as análises devem ser realizadas com o uso de painéis com população parental ameríndia da Amazônia, por exemplo, pois representam melhor nossa composição de ancestralidade ameríndia (Pereira et al., 2012; Santos et al., 2010).

Para a estimativa de ancestralidade genômica autossômica podem ser usados tanto os painéis de SNPs, STRs e INDELs desde que exista uma boa diferença de frequência alélica entre os AIMS, e que as populações parentais que serão usadas como referências estejam de acordo com a população que será estudada (McKeigue, 2005).

Com a estimativa de ancestralidade genômica autossômica é possível avaliar a influência das variações étnicas no desenvolvimento de doenças, bem como auxiliar em estudos que buscam identificar se um determinado fenótipo tem maior influência genética ou ambiental (McKeigue et al., 2000, 2005). Ou seja, se uma determinada ancestralidade for observada em excesso no genoma do grupo de pacientes e não no grupo de controles, e não havendo um

aumento significativo dessa ancestralidade em um *locus* particular relacionado a doença, isto pode apontar para uma influência maior dos fatores socioculturais (acesso ao cuidado à saúde ou estilo de vida, como dieta e prática de atividade física) para o aparecimento e/ou desenvolvimento da doença avaliada do que a ancestralidade em questão. Por outro lado, se for observada maior contribuição de determinada ancestralidade em um dos grupos, em determinado(s) *locus(i)* ou genótipo(s), pode-se concluir que a ancestralidade genômica está associada ao desenvolvimento daquela doença (Enoch et al., 2006; Mckeigue et al., 2000, 2005; Winkler et al., 2010).

A estimativa de ancestralidade genômica autossômica também pode ser utilizada para evidenciar o efeito de estratificação populacional em estudos de associação genética entre indivíduos não aparentados, principalmente em populações miscigenadas (Enoch et al., 2006; Hoggart et al., 2003; Leite et al., 2011; Pereira et al., 2012). A estratificação populacional refere-se à presença de uma diferença sistemática em frequências alélicas entre os casos e controles de um estudo devido as diferenças de ancestralidade entre esses indivíduos, sendo que a estratificação é uma das principais fontes de resultados espúrios e de baixa reprodutibilidade em estudos caso-controle, podendo causar resultados falso-positivos ou falso-negativos (Enoch et al., 2006; Lins et al., 2011; Pereira et al., 2012). Esse tipo de resultado ocorre com frequência em estudos de associação em populações muito miscigenadas (Enoch et al., 2006; Lins et al., 2011).

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de cruzamentos inter étnicos entre povos de três continentes: colonizadores europeus, principalmente portugueses; escravos africanos e os ameríndios brasileiros (Alves-Silva et al., 2000), resultando na incorporação de várias culturas à brasileira. Consequentemente, as características genótípicas e fenotípicas dessas populações foram adicionadas à nossa população (Salzano e Botolini, 2002). Devido à grande extensão territorial do Brasil, a distribuição desses grupos no território brasileiro não foi homogênea, o que é refletido na composição da população atual (IBGE, 2010).

Assim, nossa população tem alto índice de mistura, fazendo com que as características de aparência física como cor da pele, olhos, cabelos, formatos

dos lábios e do nariz sejam pobres indicadores da origem geográfica dos ancestrais de um indivíduo (Pena, 2005). Corroborando essa afirmação, estudos recentes demonstraram que, muitas vezes, há pouca correlação entre a autodeclaração de cor de pele e a ancestralidade genômica dos indivíduos (Leite et al., 2011; Lins et al., 2011; Parra et al., 2003).

Diante disso, compreendemos a importância de não negligenciar o fato da população brasileira ser bastante heterogênea e possuir grande diversidade genômica, e que isso requer uma atenção especial na realização de estudos de associação.

1.4. Insuficiência Cardíaca

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa, de caráter progressivo e irreversível. Pode ser definida fisiologicamente como falência do coração em propiciar suprimento adequado de sangue, em relação ao retorno venoso e às necessidades metabólicas dos tecidos, ou fazê-lo somente em decorrência de pressões de enchimento ventriculares elevadas (Hunt et al., 2005; Lindenfeld et al., 2010). Essa falência pode ocasionar sintomas clínicos como dispneia, fadiga, intolerância ao esforço físico e retenção de fluídos, acarretando assim edema periférico e pulmonar e, conseqüentemente, alterando a capacidade funcional do indivíduo (Lindenfeld et al., 2010; Marks, 2003).

1.4.1. Fisiopatologia

O ciclo cardíaco tem início quando os tecidos retiram o oxigênio e liberam gás carbônico no sangue, que volta pelas veias para o coração que está em estado de diástole, ou seja, relaxado. Esse sangue chega ao lado direito do coração, entra no átrio direito, depois no ventrículo direito, e é finalmente bombeado para o pulmão. No pulmão, o sangue libera o gás carbônico e recebe oxigênio. Esse sangue reoxigenado vai para o lado

esquerdo do coração, entra primeiro no átrio e depois no ventrículo esquerdo, de onde é bombeado, por meio das artérias, de volta para os tecidos; esse processo de contração do coração é chamado sístole, e com isso reinicia-se o ciclo. Deste modo, o lado direito do coração é responsável pelo retorno do sangue para os pulmões e o lado esquerdo pelo bombeamento de sangue para os tecidos (Guyton, 2002).

A IC se manifesta quando o coração não consegue mais desempenhar uma ou ambas as funções eficientemente, que se desencadeia a partir de uma lesão inicial que acomete o músculo cardíaco, podendo resultar na perda de massa muscular e prejuízo na habilidade do miocárdio de gerar força e manter sua função contrátil adequada (Braunwald et al., 2003; Serrano Jr et al., 2009).

Quando ocorre queda da função cardíaca, mecanismos compensatórios são estimulados procurando fazer a manutenção do débito cardíaco (volume de sangue sendo bombeado pelo coração em um minuto) e subsequente perfusão tecidual. Primeiramente, ocorre uma expansão do volume sanguíneo por retenção de sal e água e taquicardia; em seguida outros mecanismos são ativados, representados principalmente pela ativação neurormonal e remodelamento ventricular. As alterações neurormonais mais importantes consistem em aumento do tônus simpático, atenuação do tônus vagal, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e liberação de hormônios antidiuréticos (Serrano Jr et al., 2009).

1.4.2. Classificação da Insuficiência Cardíaca

As diferentes classificações da IC se complementam e são usadas concomitantemente na prática clínica. A classificação funcional da *New York Heart Association* (NYHA) proporciona um meio simples de classificar a extensão da IC e categoriza os pacientes em uma de quatro categorias baseadas na limitação da atividade física (Quadro 1) (The Criteria Comittee, 1964).

Quadro 1: Classificação funcional da IC de acordo com a *New York Heart Association (NYHA)*.

Classes Funcionais	Limitação clínica do paciente
Classe Funcional I	Aparecimento dos sintomas apenas com esforços extra-habituais. Nenhuma limitação, apesar de doença cardíaca diagnosticada.
Classe Funcional II	Pacientes assintomáticos em repouso, mas que podem apresentar fadiga, dispneia ou palpitações com atividades comuns.
Classe Funcional III	Aparecimento dos sintomas com esforços menores que os habituais. Limitação física moderada.
Classe Funcional IV	Aparecimento dos sintomas em repouso. Grave limitação física.

Apesar de comumente usada, existe uma limitação importante da classificação da *NYHA*, uma vez que ela ignora o fato da IC ser uma doença progressiva. Independente da regressão dos sintomas que pode ser mediada pelo tratamento efetivo, as alterações estruturais cardíacas que determinam a doença não são, na maior parte dos casos, reversíveis e, muitas vezes, continuam progredindo. Para isso a *American Heart Association (AHA)* sugere outra classificação para a IC (Quadro 2) (Hunt et al., 2005).

Quadro 2: Estagiamento da IC segundo a *American Heart Association (AHA)*.

Estágios	Característica clínica do paciente
Estágio A	Pacientes com risco aumentado de desenvolver IC, porém sem alteração estrutural cardíaca, sinais ou sintomas de IC.
Estágio B	Pacientes com doença estrutural cardíaca sem sintomas atuais ou prévios de IC.
Estágio C	Pacientes com sinais e/ou sintomas de IC, atuais ou prévios.
Estágio D	Pacientes com IC refratária ao tratamento tradicional, com indicação de intervenções especializadas.

A IC pode também ser classificada de acordo com suas formas clínicas. Pode ser descrita como aguda ou crônica, do lado direito ou esquerdo, anterógrada ou retrógrada, sistólica ou diastólica e de alto ou baixo débito cardíaco (Quadro 3) (Braunwald et al., 2003; Mosterd e Hoes, 2007).

Quadro 3: Classificação da IC de acordo com as formas clínicas.

Classificação de acordo com as formas clínicas	
De acordo com a o tempo de evolução	<p>Insuficiência cardíaca aguda: falha cardíaca que ocorre subitamente.</p> <p>Insuficiência cardíaca crônica: falha cardíaca que se desenvolve gradualmente. Os sintomas são sutis no começo, mas se tornam mais graves com o passar do tempo.</p>
De acordo com a localização	<p>Insuficiência cardíaca anterógrada: a falha ocorre na contração do coração com dificuldades para ejeção do sangue e baixo débito.</p> <p>Insuficiência cardíaca retrógrada: a falha ocorre no retorno venoso do sangue ao coração com edema pulmonar ou sistêmico.</p>
De acordo com o ventrículo acometido	<p>Insuficiência cardíaca ventricular esquerda: quando o ventrículo esquerdo não consegue bombear sangue suficiente, o sangue reflui para os pulmões, causando edema pulmonar. A falha cardíaca ventricular esquerda geralmente leva à falha cardíaca ventricular direita.</p> <p>Insuficiência cardíaca ventricular direita: o ventrículo direito não é capaz de bombear sangue suficiente para o pulmão. Assim, os fluídos recuam para as veias e capilares, vazando e acumulando nos tecidos, causando edema sistêmico.</p>
De acordo com a fase do ciclo cardíaco	<p>Insuficiência cardíaca sistólica: o coração tem dificuldade para contrair e bombear sangue suficiente. Essa condição causa fraqueza, fadiga e diminui a capacidade de realizar exercícios físicos.</p> <p>Insuficiência cardíaca diastólica: o sangue não consegue retornar ao coração durante a diástole, geralmente devido à pressão elevada por uma dificuldade de relaxamento do coração durante a diástole. Essa condição causa edema sistêmico, pulmonar ou ambos.</p>
De acordo com o débito cardíaco	<p>Insuficiência cardíaca de baixo débito: a disfunção ventricular sistólica acarreta uma queda do débito cardíaco, levando à hipoperfusão tecidual, manifestando-se como fadiga muscular e indisposição.</p> <p>Insuficiência cardíaca de alto débito: ocorre nas condições que exigem maior trabalho cardíaco, seja por aumento da demanda metabólica (por exemplo, anemia grave, sepse) ou pelo desvio do sangue do leito arterial para o venoso através de fístulas artério-venosas (por exemplo, cirrose hepática, hemangioma).</p>

1.4.3. Epidemiologia

Embora a IC não poupe crianças e jovens, essa enfermidade acomete principalmente indivíduos com 65 anos ou mais, que respondem por mais de 80% do total de internações por essa doença. Os avanços científicos e

tecnológicos e as melhores condições socioeconômicas têm possibilitado o aumento da longevidade da população em geral, porém têm acarretado um aumento da incidência e prevalência da IC no mundo (Davenport et al., 2006).

Nos Estados Unidos, no período de 1999 a 2004, um a cada três americanos adultos apresentava uma doença cardiovascular, totalizando 84.700.000 de indivíduos doentes, sendo que destes, aproximadamente, cinco milhões eram portadores de IC. Em 2004 a incidência de IC nos Estados Unidos, em pessoas acima dos 65 anos de idade, aproximava-se de 10 casos em cada 1000 indivíduos (Rosamond et al., 2008).

No ano de 2006, a IC e as cardiomiopatias associadas à IC foram responsáveis por 6,3% dos óbitos no Estado de São Paulo. Em 2007, as doenças cardiovasculares representaram a terceira causa de internações no Sistema Único de Saúde (SUS), com 1.156.136 de hospitalizações, sendo a IC a causa mais frequente de internação por doença cardiovascular (Bocchi et al., 2009). Estima-se que, aproximadamente, 6,4 milhões de brasileiros adultos sofram com essa doença (Batloun et al., 2002; Serrano Jr et al., 2009).

1.4.4. Etiologia

A IC é a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração, podendo ser resultado de fatores originários do coração (doença ou patologias intrínsecas) ou de fatores externos que levam a exigências excessivas do coração. Doenças intrínsecas incluem condições como a cardiomiopatia dilatada e a cardiomiopatia hipertrófica. Os fatores externos que podem resultar em IC, incluem a hipertensão descontrolada e distúrbios hormonais, como no hipertireoidismo (Rosamond et al., 2008).

As diretrizes do *American College of Cardiology* (ACC) e da *American Heart Association* (AHA) consideram como fatores de risco para a IC a hipertensão arterial, obesidade, diabetes, anemia, o hipertireoidismo ou hipotireoidismo, consumo abusivo de álcool e drogas, idade avançada, sexo masculino e doenças do coração como doença arterial coronariana,

valvopatias, cardiomiopatias, miocardites, má formações congênitas, estenose valvular, doenças reumáticas e doença de Chagas (Coviello, 2009).

No Brasil, a principal etiologia da IC é a cardiomiopatia isquêmica crônica associada à hipertensão arterial. Em determinadas regiões geográficas do país e em áreas de baixas condições socioeconômicas ainda existem formas de IC associadas à doença de Chagas, endomiocardiofibrose e a cardiomiopatia valvular reumática crônica, que são situações especiais de IC em nosso meio (Bocchi et al., 2009).

Independente da sua etiologia, a IC tem se tornando um problema de saúde pública devido ao aumento de prevalência, altas taxas de mortalidade e altos custos para o sistema de saúde (Hunt et al., 2005), sendo que nas últimas décadas, a influência dos fenótipos vem sendo utilizada na tentativa de se fazer uma avaliação do prognóstico dos pacientes com IC. Entretanto, em um grande número de casos, pacientes com fenótipos semelhantes evoluem de formas distintas. Há, portanto, a necessidade de um número maior de estudos envolvendo fatores genéticos que possam influenciar em um prognóstico individualizado (Feldman, 2003).

1.5. Haplogrupos e Polimorfismos Mitocondriais Associados com Fatores de Risco para a IC

Esse tópico se destina à descrição de haplogrupos mitocondriais e polimorfismos na região controle do mtDNA que já foram relatados como predispondo à manifestação de enfermidades que são fatores de risco para a IC. Entretanto, esses haplogrupos ou polimorfismos não foram considerados fatores fundamentais para o acometimento dessas doenças, podendo, entretanto, desempenhar um papel significativo nessas enfermidades.

A doença arterial coronariana (DAC) ou aterosclerose coronária é caracterizada pelo estreitamento dos vasos que suprem o coração em decorrência do espessamento da camada interna da artéria devido ao acúmulo de gordura, cálcio, colágeno e outros, reduzindo o fluxo de sangue para o coração. Como o músculo cardíaco requer um fornecimento contínuo de

oxigênio e nutrientes para sobreviver, a obstrução de uma artéria coronária leva a complicações no miocárdio, resultando em IC (Klatsky, 1994). Alguns estudos já relataram associação entre haplogrupos mitocondriais e susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento da DAC em diferentes populações. O haplogrupo W foi descrito como susceptível a DAC em pacientes libaneses (Haber et al., 2012); o haplogrupo T apresentou risco aumentado em pacientes europeus (Kofler et al., 2009), e os haplogrupos A e M7a apresentaram risco para DAC na população Japonesa (Sawabe et al., 2011). O polimorfismo 16189C foi descrito como um fator de predisposição à DAC na população da Arábia Saudita (Abu-Amero et al., 2010) e da Europa Central (Mueller et al., 2011).

O polimorfismo 16189C também já foi descrito como fator de predisposição a outras doenças como a cardiomiopatia dilatada em europeus e sul africanos (Khogali et al., 2001) e em caucasianos da Alemanha (Ruppert et al., 2004), à susceptibilidade a diabetes mellitus do tipo 2 na população da Índia (Bhat et al., 2007), do Brasil (Crispim et al., 2006), do Taiwan (Lin et al., 2005a), da Ásia (Park et al., 2008), do Reino Unido (Poulton et al., 1998, 2002) e da China (Tang et al., 2006a), predisposição à síndrome metabólica na população da Itália (Palmieri et al., 2011) e na população da China (Weng et al., 2005), associado à hipertrofia ventricular esquerda em pacientes diabéticos na população Japonesa (Momiya et al., 2003) e predisposição ao infarto do miocárdio na população da Arábia Saudita (Abu-Amero et al., 2010).

A miocardiopatia é um grupo de doenças do miocárdio associadas com disfunção cardíaca, podendo ser classificada nas formas: dilatada, hipertrófica, restritiva e arritmogênica do ventrículo direito (Richardson et al., 1996). A cardiomiopatia hipertrófica (CMH) é caracterizada pela hipertrofia ventricular desproporcional, sendo que o músculo cardíaco hipertrofiado torna o interior do ventrículo esquerdo menor, de modo que ocorra menor retenção de sangue (Richardson et al., 1996). Há relatos de associação de haplogrupos mitocondriais com a CMH, mas não com as demais formas. O haplogrupo T apresentou susceptibilidade à CMH na população da Espanha (Castro et al., 2006), e o subhaplogrupo M10 na população da China (Wei et al., 2009).

A hipertensão é caracterizada pelo aumento da pressão arterial, tendo como causas a hereditariedade, a obesidade, o sedentarismo, o alcoolismo, o estresse, o fumo, entre outros (Carretero e Oparil, 2000). O subhaplogrupo G2a1 foi descrito como fator de susceptibilidade à hipertensão na população Chinesa (Lu et al., 2011).

A diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) é caracterizada metabolicamente por defeitos na secreção e na ação da insulina, resultando em hiperglicemia em jejum e/ou pós-prandial (Ismail-Beigi, 2012). Diversos relatos descrevem a associação de diferentes haplogrupos com o desenvolvimento de DM2 em populações distintas. O subhaplogrupo N9a foi descrito como um fator de menor risco para DM2 nas populações coreanas e japonesas, enquanto os haplogrupos D5 e F foram associados com um risco aumentado nessas mesmas populações (Fuku et al., 2007; Hwang et al., 2011; Nishigaki et al., 2010). O subhaplogrupo J1 apresentou risco aumentado em pacientes israelenses (Feder et al., 2009) e na população da Finlândia (Mohlke et al., 2005). O subhaplogrupo M9 foi associado a um aumento de risco de DM2 na população da China, sendo que nesse mesmo estudo houve associação também com os polimorfismos 16189C e 16519C (Liao et al., 2008).

O infarto do miocárdio reflete a morte celular dos miócitos cardíacos causada por isquemia prolongada, que é o resultado da falta de aporte adequado de nutrientes e/ou oxigênio (Thygesen et al., 2007). Na população da Espanha houve evidências de associação do haplogrupo H com o infarto do miocárdio (Palacín et al., 2011), sendo que em outro estudo o subhaplogrupo N9b apresentou menor risco de infarto do miocárdio em homens japoneses (Nishigaki et al., 2007).

A síndrome metabólica é um transtorno sistêmico caracterizada por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares que compreendem a hipertensão arterial, obesidade, dislipidemia, resistência a insulina e maior predisposição ao desenvolvimento de DM2 (Eckel et al., 2010). Mulheres japonesas com subhaplogrupos G1 ou D5 mostraram-se mais susceptíveis a essa síndrome; nesse mesmo estudo, o subhaplogrupo N9a mostrou-se como fator de menor risco para a síndrome metabólica (Tanaka et al., 2007). Os haplogrupos HV, H,

J e T apresentaram uma associação com essa disfunção associada à resistência a insulina na população espanhola (Micheloud et al., 2011).

1.6. Marcadores Informativos de Ancestralidade Associados com Fatores de Risco para a IC

As doenças complexas, como as doenças cardiovasculares, são causadas por muitos fatores genéticos e ambientais e suas interações (Wassel et al., 2009). A avaliação de associação entre autodeclaração de cor de pele com doenças complexas é bastante complicada por conta da heterogeneidade dentro dos grupos étnicos e, principalmente, em países como o Brasil onde existe uma grande miscigenação entre os grupos étnicos, dificulta mais a avaliação dessa interação. Assim, a estimativa de ancestralidade genômica autossômica, pelo uso do AIMs, nos permite avaliar se há uma associação entre ancestralidade e uma determinada doença de forma mais segura (Reiner et al., 2007).

Por ser uma técnica relativamente nova, existem poucos estudos que relatam a interação da ancestralidade genômica autossômica e as doenças cardiovasculares.

Em relação ao índice de massa corpórea (IMC) já existem relatos de que maiores proporções de ancestralidade africana estaria associada com o aumento desse índice em indivíduos autodeclarados afro-americanos (Nassir et al., 2012; Tang et al., 2006b), enquanto outros estudos evidenciaram a associação da ancestralidade europeia ao maior risco do aumento do IMC em latino-americanos (Lins et al., 2012; Tang et al., 2006b).

A ancestralidade genômica africana também foi associada ao maior risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Cheng et al., 2012; Reiner et al., 2007; Qi et al., 2012), com a hipertensão (Lai et al., 2009; Kosoy et al., 2012; Shahabi et al., 2013) e com melhor perfil lipídico (Lins et al., 2012; Reiner et al., 2007).

Já a ancestralidade genômica europeia foi associada ao menor risco de DM2 (Florez et al., 2009) e ao maior risco a hipertensão em grávidas, enquanto

que a ancestralidade ameríndia confere menor risco para hipertensão em grávidas (Shahabi et al., 2013)

Embora não possamos excluir a interação dos fatores ambientais, a dieta e fatores socioeconômicos com as diferenças genéticas, os dados apresentados na literatura fornecem apoio adicional para a hipótese de que as diferenças de origens étnicas (uniparental e biparental) são importantes de serem avaliadas em estudos epidemiológicos para melhor entendimento de doenças complexas, como a insuficiência cardíaca.

1.7. Aplicações das Informações de Autodeclaração de Cor de Pele, Haplogrupos Mitocondriais e Marcadores de Ancestralidade Genômica Autossômica

Ao longo das últimas décadas, vários estudos têm revelado a existência de diferenças étnicas associadas a determinadas doenças, a morbimortalidade e ao comportamento em relação ao diagnóstico e tratamento de doenças (Bibbins-Domingo et al., 2009; Ergul, 2000; Yancy, 2005). Ao mesmo tempo em que pesquisas em saúde avaliam tais diferenças, dúvidas tem sido levantadas quanto à validade do uso das informações das variáveis étnicas de cor de pele nessas associações (Fernández et al., 2004; Laguardia, 2004).

A informação de autodeclaração de cor de pele é composta por componentes ambientais e hereditários (Fernández et al., 2004) e, portanto, deve ser compreendida, não somente pelo ponto de vista biológico, mas também como uma variável social que traz em si informações sobre a carga das construções históricas e culturais de uma população (Bastos et al., 2008; Fernández et al., 2004; Telles, 2002).

Uma vez que não é possível classificar consistentemente os indivíduos pela cor de pele devido a influência de alguns fatores, como os ambientais, a percepção subjetiva de cor, a escolaridade, o sexo e fatores culturais, o uso dessa variável pode ser útil como marcador de exposições sociais e capturar certas desigualdades às quais estão expostos os indivíduos avaliados, como por exemplo, o acesso ao sistema de saúde (Bastos et al., 2008; Telles, 2002).

Por esses motivos e para tentar minimizar erros associados ao uso da informação da autodeclaração de cor de pele, estudos recentes têm utilizado os marcadores haplotípicos (DNA mitocondrial e o cromossomo Y) e os marcadores de cromossomos autossômicos (AIMs) para melhor avaliar e classificar etnicamente e biologicamente as populações e os indivíduos, dentre outras aplicações (Lee et al., 2011; Leite et al., 2011; Pena, 2005).

O estudo do mtDNA tem sido usado, principalmente, com o intuito de investigar linhagens antigas da espécie humana, uma vez que ele é herdado maternalmente, não se recombina e apresenta alta taxa de mutação e, portanto, é uma ferramenta importante para os estudos de filogenia (Gonçalves et al., 2013; Levin et al., 2013; Schon et al., 2012).

Com a análise de polimorfismos específicos no mtDNA as populações humanas podem ser divididas em vários haplogrupos mitocondriais (Taylor e Turnbull, 2005). Embora os polimorfismos que caracterizam os haplogrupos mitocondriais sejam, teoricamente, evolutivamente neutros, eles podem ser responsáveis por alterações sutis na transcrição, tradução de proteínas e replicação mitocondrial que, coletivamente e ao longo do tempo, podem influenciar no risco de diversas doenças (Rosa et al., 2008). Assim, os estudos de associação de haplogrupos mitocondriais são também utilizados para definir o papel das mutações no mtDNA e dos grupos étnicos em doenças complexas (Rosa et al., 2008; Schon et al., 2012; Taylor e Turnbull, 2005).

No entanto, as associações dos haplogrupos mitocondriais observadas com doenças complexas não podem ser atribuídas simplesmente a SNPs específicos, mas devem ser interpretadas juntamente com a existência de um “*background*” genético, tanto nuclear como mitocondrial, atuando de forma sinérgica com fatores ambientais (Schon et al., 2012; Taylor e Turnbull, 2005).

Os marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) são analisados como variáveis contínuas para inferir as misturas demográficas das populações, permitem avaliar a influência das variações étnicas no desenvolvimento de doenças e identificar a estratificação populacional em estudos de associação (McKeigue, 2000; 2005).

De acordo com essas informações podemos entender que a análise do mtDNA fornece informações de apenas um antepassado, enquanto que a

ancestralidade genômica autossômica, inferida pelos AIMS, fornece informações da mistura genética de todos os antepassados, enquanto que a autodeclaração de cor de pele fornece informações socioculturais de um determinado indivíduo. Por isso, é interessante o uso de uma análise tridimensional contendo as três variáveis, pois cada uma fornece informações diferentes e que são complementares.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

➤ **Geral**

Avaliar a relação entre haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica no desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

➤ **Específicos**

- ❖ Analisar os polimorfismos nas sequências de DNA mitocondrial dos grupos de controles e pacientes com insuficiência cardíaca;
- ❖ Avaliar a associação dos haplogrupos mitocondriais entre o grupo de controles e pacientes com insuficiência cardíaca;
- ❖ Comparar a informação de autodeclaração de cor de pele com os dados de haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica autossômica no grupo de pacientes;
- ❖ Avaliar a associação entre haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica autossômica com as diferentes etiologias da insuficiência cardíaca existentes dentro do grupo de pacientes;
- ❖ Avaliar a associação entre a idade de aparecimento dos sintomas da doença com os haplogrupos mitocondriais;
- ❖ Avaliar a associação entre os haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica autossômica com a sobrevida dos pacientes com insuficiência cardíaca.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Pacientes com Insuficiência Cardíaca

Foram incluídos nesse estudo 503 pacientes diagnosticados com IC e classificados como classe funcional III ou IV, de acordo com a *New York Heart Association* (The Criteria Committee, 1964). O diagnóstico de IC foi realizado de acordo com os critérios de *Framingham*, que se baseiam na presença simultânea de pelo menos dois critérios maiores ou um critério maior em conjunto com dois critérios menores. As características consideradas como critérios maiores são: dispneia paroxística noturna; turgência jugular; crepitações pulmonares; cardiomegalia (à radiografia de tórax); edema agudo de pulmão; terceira bulha (galope); aumento da pressão venosa central; refluxo hepatojugular; perda de peso > 4,5 kg em 5 dias em resposta ao tratamento. As características consideradas como critérios menores são: edema de tornozelos bilateral; tosse noturna; dispneia a esforços ordinários; hepatomegalia; derrame pleural; diminuição da capacidade funcional em um terço da máxima registrada previamente; taquicardia (Frequência Cardíaca >120 bpm (batimentos por minuto)) (McKee et al., 1971).

As classificações das etiologias da IC seguiram recomendações baseadas nos sinais e sintomas apresentados pelo pacientes e em exames realizados (Hunt et al., 2005; Richardson et al., 1996).

Dos 503 pacientes, 491 são nascidos em São Paulo, 4 em Minas Gerais, 2 na Bahia, 2 no Distrito Federal, 2 no Rio de Janeiro, 1 em Rondônia e 1 indivíduo nascido no Mato Grosso do Sul.

Esses pacientes foram acompanhados pelo grupo do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LIM13) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo que os dados clínicos e históricos foram obtidos a partir de seus prontuários.

As amostras de DNA utilizadas nesse estudo fazem parte do Banco de DNA do LIM13 e foram cedidas para colaboração pelo Dr. Alexandre da Costa Pereira.

Para a realização do nosso estudo, houve uma seleção dentro do Banco de Pacientes com IC do LIM13 para as seguintes características: diagnosticado entre 1995 e 2005, avaliação ecocardiográfica sequencial com a finalidade de estabelecer o diagnóstico etiológico da IC e acompanhamento clínico de morte e/ou transplante cardíaco por um período de 4 anos.

Após esse período de 4 anos os pacientes foram avaliados em uma última consulta ambulatorial médica ou por contato telefônico. Nos casos em que não foi possível esse último contato, foi realizada uma busca no banco de dados de mortalidade de São Paulo (ProAim- Programa de Aprimoramento de Informações de Mortalidade do Município de São Paulo), para obter informação a respeito da possível morte desses pacientes.

3.1.2. Controles

O grupo de controles consta de 188 indivíduos saudáveis, residentes da cidade de São Paulo, não aparentados, que não apresentam histórico de qualquer doença cardiovascular. As amostras de DNA desses indivíduos foram provenientes do Banco de DNA do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LIM13) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e também cedidas para colaboração pelo Dr. Alexandre da Costa Pereira.

As amostras do grupo de controles somente foram usadas na comparação geral entre haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica autossômica com o grupo total de pacientes portadores de IC. As demais análises foram realizadas intragrupo em relação às diferentes etiologias que compõem o grupo de pacientes, uma vez que não conseguimos grupos de indivíduos controles específicos para cada etiologia.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Protocolo nº1382/09).

3.2. Métodos

As amostras de DNA dos pacientes e controles são provenientes de sangue periférico total e foram previamente coletadas, extraídas e fazem parte do Banco de DNA do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LIM13) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2.1. Amplificação do mtDNA

A região controle do mtDNA foi amplificada e analisada em todas as amostras para composição dos haplótipos (sequências) e classificação dos respectivos haplogrupos.

Os DNAs foram amplificados por uma única reação de PCR, utilizando *primers* que foram desenhados exclusivamente para esse projeto com o uso do programa **Primer3** (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). O segmento amplificado refere-se à sequência do nucleotídeo 15879 ao 727, contendo 1417pb, abrangendo as três regiões de interesse (HV1, HV2 e HV3). Os *primers* utilizados foram L15879 (5'-AATGGGCCTGTCCTTGTAAGT-3') e H727 (5'-AGGGTGAAGTCACTGGAACG-3').

As reações de PCR foram conduzidas em um volume total de 10µl, contendo 50ng de DNA genômico, 2,5 pMol de cada *primer* (Invitrogen Life Technologies), 1,25mM de dNTP (Invitrogen Life Technologies) e 0,75U de *Taq polimerase Platinum* (Invitrogen Life Technologies). A ciclagem térmica foi realizada em termociclador Mastercycler (Eppendorf), com condições de desnaturação inicial por 1 minuto a 95°C, seguido de 36 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 95°C, anelamento por 1 minuto a 60°C e extensão por 1 minuto a 72°C e uma extensão final por 7 minutos a 72°C.

Após este procedimento, foi realizada a purificação dos produtos de PCR com a utilização de *Exonuclease I* e *Shrimp Alkaline Phosphatase*

(EXO/SAP, Thermo Scientific Fermentas), segundo recomendações do fabricante.

3.2.2. Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados com a utilização do *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme protocolo do fabricante. As amostras foram sequenciadas nas duas direções, *forward* e *reverse*, utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR, L15879 e H727, respectivamente. Nas amostras que apresentaram heteroplasmia de comprimento nas regiões HV1 ou HV2 foram usados adicionalmente os *primers* H16548 (5'-GGGAACGTGTGGGCTATTTA-3') e L16413 (5'-TGAAATCAATATCCCGCACA-3'), respectivamente, em uma nova reação de sequenciamento.

Após as reações de sequenciamento, foi realizada eletroforese capilar com a utilização do sequenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados em software específico denominado BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

As sequências individuais foram comparadas com a sequência padrão *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) (Andrews et al., 1999) utilizando o programa de alinhamento *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Os polimorfismos são apresentados como sendo diferenças em relação à sequência referência rCRS. Todos os polimorfismos observados só foram considerados reais quando confirmados pelo sequenciamento da fita reversa, e foram anotados seguindo especificações de comitês internacionais e da literatura da área (Bandelt e Parson, 2008; Lee et al., 2006; Salas et al., 2005; Wilson et al., 2002).

Para definição final do haplótipo foi utilizado o programa *Haplosite* (<http://www.haplosite.com/haplosearch/>). Esse programa fornece o haplótipo da amostra por meio da comparação entre a sequência referência (rCRS) informada pelo usuário e a amostra questionada.

A partir dos haplótipos finais individuais, foi possível a classificação dos haplogrupos mitocondriais. Para essa classificação foi utilizado o *Haplogrep* (<http://haplogrep.uibk.ac.at/>), que é um aplicativo da web, baseado em dados do site *Phylotree*, que utiliza algoritmos para a classificação automática dos haplogrupos mitocondriais. O programa apresenta como resultado a posição filogenética do respectivo haplogrupo, em forma de árvores filogenéticas, proporcionando assim, uma explicação detalhada de como e porque o indivíduo foi melhor classificado naquele haplogrupo, fornecendo também recomendações de polimorfismos que devem ser analisados para obtenção de um resultado mais preciso. Para a confirmação dos haplogrupos mitocondriais obtidos pelo site *Haplogrep* foi utilizado o site *Phylotree* (<http://www.phylotree.org>), que fornece árvores filogenéticas do DNA mitocondrial humano baseadas em polimorfismos das regiões controle e codificadora (van Owen e Kayser, 2009).

Para as análises das frequências dos polimorfismos encontrados e para conferir a existência de seus relatos anteriores, foi consultado o banco de dados do genoma mitocondrial humano, *MITOMAP* (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>). Esse banco relata dados publicados e não publicados sobre as variações do mtDNA humano e fornece as frequências de acordo com o *GenBank*.

Todas as sequências dos indivíduos do grupo de controles foram validadas pelo *EMPOP database* (*European DNA Profiling mtDNA Population Database*) e fazem parte desse Banco. As amostras do grupo de pacientes foram depositadas no banco de dados *NCBI GenBank* com os seguintes números de acesso: KC676330-KC676585 e KC688421-KC688674.

3.2.3. Avaliação da Ancestralidade Genômica Autossômica

A avaliação da ancestralidade genômica foi realizada com a utilização de quarenta e oito marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) de cromossomos autossômicos do tipo inserção-deleção (INDELs), selecionados com base em três critérios principais: (1) grandes diferenças nas frequências

alélicas ($\delta \geq 40\%$) entre africanos, europeus e ameríndios, (2) mapeamento em cromossomos diferentes ou em diferentes regiões físicas do mesmo cromossomo, e (3) tamanho variável entre 3 e 40 pares de bases (pb) para permitir a genotipagem simultânea de múltiplos marcadores. O processo de seleção foi baseado em dados de Weber et al. (2002) e do banco de dados on-line da Mashfield Clinic (*Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms database*). Foram selecionados 16 marcadores de ancestralidade africana, 16 marcadores de ancestralidade europeia e 16 marcadores de ancestralidade ameríndia, apresentando valores altos de δ entre africanos versus europeus ou ameríndios (Santos et al., 2010). Os *primers* para amplificação desses marcadores foram desenhados com o uso do programa Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Os 48 INDELs foram avaliados em três populações parentais, sendo o grupo parental ameríndio composto por tribos indígenas provenientes da região amazônica do Brasil, o grupo parental europeu composto por populações naturais de Portugal e o grupo parental africano composto por populações naturais da África subsaariana (Angola, Moçambique, Zaire, Camarões e Costa do Marfim). Os resultados obtidos indicaram que o painel de 48 INDELs apresenta uma distinção clara entre as três populações avaliadas, com valor de $\delta \geq 0,45$, sendo assim, validado e adequado na estimativa de ancestralidade genômica autossômica (Francez et al., 2012; Pena et al., 2011; Santos et al., 2010).

As amostras de DNA foram genotipadas para os 48 INDELs por meio de três amplificações do tipo 16-plex PCR. Todas as reações de multiplex PCR foram realizadas em um volume final de 12,5 μ l contendo 10ng de DNA, 10 μ Mol de *primers forward* e *reverse* e 60 μ l de Taq PCR Master Mix (Quiagen). As condições de termociclagem do PCR foram: 11 minutos a 95°C para a desnaturação inicial, seguido por 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 60°C e 2 minutos de extensão a 70°C seguidos por 17 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 90°C, 1 minuto de anelamento a 60°C e 2 minutos de extensão a 70°C e uma extensão final de 60 minutos a 60°C.

Após a reação de PCR, 1 µl do produto foi adicionado a um mix contendo 8,7µl de formamida deionizada *HI-DI* (Applied Biosystems) e 0,3µl *GeneScan 500 LIZ size standard* (Applied Biosystems). Em seguida, foi realizada eletroforese capilar no sequenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems) e os resultados analisados com software GeneMapper IDv3.2 (Applied Biosystems).

Para estimar a proporção de ancestralidade genômica autossômica ameríndia, europeia e africana em cada indivíduo, foi aplicado um algoritmo de agrupamento, utilizando o software *STRUCTURE* versão 2.2 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>). Este software utiliza genótipos *multilocais* para inferir a estrutura de cada população e informa probabilisticamente a proporção de ancestralidade genômica dos indivíduos das diferentes populações. A gama de possíveis populações parentais testada foi de K=3 e como parâmetros assumimos o modelo de mistura, correlacionando as frequências alélicas, usando 100.000 *burn-in steps* seguidos por 500.000 interações de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC).

Os procedimentos e análises dos marcadores de ancestralidade genômica autossômica foram realizadas no Laboratório de Genética Humana e Médica na Universidade Federal do Pará (UFPA) com colaboração do Dr Sidney dos Santos e da Dr^a Ândrea Ribeiro-dos-Santos.

3.2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences* - SPSS 14.0, para Windows.

As variáveis categóricas estão apresentadas com seus valores absolutos (n) e suas proporções (%). As variáveis contínuas foram tabuladas com sua Média e Desvio Padrão ($\pm$ DP). A regressão logística foi usada para determinar a associação dos haplogrupos mitocondriais e da ancestralidade genômica autossômica com a IC após a correção de covariáveis como: idade, sexo e hipertensão.

O Odds Ratio (OR) com intervalos de confiança (I.C.) de 95% foi calculado para estimar a força de associação dos haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica autossômica com a IC, sendo considerado o limiar para a significância estatística definido com um *p-value* <0,05.

Foram calculadas as idades médias dos pacientes para o início dos sintomas da IC, avaliada a sobrevida deles e construídas as curvas de Kaplan-Meier. As diferenças entre as curvas foram avaliadas com o uso do método estatístico de *log-rank* (Mantel-Cox). Nas variáveis contínuas, somente foi realizado o teste de *log-rank*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados no mesmo item para facilitar a discussão dos diferentes tópicos.

Na primeira parte, serão apresentados os resultados comparativos referentes aos marcadores de ancestralidade autossômica, aos polimorfismos das sequências do mtDNA e aos haplogrupos mitocondriais, entre os grupos de pacientes e controles, seguido da discussão dos mesmos.

Na segunda parte, serão apresentados os resultados somente do grupo de pacientes, com comparação intragrupo, estratificados por autodeclaração de cor de pele, etiologias, idade média dos pacientes para o início dos sintomas da doença e de sobrevida, assim como a discussão dos mesmos.

Os resultados individuais referentes aos haplogrupos mitocondriais e às médias dos marcadores de ancestralidades, para ambos os grupos, assim como os dados de autodeclaração de cor de pele do grupo de pacientes estão disponíveis nas tabelas do Anexo.

4.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE OS GRUPOS DE PACIENTES E CONTROLES

4.1.1. Análise da Ancestralidade Genômica Autossômica na Amostra de Estudo

Nesse estudo, foi utilizado um painel de 48 AIMS do tipo INDEL capaz de identificar as proporções de ancestralidade genômica autossômica individual e global. Os resultados da ancestralidade global dos 188 controles e 503 pacientes estão representados na Tabela 1 e no Gráfico 1.

A maior contribuição de ancestralidade, tanto no grupo de controles quanto no grupo de pacientes, foi a da ancestralidade genômica europeia, com médias de contribuição de 61,2% ($\pm 19,3\%$) e 59,4% ($\pm 20,3\%$), respectivamente, seguida da ancestralidade genômica africana, com médias de contribuição de 24,2% ($\pm 18,1\%$) e 26,1% ($\pm 18,8\%$), respectivamente, e por fim a ancestralidade genômica ameríndia, com médias de contribuição de 14,6% ($\pm 9,8\%$) e 14,5% ($\pm 10,0\%$), respectivamente. Esses resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, evidenciando a não estratificação populacional da amostra desse estudo (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição e análise estatística da ancestralidade genômica autossômica nos grupos de controles e pacientes.

INDEL	Controles		Pacientes		<i>p-value</i>
	Média	DP $\pm$	Média	DP $\pm$	
Africano	0,242	$\pm 0,181$	0,261	$\pm 0,188$	0,273
Europeu	0,612	$\pm 0,193$	0,594	$\pm 0,203$	0,210
Ameríndio	0,146	$\pm 0,098$	0,145	$\pm 0,100$	0,377

Gráfico 1: Representação gráfica da média da ancestralidade genômica dos grupos de controles e pacientes.

A estratificação populacional ocorre, principalmente, em grupos que possuem diferenças nas frequências alélicas entre e intra os subgrupos, ou em populações miscigenadas com diferentes frações de ancestralidade (Enoch et al., 2006; Pereira et al., 2012; Tang et al., 2005). As frequências alélicas são conhecidas por variar amplamente dentro e entre as populações, estando espalhadas por todo o genoma, incluindo diversos genes relacionados à doenças, sendo que essas disparidades surgem em decorrência da história genética e social única de cada população (Cardon e Palmer, 2003; Stephens et al., 2001).

Deste modo, a existência de estratificação populacional em estudos genéticos de associação pode ocasionar resultados espúrios e de baixa reprodutibilidade (Enoch et al., 2006; Lins et al., 2011; Pereira et al., 2012).

Diversos estudos genéticos têm demonstrado que as classificações subjetivas baseadas na autodeclaração de cor de pele, como aquele usado no censo brasileiro, são inadequadas para descrever a real estrutura de populações miscigenadas, como a brasileira (Barnholtz-Sloan et al., 2005; Leite et al., 2011; Lins et al., 2011; Pena, 2005).

A melhor estratégia para identificar a estrutura de uma população e controlar a estratificação populacional em estudos de associação em grupos

miscigenados é a utilização de AIMS (Parra et al., 1998; Pereira et al., 2012; Shriver et al., 1997).

Para fins de pesquisa, os AIMS apresentam uma grande vantagem em relação aos caracteres físicos, pois permanecem constantes durante toda a vida; já os caracteres físicos superficiais podem variar com a idade e fatores ambientais (Enoch et al., 2006; Pena, 2005).

Nossos resultados da análise dos AIMS do tipo INDEL evidenciaram a não estratificação da população avaliada, assim como uma ancestralidade genômica autossômica tri-híbrida da nossa população (europeia, africana e ameríndia), com uma predominância da ancestralidade genômica europeia. Esse dado está de acordo com estudos recentes que também, usando AIMS autossômicos, apontaram existir algumas diferenças de proporções ancestrais dependendo da região geográfica brasileira avaliada ou da informação da autodeclaração de cor de pele (Manta et al., 2013; Pena et al., 2011; Pereira et al., 2012; Santos et al., 2010).

Nossos resultados evidenciaram a não estratificação populacional, o que sugere que o risco de ter resultados falso-positivos e/ou falso-negativos seja minimizado, possibilitando assim a continuação desse estudo.

4.1.2. Caracterização das Sequências Mitocondriais

Para se obter uma avaliação da composição de haplótipos dos grupos estudados, foram analisadas as sequências individuais e agrupadas aquelas que eram idênticas. Para essa etapa, não foram consideradas as heteroplasmias de comprimento decorrentes de inserções e deleções de C_s e de AC_s, e que compreendem o segmento do nucleotídeo 16184 ao 16193 em HV1, do nucleotídeo 309 ao 315 em HV2, o segmento entre 568 ao 573 em HV3 e a região de AC_s no segmento do nucleotídeo 515 ao 524. Assim, indivíduos com haplótipos iguais, mas apresentando variações diferentes no número de C_s e AC_s nessas regiões, foram agrupados juntos, uma vez que sabe-se que essas variações são bastante comuns dentro das populações e mesmo dentro de uma mesma linhagem materna, não sendo utilizadas como

parâmetro de individualidade (Brandstätter et al., 2004; Huhne et al., 1999, Malik et al., 2002).

Dos 503 haplótipos dos indivíduos do grupo de pacientes, 352 (70%) se mostraram únicos (observados em apenas um indivíduo) e 151 (30%) foram haplótipos comuns a mais de um indivíduo. Esses 151 haplótipos comuns foram agrupados em 51 grupos, que variam de 2 a 12 indivíduos em cada um. O haplótipo mais comum foi o 263G 16519C, com 12 indivíduos apresentando essa mesma sequência, que pertence ao haplogrupo R0, o mais comum dentro do oeste da Eurásia e que deu origem aos haplogrupos HV, H e V, que são os haplogrupos europeus mais comuns (Alvarez-Iglesias et al., 2009).

Em relação aos haplótipos dos 188 indivíduos do grupo controles, 147 (78,2%) se mostraram únicos e 41 (21,8%) foram haplótipos comuns a mais de um indivíduo. Esses 41 haplótipos comuns foram agrupados em 16 grupos, que variam de 2 a 6 indivíduos em cada um. O haplótipo mais comum também foi o 263G 16519C, sendo que 6 indivíduos apresentaram essa mesma sequência. A comparação dos dois grupos avaliados não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

Heteroplasmias de ponto foram encontradas em 13 indivíduos do grupo de pacientes (2,6%) (143A/G; 152T/C; 183G/A; 198T/C; 230G/A; 234G/A; 374G/A; 16093C/T; 16120A/G; 16129G/A; 16241A/G; 16278T/C; 16290T/C) e em 4 indivíduos do grupo de controles (2,1%) (146C/T; 16102C/T; 16188C/T; 16217C/T). Essas posições onde foram encontradas as heteroplasmias de ponto são consideradas *hotspots* mutacionais, visto que elas são bastante polimórficas e já foram relatadas mutações frequentes nessas regiões em diversas populações (Mitomap, 2013).

A heteroplasmia de comprimento foi a forma mais comum das heteroplasmias observadas na região controle do mtDNA, em ambos os grupos. Um indivíduo com essa condição tem várias formas de genoma mitocondrial que diferem em comprimento em relação ao número de nucleotídeos C_s ou dinucleotídeos AC_s que são inseridos ou deletados em segmentos homopoliméricos (Melton, 2004). Acredita-se que o mecanismo responsável por isso seja o *strand slippage* que ocorre durante a duplicação da molécula, resultando na infidelidade da DNA *polimerase* em reproduzir o

número de Cs e/ou ACs, aumentando ou diminuindo o número de nucleotídeos original (Malik et al., 2002), gerando sequências heteroplasmáticas.

A região HV1 possui uma sequência de citosinas entre o nucleotídeo 16184 e 16193, interrompida na posição 16189 por uma timina (Anderson et al., 1981; Lutz-Bonengel et al., 2004). A transição dessa T para C na posição 16189, associada ainda em algumas casos à inserção de um ou mais Cs após a posição 16193, caracteriza o mais conhecido caso de instabilidade molecular na região HV1 (Bendall et al., 1996). Quando este fenômeno ocorre, é produzido um trecho homopolimérico ininterrupto que pode conter de 8 a 14 citosinas, variável entre os indivíduos, caracterizando uma heteroplasmia de comprimento (Lutz-Bonengel et al., 2004; Parson et al., 1998).

Foram observados no grupo de pacientes, 190 indivíduos (37,8%) que apresentaram a transição na posição 16189, sendo que 20 (10,5%), desses 190 pacientes, apresentaram ainda a inserção de 1C na posição 16193 e 8 (4,2%) com inserção de 2Cs. No grupo de controles, 64 indivíduos (34%) apresentaram a transição em 16189, 2 desses indivíduos (3,1%) com inserção de 1C em 16193 e 1 indivíduo (1,6%) com inserção de 2 Cs. Alguns exemplos podem ser observados na Figura 8. As frequências e análises estatísticas do polimorfismo 16189C, com a inserção de 1 e 2Cs estão presentes na Tabela 2, evidenciando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados.

Figura 8: Eletroferograma apresentando heteroplasmia de comprimento na região 16193 e a transição no nucleotídeo 16189. A: Indivíduo com inserção de 1C na posição 16193. B: Indivíduo com inserção de 2 Cs em 16193. As setas vermelhas indicam o local da transição de T para C na posição 16189 e as setas pretas indicam a posição das inserções.

Na literatura, têm sido proposta a associação do polimorfismo 16189C com várias doenças multifatoriais, como a síndrome metabólica, doença arterial

coronariana, cardiomiopatia dilatada e outras (Abu-Amero et al., 2010; Khogali et al., 2001; Mueller et al., 2011; Weng et al., 2005). Uma possível explicação para o grande número de associações com esse polimorfismo, poderia ser o fato desta região estar muito próxima da origem de replicação da cadeia H (*heavy*) da molécula de mtDNA, resultando na redução da taxa de replicação e, por conseguinte, provocando um decréscimo de número cópias de mtDNA, bem como da transcrição mitocondrial (Chinnery et al., 2005; Marchington et al., 1997; Park et al., 2008), resultando em diferentes quadros clínicos.

Estudos indicam que, a variante 16189C pode prejudicar a capacidade da célula para responder adequadamente ao estresse oxidativo e aos danos oxidativos (Lin et al., 2005a, 2005b). A diminuição da taxa de replicação, em células com a variante 16189C, pode afetar a eficiência da cadeia de transporte de elétrons, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento de ROS, por sua vez, poderia causar dano mitocondrial e disfunção adicional na cadeia transportadora de elétrons, iniciando, desse modo, um ciclo vicioso (Tsutsui et al., 2011). Tem sido demonstrado que o aumento da produção de ROS é uma característica comum dos fatores de risco para as doenças cardiovasculares (Sawyer, 2011; Tsutsui et al., 2011).

Além disso, tem sido especulado que o polimorfismo 16189T poderia atuar como uma “trava” para o deslizamento da DNA *polimerase* mitocondrial, permitindo que o processo de replicação ocorra normalmente (Liou et al., 2010), o que não ocorre com a presença do polimorfismo 16189C, uma vez que esse processo fica prejudicado por conta do excesso de bases Cs. Outro fato que já foi observado é que, a proteína de ligação na cadeia L (*light*) do mtDNA (*single-stranded DNA-binding protein (mtSSB)*) se liga com maior afinidade na molécula com a variante 16189T do que com a variante 16189C (Chinnery et al., 2005; Marchington et al., 1997; Park et al., 2008). Esta proteína estabiliza a formação do *D-loop* e mantém o mtDNA na sua forma durante o processo de replicação (Takamatsu et al., 2002). Esse dados sugerem que essa variante é bastante interessante de ser avaliada em determinadas doenças. No nosso estudo, como mencionado anteriormente, os dados não evidenciaram associação desse polimorfismo nos grupos analisados (Tabela 2).

Na região HV2, a heteroplasma de comprimento ocorre no segmento homopolimérico de *C-stretch* que contém, originalmente, 7 C_s *upstream* (5') ao nucleotídeo 310T e 5 C_s *downstream* (3'), de acordo com a rCRS (Andrews et al., 1999). Na maioria dos casos, ocorre inserções de citosinas na posição 309 e/ou na posição 315; no entanto, algumas vezes há uma aparente mistura de citosinas e timinas na posição 310 ou ao redor desta (Parson et al., 1998).

Na nossa amostra foi observado, na posição 309, que 261 pacientes (51,9%) apresentaram inserção de 1C, portanto, com 08 C_s, e 59 (11,7%) apresentaram 2 inserções, totalizando 9 C_s. Entre os controles, 95 indivíduos (50,5%) apresentaram 1 inserção e 28 (14,9%) possuíam 2 inserções (Figura 9). Variações dessa sequência já foram observadas em diferentes populações estudadas, sendo que normalmente a quantidade de inserções na posição 309 varia de 1 a 3 (Asari et al., 2008; Lee et al., 2006; Stewart et al., 2001; Vanecek et al., 2004; Zhao et al., 2010). A análise comparativa entre os dois grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

Raramente são encontrados indivíduos com a composição normal de 5 citosinas *downstream* (3') da timina na posição 310 (Asari et al., 2008). Conforme a literatura, em HV2 as sequências onde há apenas a inserção de um C na posição 315 (315.1C) não têm sido consideradas polimórficas por muitos grupos, e sim, como o padrão, já que aparece em quase 100% dos indivíduos (Behar et al., 2012). Mesmo em diferentes populações encontram-se números variados de inserções de C_s na posição 315 (Asari et al., 2008; Lee et al., 2006; Stewart et al., 2001; Vanecek et al., 2004; Zhao et al., 2010). Na nossa amostra de pacientes somente 1 (0,2%) indivíduo apresentou a composição de 5 citosinas, o que não foi observado nos indivíduos do grupo controles. Todos os outros indivíduos do nosso estudo apresentaram apenas 1 inserção na posição 315 (Figura 9).

Figura 9: Eletroferograma apresentando a heteroplasmia de comprimento na região 309 e a inserção de 1C na posição 315. A: Indivíduo com inserção de 1C na posição 309 e na posição 315. B: Indivíduo com inserção de 2 Cs na posição 309 e 1C na posição 315.

Na região HV3, as heteroplasmas de comprimento são encontradas em duas posições distintas, e podem ser observadas tanto na forma de adição ou deleção de dinucleotídeos AC_s (no segmento entre o nucleotídeo 515 ao 524), como na forma de acréscimo de citosinas (entre o nucleotídeo 568 ao 573) (Lutz et al., 2000a; Irwin et al., 2009; Saunier et al., 2009).

A heteroplasma de comprimento na região de AC_s foi observada em 8 indivíduos (1,6%) do grupo de pacientes que apresentaram adição de um único AC na posição 524, resultando em um total de 6 repetições (AC₆) e em 8 indivíduos (1,6%) apresentaram adição de 2 AC_s nesta mesma posição, resultando em 7 repetições (AC₇). Nos controles, 6 indivíduos (3,2%) apresentaram 1 inserção, 1 indivíduo (0,5%) apresentou 2 inserções e 1 indivíduo (0,5%) apresentou 3 inserções, resultando em 8 repetições (AC₈), como exemplificado na Figura 10.

Esse tipo de polimorfismo (AC) foi descrito em diferentes populações com frequências variando entre 0,8% a 5,3% (Brandstätter et al., 2004; Irwin et al., 2009; Lee et al., 2006; Lutz et al., 2000a; Saunier et al., 2009), estando presente em maior frequência na população da República Tcheca e da Coreia (Chung et al., 2005; Vanecek et al., 2004). Em todas as populações citadas foi verificado o acréscimo de 1 ou 2 AC_s. Essa região é considerada um *hotspots* mutacional, ou seja, uma região onde as mutações são observadas com maior frequência, provavelmente devido ao fato da baixa fidelidade da DNA polimerase mitocondrial, que pode ser responsável pela variação no número de AC_s (Chung et al., 2005).

Figura 10: Heteroplasmia de comprimento na região de AC_s, presente entre os nucleotídeos 515 e 524. A: Indivíduo com adição de um AC na posição 524 (AC₆). B: Indivíduo com adição de 2 AC_s na posição 524 (AC₇). C: Indivíduo com adição de 3 AC_s na posição 524 (AC₈).

Nessa mesma região de AC_s podem ocorrer deleções nas posições 523 e 524, que foram observadas na nossa amostra, no grupo de pacientes, em 220 indivíduos (43,7%) e nos controles, em 85 indivíduos (45,2%). Essas deleções são eventos comuns observadas também em diversos estudos populacionais, sendo que a frequência das mesmas tem sido descrita variando entre 9,7% e 42% (Lutz et al., 2000a; Tsutsumi et al., 2006; Vanecek et al., 2004).

Os resultados encontrados e a análise estatística para a análise da heteroplasmia na região *C-Stretch* do HIV3, localizada entre o nucleotídeo 568 ao 573 podem ser observados na Tabela 2 e estão exemplificados na Figura 11.

Essa heteroplasmia foi descrita previamente em diversos estudos, estando presente em uma frequência que varia de 2,3% a 7,1%, com inserções variando de 1 até 7 C_s na região avaliada (Brandstätter et al., 2004; Irwin et al., 2009; Lutz et al., 2000a; Saunier et al., 2009; Tsutsumi et al., 2006). As populações com maiores frequências de inserções de C_s foram às populações japonesa e coreana (Lee et al., 2006; Tsutsumi et al., 2006).

Tabela 2: Análise estatística das variantes da região controle do mtDNA encontradas nos grupos de pacientes e controles.

VARIÁVEIS		CONTROLES (N=188)		PACIENTES (N=503)		p-value	OD (95%IC)
		N	%	N	%		
Sequências Únicas		147	78,20%	352	70,00%	0,397	0,90 (0,69-1,15)
Sequências Comuns		41	21,80%	151	30,00%	0,114	1,38 (0,94-2,02)
Heteroplasmia de Ponto		4	2,10%	13	2,60%	1,000	1,22 (0,39-3,77)
Heteroplasmia de Comprimento	16189C	64	34,00%	190	37,80%	0,562	1,11 (0,80-1,54)
	HV1 16189C+1C	2	3,10%	20	10,50%	0,083	3,74 (0,86-16,2)
	16189C+2Cs	1	1,50%	8	4,20%	0,457	2,99 (0,37-24,1)
	HV2 309.1C	95	50,50%	261	51,90%	0,883	1,03 (0,77-1,37)
	309.2C	28	14,90%	59	11,80%	0,373	0,79 (0,49-1,27)
	524.1AC	6	3,20%	8	1,60%	0,224	0,49 (0,17-1,43)
	524.2AC	1	0,50%	8	1,60%	0,457	2,94 (0,37-23,7)
	524.3AC	1	0,50%	-	-	-	-
	523del+524del	85	45,20%	220	43,70%	0,878	0,97 (0,72-1,31)
	HV3 573.1C	6	3,20%	5	1,00%	0,079	0,31 (0,09-1,01)
	573.2C	1	0,50%	1	0,20%	0,467	0,37 (0,02-5,91)
	573.3C	3	1,60%	3	0,60%	0,352	0,37 (0,07-1,83)
	573.4C	3	1,60%	-	-	-	-
	573.5C	6	3,20%	-	-	-	-
	573.6C	2	1,10%	3	0,60%	0,616	0,55 (0,09-3,33)
	573.7C	-	-	1	0,20%	-	-

Figura 11: Heteroplasmia de comprimento na região C-Stretch, localizada entre os nucleotídeos 568 e 573. A: Indivíduo apresentando inserção de 1C na posição 573. B: Indivíduo com inserção de 2Cs na posição 573. C: Indivíduo com inserção de 5Cs na posição 573. D: Indivíduo com inserção de 7Cs na posição 573.

Além dessas inserções e deleções em regiões de *hotspots* mutacionais, também foram observadas outras 13 inserções e 10 deleções, na região controle do mtDNA (Tabela 3). Com exceção das inserções nas posições 463 e 16285, todas as demais já haviam sido relatadas na literatura e apresentaram baixas frequências em diferentes populações (Mitomap, 2013).

No total, 15 pacientes (3,0%) e 7 controles (3,7%) apresentaram essas inserções não frequentes e 14 pacientes (2,8%) e 4 controles (2,1%) apresentaram essas deleções infrequentes. Somente um indivíduo no grupo de pacientes apresentou simultaneamente uma inserção (56.1A) e uma deleção (71del) e um indivíduo no grupo de controles apresentou também uma inserção (455.1T) e uma deleção (71del).

Alguns desses polimorfismos são característicos de certos haplogrupos. A inserção 44.1C é um polimorfismo característico dos haplogrupos H, D, L1 e X; a inserção 60.1T é característica dos haplogrupos R0 e W; a inserção 291.1A é característica do haplogrupo H, mas já foi descrita como presente nos haplogrupos I, R0, U (Hedman et al., 2007; Saunier et al., 2009); a inserção 374.1A é característica do haplogrupo L3 e a inserção 455.1T é característica dos haplogrupos B, I, L5, N e U (van Owen e Kayser, 2009).

Já a deleção 16166del é característica do haplogrupos M e U; a deleção 16193del é característica dos haplogrupos B e R24, mas já foi descrita como presente no haplogrupo T (Rocha, 2012); a deleção 16325del é característica do haplogrupo L3; a deleção 71del é característica do haplogrupo D, mas já foram observadas outras variações nessa posição em haplogrupos distintos (Jazin et al., 1996); a deleção 309del é característica dos haplogrupos D e U; a deleção 459del é característica do haplogrupo H e a deleção 498del é característica dos haplogrupos K e L0 (van Owen e Kayser, 2009).

Tabela 3: Inserções e deleções presentes na região controle do mtDNA do grupo de pacientes e controles.

	Pacientes			Controles	
	Posição	N (%)	Haplogrupo	N (%)	Haplogrupo
INSERÇÃO	16188.1C	2 (0,4%)	C1b	-	-
	16285.1A	1 (0,2%)	A2	-	-
	44.1C	-	-	1 (0,5%)	HV0
	56.1A	1 (0,2%)	B4b	-	-
	57.1C	1 (0,2%)	R0	-	-
	60.1T	-	-	1 (0,5%)	R0
	71.1G	1 (0,2%)	B4b	-	-
	94.1G	1 (0,2%)	L1c	-	-
	291.1A	1 (0,2%)	L2a	-	-
	291.1T/ 291.2A	1 (0,2%)	K2a	-	-
	374.1A	1 (0,2%)	L3f	-	-
	455.1T	4 (0,8%)	B4b	4 (2,1%)	(2)*B4b; (2)*I1
	463.1C	1 (0,2%)	B4b	1 (0,5%)	B4b
	16166del	1 (0,2%)	U3	-	-
	16193del	-	-	1 (0,5%)	T1
DELEÇÃO	16325del	2 (0,4%)	L3e	-	-
	71del	1 (0,2%)	B4b	1 (0,5%)	B4b
	106-111del	1 (0,2%)	C1b	-	-
	247del	1 (0,2%)	L0a	-	-
	309del	-	-	1 (0,5%)	B4b
	459del	1 (0,2%)	A2	-	-
	498del	4 (0,8%)	(3)*L0d; (1)*K1c	1 (0,5%)	L0d
	513-514del	3 (0,6%)	(2)*L2c; (1)*L3b	-	-

* refere-se ao números de indivíduos no haplogrupo mitocondrial em questão.

O polimorfismo do tipo inserção encontrado na posição 463 foi observado no nosso estudo em apenas 1 indivíduo do grupo de controles, com inserção de 1C (463.1C), e em um indivíduo do grupo de pacientes, com inserção de 2Cs (463.1C 463.2C) nessa mesma posição (Figura 12). Os dois indivíduos pertencem ao subhaplogrupo Ameríndio B4b. A inserção de um nucleotídeo de adenina na posição 16285 só foi encontrada em um indivíduo do grupo de pacientes pertencente ao subhaplogrupo Ameríndio A2 (Figura 13).

Esses parecem ser polimorfismos bastante raros, pois não pudemos encontrar outro relato da sua presença em nenhum trabalho da literatura, nem na sessão de “polimorfismos não publicados” no banco de dados Mitomap, podendo representar uma característica da nossa população (Mitomap, 2013).

Figura 12: Eletroferograma apresentando polimorfismo do tipo inserção na posição 463. A: Indivíduo com inserção de 1C. B: Indivíduo com inserção de 2Cs.

Figura 13: Eletroferograma apresentando polimorfismo do tipo inserção na posição 16285. A: Indivíduo sem a inserção. B: Indivíduo com inserção de 1A na posição 16285.

Além dessas inserções e deleções, observamos na nossa amostra, a presença de uma nova duplicação no mtDNA em um paciente com cardiomiopatia dilatada. O paciente apresentou sintomas de insuficiência cardíaca classe funcional III e foi diagnosticado com cardiomiopatia dilatada não-familiar com disfunção sistólica ventricular esquerda importante. O sequenciamento da região controle do mtDNA foi realizado e verificou-se uma duplicação de 15pb do nucleotídeo 16018 ao 16032 (Figura 14). Parte dessa duplicação está localizada dentro do gene do RNA transportador da prolina (*tRNA^{Pro}*). A prolina tem um importante papel de proteção celular contra o estresse oxidativo e é considerada um fator regulador importante para o equilíbrio das espécies reativas de oxigênio (ROS) celular (Brulé et al., 1998; Krishnan et al., 2008). Esta duplicação pode alterar a estabilidade ou a estrutura secundária do *tRNA^{Pro}*, afetando a síntese de proteínas mitocondriais (Brulé et al., 1998; Krishnan et al., 2008). Por sua vez, a presença da duplicação no *tRNA^{Pro}* poderia causar algum desequilíbrio no estresse oxidativo e, portanto, a disfunção mitocondrial, resultando na patogenicidade.

Esse achado foi publicado pelo nosso grupo recentemente (Cardena et al., 2013a) (Apêndice A).

Figura 14: Eletroferograma apresentando a sequência normal entre o nucleotídeo 16018 ao 16032 (chave preta). B: Sequência do paciente de cardiomiopatia dilatada que contém a duplicação 15pb do nucleotídeo 16018 ao 16032 (chave azul).

4.1.3. Distribuição dos Haplogrupos Mitocondriais

Os resultados da classificação dos haplogrupos mitocondriais mostram que 35,6% (n=67) dos 188 indivíduos do grupo de controles apresentaram haplogrupos mitocondriais africano, 36,2% (n=68) apresentaram haplogrupos mitocondriais ameríndio/asiático e 28,2% (n=53) haplogrupos mitocondriais europeu. Dos 503 pacientes avaliados, 46,5% (n=234) apresentaram haplogrupos mitocondriais africano, 28,2% (n=142) apresentaram haplogrupos mitocondriais ameríndio/asiático e 24,8% (n=127) haplogrupos mitocondriais europeu (Tabela 5; Gráfico 2). A distribuição e análise estatística dos haplogrupos mitocondriais podem ser visualizadas na Tabela 5.

Gráfico 2: Distribuição dos haplogrupos mitocondriais nos grupos de controles e pacientes.

Esses resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sendo que os indivíduos com haplogrupos mitocondriais africano apresentam risco aumentado { $p=0,015$ [OR 1,56 (95% IC.: 1,10-2,21)]} enquanto que os indivíduos com haplogrupos mitocondriais ameríndio apresentam risco diminuído { $p=0,043$ [OR 0,71 (95% IC.: 0,09-0,98)]} para o desenvolvimento da IC em amostras brasileiras (Tabela 5). Entretanto, quando estratificamos os grandes haplogrupos, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum subhaplogrupo (Tabela 5).

Tabela 4: Distribuição e análise estatística dos haplogrupos mitocondriais nos grupos de controles e pacientes.

HAPLOGRUPOS	CONTROLES, N (%)	PACIENTES, N (%)	<i>p-value</i>	OD (95%IC)
AFRICANO	67 (35,6)	234 (46,5)	0,015	1,56 (1,10-2,21)
L0	7 (10,4)	19 (8,1)	0,626	0,78 (0,31-1,93)
L1	17 (25,4)	57 (24,4)	0,877	0,96 (0,52-1,76)
L2	15 (22,4)	69 (29,5)	0,452	1,32 (0,71-2,45)
L3	27 (40,3)	89 (38,0)	0,896	0,95 (0,57-1,57)
L4	1 (1,5)	-	-	-
AMERINDIO	68 (36,2)	142 (28,2)	0,043	0,71 (0,09-0,98)
A	20 (29,4)	50 (35,2)	0,656	1,20 (0,66-2,17)
B	22 (32,4)	47 (33,1)	1,000	0,02 (0,57-1,83)
C	16 (23,5)	25 (17,6)	0,470	0,75 (0,36-1,49)
D	9 (13,2)	12 (8,5)	0,340	0,64 (0,26-1,59)
M	-	5 (3,5)	-	-
N	-	3 (2,1)	-	-
Y	1 (1,5)	-	-	-
EUROPEU	53 (28,2)	127 (25,3)	0,512	0,88 (0,61-1,27)
H	12 (22,6)	40 (31,4)	0,236	1,60 (0,79-3,26)
HV	7 (13,2)	9 (7,1)	0,262	0,54 (0,19-1,52)
I	4 (7,6)	2 (1,6)	0,072	0,21 (0,04-1,17)
J	4 (7,6)	9 (7,1)	1,000	0,94 (0,28-3,18)
K	3 (5,7)	11 (8,6)	0,761	1,53 (0,41-5,71)
R	10 (18,8)	26 (20,5)	0,671	0,84 (0,37-1,90)
T	5 (9,4)	9 (7,1)	0,762	0,75 (0,24-2,35)
U	5 (9,4)	18 (14,2)	0,625	1,50 (0,53-4,26)
V	-	1 (0,8)	-	-
W	1 (1,9)	1 (0,8)	0,507	0,42 (0,03-6,80)
X	2 (3,8)	1 (0,8)	0,215	0,21 (0,02-2,35)
TOTAL	188	503	-	-

Como relatado na Introdução (item 1.5), existem poucos estudos realizados analisando o envolvimento de haplogrupos mitocondriais com as Doenças Cardiovasculares (DC).

Recentemente, um estudo europeu demonstrou associação do haplogrupo mitocondrial europeu H em pacientes com IC que receberam transplante de coração, sugerindo que pacientes com esse haplogrupo mitocondrial apresentam o metabolismo energético aumentado, o que pode contribuir para a progressão da IC (Gallardo et al., 2012). Entretanto, estudos anteriores evidenciaram que se o gasto energético for fracionado pela massa

dos órgãos que apresentam maior gasto energético como, cérebro, coração e fígado, essa diferença de gasto energético desaparece, tornando-se igual entre as etnias (Gallagher et al., 2006; Hunter et al., 2000).

Outros estudos europeus não demonstraram nenhuma associação de haplogrupos mitocondriais com o risco de DC, como as doenças cardiovasculares isquêmicas ou síndromes coronárias agudas (Benn et al., 2008; Chinnery et al., 2010).

Na prática clínica sabe-se que existe maior prevalência e pior prognóstico de doenças cardiovasculares, particularmente para a IC, em adultos negros, possivelmente porque esse grupo traz uma maior carga de fatores de risco como hipertensão e cardiomiopatia (Bibbins-Domingo et al., 2009; Ergul, 2000; Yancy, 2005). Estudos já demonstraram que negros apresenta maior retenção de sódio, o sistema renina-angiotensina menos ativo e menor biodisponibilidade de óxido nítrico, fatores que aceleram a taxa de progressão da IC (Dries et al., 1999; Ergul, 2000; Kalinowski et al., 2004; Scott, 2003; Yancy, 2000; Young et al., 2005).

Diferentes estudos avaliaram também a associação de diversas etnias (por meio da análise da cor de pele) com doenças cardiovasculares e afirmaram que indivíduos negros têm maior risco de desenvolver a IC, na população americana (Bahrami et al., 2008; Bibbins-Domingo et al., 2009; Yancy, 2005).

Assim, nosso estudo, parece ser o primeiro estudo de genética e, especificamente, de DNA mitocondrial, a corroborar com o que se observa na prática clínica, em relação à susceptibilidade aumentada para desenvolvimento de IC em indivíduos de origem (ou ancestralidade) africana.

Além do risco aumentado de desenvolvimento da IC apresentado pelos indivíduos com haplogrupos mitocondriais africano, nossos resultados também apontaram risco diminuído indivíduos com haplogrupos mitocondriais ameríndio (Tabela 4).

Estudos anteriores demonstraram um efeito de menor risco de haplogrupos mitocondriais ameríndio/asiático para o aparecimento de dano oxidativo mitocondrial (Levine et al., 1999; Takagi et al., 2004) e de acúmulo de mutações no mtDNA (Tanaka et al., 2000). Estudos epidemiológicos têm

indicado que haplogrupos mitocondriais ameríndio/asiático estão associados com a longevidade (Alexe et al., 2007; Cai et al., 2009), resistência contra o infarto do miocárdio (Takagi et al., 2004), redução na probabilidade de aparecimento de diabetes mellitus tipo 2 (Wang et al., 2001) e também menor susceptibilidade a trombose venosa profunda (Guzmán et al., 2010).

Assim, parece possível que o efeito de risco diminuído dos haplogrupos mitocondriais ameríndios contra danos oxidativos também pode ser benéfico em termos de desenvolvimento de IC em pacientes brasileiros.

As doenças cardiovasculares são condições poligênicas, influenciadas por fatores ambientais, sendo que os diferentes resultados encontrados na literatura podem refletir um papel modesto dos haplogrupos mitocondriais nos mecanismos patogênicos de cada uma delas (Benn et al., 2008; Gallardo et al., 2012).

4.1.4. Distribuição da Ancestralidade Genômica Autossômica em relação aos Haplogrupos Mitocondriais nos Grupos de Controles e Pacientes

No grupo de controles, quando analisamos a distribuição global da ancestralidade genômica autossômica em relação a cada haplogrupo mitocondrial, podemos observar que todos os haplogrupos apresentaram maior contribuição da ancestralidade europeia (Tabela 5).

Realizando a análise particular de cada ancestralidade, podemos observar que a contribuição da ancestralidade genômica ameríndia ficou distribuída igualmente entre os três haplogrupos mitocondriais. A maior contribuição da ancestralidade genômica europeia esteve presente nos haplogrupos mitocondriais europeu, seguido pelos haplogrupos mitocondriais ameríndio e, enfim, não muito diferente, nos haplogrupos mitocondriais africano. A maior contribuição da ancestralidade genômica africana esteve presente nos haplogrupos mitocondriais africano, seguido pelos haplogrupos mitocondriais ameríndio e, por fim, nos haplogrupos mitocondriais europeu (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição global da ancestralidade genômica autossômica em relação aos haplogrupos mitocondriais no grupo de controles.

		HAPLOGRUPO					
		Africano		Ameríndio		Europeu	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
INDEL	Ameríndio	0,141	±0,092	0,179	±0,108	0,110	±0,077
	Europeu	0,511	±0,198	0,608	±0,170	0,744	±0,129
	Africano	0,348	±0,199	0,213	±0,164	0,147	±0,092

No grupo de pacientes, pôde ser observado o mesmo padrão de distribuição das contribuições da ancestralidade genômica autossômica encontrado no grupo de controles (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição global da ancestralidade genômica autossômica em relação aos haplogrupos mitocondriais no grupo de pacientes.

		HAPLOGRUPO					
		Africano		Ameríndio		Europeu	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
INDEL	Ameríndio	0,139	±0,088	0,168	±0,120	0,127	±0,091
	Europeu	0,510	±0,189	0,612	±0,189	0,716	±0,172
	Africano	0,350	±0,191	0,221	±0,163	0,156	±0,136

No Gráfico 3 e 4 podemos analisar a distribuição das contribuições de ancestralidade genômica autossômica em relação aos haplogrupos mitocondriais nos dois grupos estudados, respectivamente.

Gráfico 3: Gráfico representando a distribuição da contribuição da ancestralidade genômica de acordo com os haplogrupos mitocondriais no grupo de controles.

Gráfico 4: Gráfico representando a distribuição da contribuição da ancestralidade genômica de acordo com os haplogrupos mitocondriais no grupo de pacientes.

A população brasileira é produzida pela mistura intensa de europeus, africanos e ameríndios, e tem sido observado que a associação entre ancestralidade e cor de pele tem se dissipado com o tempo e que, portanto, devemos utilizar outros mecanismos, como os marcadores autossômicos e/ou uniparentais (mtDNA e cromossomo Y) para inferir a real estrutura da nossa população (Pena et al., 2011).

Além disso, a identidade étnica humana é um tema difícil e complicado. Todo ser humano é um complexo mosaico de material genético a partir de

múltiplos antepassados. Alguns estudos têm sugerido que o mtDNA é um excelente marcador para a inferência de ancestralidade materna (Egeland et al., 2004; Lee et al., 2011). Apesar do mtDNA representar apenas um segmento pequeno do mosaico da ancestralidade genética de um indivíduo, por refletir apenas o lado materno, essa informação pode ser muito útil em investigações clínicas e forenses (Egeland et al., 2004; Lee et al., 2011). Por outro lado, os AIMS fornecem informações mais completas sobre a ancestralidade individual, pois são biparentais, e refletem a herança de várias gerações de antepassados (Royal et al., 2010).

Esses dados evidenciam que os AIMS e o mtDNA são informações diferentes de ancestralidades e, portanto, complementares, sendo que nenhuma das duas análises supre a necessidade da outra.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO DO GRUPO DE PACIENTES

4.2.1. Distribuição dos Haplogrupos Mitocondriais e dos Marcadores de Ancestralidade na Amostra de Pacientes Estratificada por Autodeclaração de Cor de Pele

Nesse item, descreveremos nossa amostra em relação aos 492 indivíduos dos quais havia informações em relação à autodeclaração de cor de pele. Essa amostra foi composta por 297 (60,4%) homens e 195 (39,6%) mulheres. A idade média dos indivíduos foi de $58 \pm 14,4$ anos. De um total de 492 pacientes que informaram sua cor de pele, pudemos observar que a mais frequente foi à cor de pele branca, autodeclarada em 74,6% ($n=367$) dos indivíduos, seguida pela parda com 13,8% ($n=68$), negra com 10,4% ($n=51$). Apenas 1% ($n=5$) dos pacientes se autodeclararam com cor de pele amarela e 1 (0,2%) paciente se autodeclarou como pertencendo com cor de pele indígena (Tabela 7).

Tabela 7: Características dos 492 indivíduos que informaram sua autodeclaração de cor de pele.

Variáveis	Resultados
Idade (anos), $n(\text{média} \pm \text{DP})$	492 ($58 \pm 14,4$)
Sexo, n (%)	
Masculino	297 (60,4)
Feminino	195 (39,6)
Autodeclaração de Cor de Pele, n (%)	
Branca	367 (74,6)
Parda	68 (13,8)
Negra	51 (10,4)
Amarela	5 (1,0)
Indígena	1 (0,2)

Desses 492 indivíduos, 46,3% ($n=228$) apresentaram haplogrupos mitocondriais africano, o restante ficou distribuído entre os haplogrupos mitocondriais ameríndio e europeu, 28,7% ($n=141$) e 25% ($n=123$), respectivamente. A partir da análise de 48 INDELs, a maior contribuição em nossa amostra foi da ancestralidade genômica europeia, com média de contribuição de 57,4% ($\pm 22,1\%$), seguido pela ancestralidade genômica africana, com média de contribuição de 28,3% ($\pm 21,7\%$) e por fim a

ancestralidade genômica ameríndia, com média de contribuição de 14,3% ($\pm 10,1\%$) (Tabela 8).

Ao realizar a distribuição dos haplogrupos mitocondriais de acordo com as autodeclaração de cor de pele, é interessante notar que, das 367 pessoas que se autodeclararam com cor de pele branca, 37,6% (n=138), apresentaram haplogrupos mitocondriais africano, o restante ficou distribuído quase igualmente entre os haplogrupos mitocondriais ameríndio e europeu, com 31,6% (n=116) e 30,8% (n=113), respectivamente. Dos indivíduos que se autodeclararam com cor de pele negra e parda, 80,4% (n=41) e 69,1% (n=47), respectivamente, tiveram haplogrupos mitocondriais africano. Curiosamente, 25% (n=17) dos indivíduos que se autodeclararam com cor de pele parda apresentaram haplogrupos mitocondriais ameríndio. Dos indivíduos que se autodeclararam com cor de pele amarela, 40% (n=2) apresentaram haplogrupos mitocondriais ameríndio, 40% (n=2) haplogrupos mitocondriais europeu, e 20% (n=1) apresentou haplogrupos mitocondriais africano. O indivíduo que se autodeclarou como indígena apresentou haplogrupo mitocondrial africano (Tabela 8; Gráfico 5).

Os resultados da ancestralidade genômica autossômica mostraram que os indivíduos que se autodeclararam brancos tiveram maior contribuição de ancestralidade europeia (63,3% $\pm 19\%$); entretanto, temos que enfatizar que estes indivíduos também tiveram uma contribuição significativa de ancestralidade genômica africana (22,2% $\pm 16,9\%$). Os indivíduos que se autodeclararam pardos apresentaram pouca diferença nas contribuições da ancestralidade genômica europeia (45,4% $\pm 20,5\%$) e africana (41% $\pm 21,2\%$). Aqueles que se autodeclararam negros tiveram principal contribuição da ancestralidade genômica africana (55,6% $\pm 23,6\%$), mas também uma proporção significativa de ancestralidade genômica europeia (32,1% $\pm 21,1\%$). Aqueles que se autodeclararam amarelos apresentaram maior contribuição de ancestralidade genômica europeia (55,7% $\pm 19,3\%$), e o indivíduo que se autodeclarou indígena apresentou maior contribuição de ancestralidade genômica africana (56,2%), seguida pela contribuição europeia (40,4%) e pouca contribuição da ancestralidade genômica ameríndia (3,4%) (Tabela 8; Gráfico 6).

Tabela 8: Distribuição dos haplogrupos mitocondriais e da ancestralidade genômica autossômica de acordo com a autodeclaração de cor de pele.

Variáveis		Total (n=492)	AUTODECLARAÇÃO DE COR DE PELE				
			Branca (n=367)	Parda (n=68)	Negra (n=51)	Amarela (n=5)	Indígena (n=1)
Haplogrupos mitocondriais n (%)	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)*	-
Ancestralidade Genômica, média ±DP	Africana	0,283±0,217	0,220±0,169	0,410±0,212	0,556±0,236	0,204±0,154	0,562
	Europeia	0,574±0,221	0,633±0,190	0,454±0,205	0,321±0,211	0,557±0,193	0,404
	Ameríndia	0,143±0,101	0,147±0,101	0,136±0,106	0,113±0,077	0,239±0,159	0,034

*Porcentagens referente a análise por coluna.

Gráfico 5: Representação gráfica da distribuição dos haplogrupos mitocondriais de acordo com a autodeclaração de cor de pele

Gráfico 6: Representação gráfica da distribuição dos marcadores de ancestralidade de acordo com a autodeclaração de cor de pele.

Ao analisar as três informações juntas, autodeclaração de cor de pele, haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica autossômica, foi possível observar que a contribuição de ancestralidade genômica europeia foi maior nos haplogrupos mitocondriais europeu, para os indivíduos que se autodeclararam brancos e menor nos haplogrupos mitocondriais africano para os indivíduos que autodeclararam negros (Figura 15). A maior contribuição de ancestralidade genômica africana foi nos haplogrupos mitocondriais africano, nos indivíduos autodeclarados negros e pardos, e nos haplogrupos mitocondriais ameríndio nos indivíduos autodeclarados negros (Figura 15). Curiosamente, a contribuição de ancestralidade genômica ameríndia teve distribuição bastante uniforme em todas as autodeclarações de cor de pele e haplogrupos mitocondriais (Figura 15).

Figura 15: Distribuição de cada ancestralidade genômica em relação aos haplogrupos mitocondriais e autodeclaração de cor de pele.

Atualmente no Brasil, a classificação de grupo étnico é baseada no questionário de censo demográfico, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que utiliza o critério de autodeclaração de cor de pele. No censo demográfico, o IBGE reconhece 5 autodeclaração de cor de pele: branca, amarela, parda (se incluem nessa categoria os indivíduos que se autodeclaram como pardos, caboclos, cafuzos, mamelucos ou a mistura de negros com outra cor ou etnia), negra e indígena (IBGE, 2010). A distribuição desses grupos é completamente heterogênea ao longo do território brasileiro, e geralmente segue um padrão das condições histórico- sociais (Tabela 9).

Tabela 9: Percentual da autodeclaração de cor de pele da população brasileira.

População	AUTODECLARAÇÃO DE COR DE PELE			
	Branca %	Parda %	Negra %	Amarela/Indígena %
Brasil	48,2	44,2	6,9	0,7
Norte	23,6	71,2	4,7	0,4
Nordeste	28,8	62,7	8,1	0,3
Sudeste	56,7	34,6	7,7	0,9
Sul	78,5	17,3	3,6	0,7
Centro-Oeste	41,7	50,6	6,7	0,9

Fonte: IBGE, 2010.

O resultado apresentado pelo nosso estudo difere dos dados do IBGE, principalmente em relação ao Sudeste brasileiro, uma vez que de um total de 492 pacientes que informaram sua cor de pele, 486 são do Sudeste, sendo que desses, 74,9% (n=364) se autodeclararam brancos, evidenciando assim uma tendência social ao “branqueamento” de nossa amostra.

Atualmente, os censos demográficos são a única fonte de informação de abrangência nacional sobre a composição étnica da população brasileira. No entanto, há dúvidas sobre as informações geradas pela autodeclaração de cor da pele, principalmente por duas considerações. A primeira consideração refere-se ao grande número de termos que os brasileiros usam para identificar as variações de cor da pele entre os dois extremos (branco e negro). A segunda consideração refere-se à influência de outras variáveis sobre a classificação étnica, como a posição social, a percepção subjetiva de sua cor, escolaridade, sexo, faixa etária dos entrevistados e as variações regionais e culturais (Bastos et al., 2008; Telles, 2002).

Ultimamente, mesmo no Brasil, para algumas pessoas, ainda há o conceito de que as pessoas negras, ou seja, pessoas com pele escura, estão relacionadas com todos os tipos de estereótipos negativos, classe social mais baixa e exclusão social. Neste contexto, os indivíduos pardos, que têm pele mais clara, têm uma tendência a se autodeclarar brancos (Guimarães, 2002). Existem ainda diversos programas de governo que visam a inclusão social e que utilizam a autodeclaração de cor de pele como critérios de inclusão/exclusão, fazendo com que as informações de autodeclaração resultem em uma construção étnica ainda mais complexa de ser dissecada.

Leite e colaboradores (2011) demonstraram que, mesmo entre irmãos biológicos, existe discordância na autodeclaração de cor de pele, sendo que muitas vezes um irmão se autodeclara branco enquanto o outro se autodeclara pardo. Esse estudo evidencia mais uma vez a existência de discrepâncias entre a informação de autodeclaração de cor de pele e a ancestralidade genética da população brasileira, resultando em dificuldades no uso desses dados em estudos epidemiológicos, e em doenças complexas como a IC (Leite et al., 2011; Lins et al., 2011; Pereira et al., 2012).

Em relação à análise mitocondrial, nossos resultados mostraram que 46,3% (n=228) do grupo total, e 37,6% (n=138) dos indivíduos que se autodeclararam brancos, apresentaram haplogrupos mitocondriais africano (Tabela 8). Estes resultados são bastante semelhantes aos de Alves-Silva e colaboradores (2000), que avaliaram 247 indivíduos que se autodeclararam como brancos originários de cinco grandes regiões geográficas do Brasil. Ao avaliar apenas os 99 indivíduos da região Sudeste (especialmente do Estado de Minas Gerais), os autores observaram 34% deles pertencentes aos haplogrupos mitocondriais africano, 33% aos haplogrupos mitocondriais ameríndio e 31% aos haplogrupos mitocondriais europeu (Alves-Silva et al., 2000), evidenciando claramente que a autodeclaração da cor de pele não está completamente relacionada com a ancestralidade matrilinear na população do Sudeste brasileiro.

Quando comparamos o mtDNA em cada uma das três autodeclarações de cor de pele, observamos que houve disparidades: nos indivíduos que se autodeclararam brancos, 37,6% (n=138) apresentaram haplogrupos mitocondriais africano, enquanto que 25% (n=17) dos indivíduos que se autodeclararam pardos apresentaram haplogrupos mitocondriais ameríndio (Tabela 8). Estes dados enfatizam novamente o fato de que em uma população onde há um alto grau de mistura, e onde características físicas superficiais podem variar com a idade e com fatores ambientais, apenas a autodeclaração de cor de pele não é um bom método para a classificação étnica na população brasileira (Leite et al., 2011; Lins et al., 2011; Pena, 2005).

A análise da ancestralidade genômica autossômica encontrada neste estudo mostrou que a população brasileira tem grande contribuição de

ancestralidade genômica europeia ($57,5\% \pm 22,2\%$) (Tabela 8). Embora esses dados concordem com estudos anteriores em relação à grande contribuição de ancestralidade genômica (Lins et al., 2010; Pena et al., 2011), é possível observar que houve diferenças entre nossos dados e esses estudos, pois encontramos uma porcentagem ligeiramente maior de ancestralidade genômica africana e uma porcentagem levemente menor de ancestralidade genômica europeia nos indivíduos autodeclarados como negros e pardos. Essas diferenças podem ser, principalmente, devido a diferenças relacionadas a fatores socioeconômicos que existem na população brasileira. As amostras do estudo de Pena e colaboradores (2011) foram coletadas em uma classe socioeconômica relativamente mais alta (estudantes de graduação e pós-graduação, civis e servidores), enquanto que as nossas amostras foram coletadas de indivíduos com insuficiência cardíaca de um hospital público.

Interessantemente, o componente de ancestralidade genômica autossômica ameríndia tende a ser bastante baixo tanto no nosso estudo como em estudos anteriores (Leite et al., 2011; Lins et al., 2010; 2011; Pena et al., 2011).

Quando realizamos a análise das contribuições de ancestralidade genômica autossômica em cada uma das três autodeclarações de cor de pele, é interessante notar que existe uma mistura considerável das três linhagens em todos os grupos étnicos (Tabela 8). Além disso, observou-se o que era esperado: indivíduos que se autodeclararam como brancos tinham, em média, maior contribuição de ancestralidade genômica europeia do que os indivíduos que se autodeclararam pardos; a menor contribuição de ancestralidade genômica europeia foi entre os autodeclarados negros. O oposto é observado para a contribuição de ancestralidade genômica africana. As mesmas observações do nosso estudo também foram relatadas em outros estudos na população brasileira (Leite et al., 2011; Lins et al., 2011; Pereira et al., 2012).

Um ponto importante a destacar é que somente com o uso de marcadores genéticos (mitocondriais e autossômicos) fomos capazes de capturar as informações sobre o componente ameríndio da população brasileira, uma vez que apenas um indivíduo se autodeclarou como indígena (Tabela 8). Foi possível observar uma média de contribuição de $14,2\% (\pm 10\%)$

de ancestralidade genômica ameríndia, e 28,7% (n=141) dos indivíduos apresentaram haplogrupos mitocondriais ameríndio na amostra como um todo (Tabela 8).

A partir desses resultados, demonstramos a existência de uma grande heterogeneidade de ancestralidade, tanto em marcadores uni como biparentais, o que reflete o alto grau de miscigenação da população brasileira. De acordo com esses resultados podemos observar que a autodeclaração de cor de pele tem relativamente pouca relação com a ancestralidade genética, fato que tem sido demonstrado e discutido por outros estudos em nossa população (Leite et al., 2011; Lins et al., 2011; Parra et al., 2003; Pena, 2005). Embora esses estudos tenham demonstrado que não existe uma forte correlação entre esses dados, no presente estudo, sugerimos que a utilização das informações combinadas de autodeclaração de cor de pele com os diferentes tipos de herança, uniparental e biparental, poderá resultar no aumento de informações sobre a população estudada.

Usando o mtDNA, que fornece um padrão claro de eventos históricos e que não são obscurecidos por fatores de recombinação (Wallace et al., 1999), e as informações dos AIMS, que podem estimar mistura interétnica de um indivíduo e/ou de uma população (Chakraborty et al., 1992), pode-se ter uma reconstituição mais precisa da ancestralidade genética de uma determinada população ou indivíduo. No entanto, a autodeclaração de cor de pele pode trazer informações diferentes para o pesquisador, já que ela é o resultado de características visuais, como a cor da pele, combinada com aspectos socioeconômicos e culturais (Bamshad e Guthery, 2007; Sucheston et al., 2012), sendo determinada por fatores que não podem ser captados por meio de marcadores genéticos de mistura ou de ancestralidade geográfica.

Assim, é tentador sugerir que o uso combinado dessas informações pode fornecer ideias novas e complementares para o entendimento da determinação de fenótipos e/ou doenças complexas.

Concluindo, este estudo revelou que a ancestralidade genômica e o mtDNA dos indivíduos do Sudeste brasileiro são de diferentes origens filogeográficas, evidenciando uma grande miscigenação. Independentemente da cor de pele, a maioria desses indivíduos apresentou matrilineagem africana,

uma maior contribuição de ancestralidade genômica europeia e um grau muito uniforme de ancestralidade genômica ameríndia. Os marcadores uni e biparentais foram capazes de fornecer informações sobre a estrutura atual da população brasileira. Entretanto devido à baixa correlação geral entre a informação étnica e dos marcadores genéticos (mtDNA e marcadores autossômicos), propomos, especialmente em populações miscigenadas, a utilização de uma construção tridimensional, pois pode fornecer informações mais preditivas para os estudos de associação entre etnia e fenótipos e/ou doenças complexas.

Esses achados foram publicados pelo nosso grupo recentemente (Cardena et al., 2013b) (Apêndice B).

4.2.2. Distribuição da Autodeclaração de Cor de Pele, dos Haplogrupos Mitocondriais e dos Marcadores de Ancestralidade na Amostra de Pacientes Estratificada por Etiologia

A idade média dos 503 pacientes avaliados foi de $58 \pm 14,4$ anos, sendo que 299 (59,4%) eram homens e 204 (40,6%) eram mulheres. Desses indivíduos, 315 (62,6%) apresentavam hipertensão arterial e 188 (37,4%) não apresentavam hipertensão arterial no momento da realização do estudo. Em relação às etiologias da IC, as mais prevalentes na nossa amostra foram a etiologia hipertensiva ($n=144$, 28,6%) e a etiologia isquêmica ($n=143$, 28,4%) (Tabela 10).

Tabela 10: Características demográficas e clínicas do grupo de pacientes.

Variáveis	Resultados
Idade (anos), n(média $\pm$ DP)	503 (58 $\pm$ 14,4)
Sexo, n (%)	
Masculino	299 (59,4)
Feminino	204 (40,6)
Hipertensão arterial, n (%)	
Sim	315 (62,6)
Não	188 (37,4)
Etiologias	
Hipertensiva	144 (28,6)
Isquêmica	143 (28,4)
Valvar	76 (15,1)
Chagásica	60 (11,9)
Idiopática	50 (10,0)
Outras	30 (6,0)

A partir desse tópico, as autodeclaração de cor de pele amarela e indígena não serão consideradas para as análises, devido ao baixo número de indivíduos em cada um desses grupos, 5 e 1 ,respectivamente.

Quando analisamos a autodeclaração de cor de pele distribuída em relação as etiologias (análise por coluna), observamos que entre os indivíduos que se autodeclararam como brancos, a maior frequência, 32,4% (n=119), foi da etiologia isquêmica; já entre os pardos e negros, a prevalência foi da etiologia hipertensiva, 38,2% (n=26) e 41,2% (n=21), respectivamente (Tabela 11).

Os dados da Tabela 11 (análise por linha) mostram também que em todas as etiologias a prevalência foi sempre de indivíduos autodeclarados como brancos (Gráfico 7), sendo que esse dado parece “desviado” devido ao fato de termos 74,6% da nossa amostra se autodeclararam de cor de pele branca (como mencionado anteriormente).

É bastante conhecido o fato de que indivíduos negros apresentam maior predisposição à hipertensão (Agyemang et al., 2005, 2012; Hajjar e Kotchen, 2003; Kramer et al., 2004). A partir disso, seria de se esperar a maior frequência da etiologia hipertensiva nos grupos de negros e pardos dentro das nossas análises. Provavelmente, isso não tenha acontecido pela discordância existente entre a autodeclaração de cor de pele e etnia, mais uma vez

reforçando a ideia de que as informações de autodeclaração de cor de pele devem ser usadas sempre com muita cautela.

Tabela 11: Distribuição das etiologias da IC de acordo com a autodeclaração de cor de pele.

		AUTODECLARAÇÃO DE COR DE PELE								
		Branca (N=367)			Parda(N=68)			Negra(N=51)		
		N*	% Linha	% Coluna	N*	% Linha	% Coluna	N*	% Linha	% Coluna
ETIOLOGIAS	Chagásica	37	63,8	10,1	11	19,0	16,2	8	13,8	15,7
	Idiopática	36	72,0	9,9	7	14,0	10,3	6	12,0	11,7
	Hipertensiva	93	66,0	25,3	26	18,4	38,2	21	14,9	41,2
	Isquêmica	119	85,7	32,4	12	8,6	17,6	7	5,0	13,7
	Valvar	60	80,0	16,3	8	10,7	11,8	6	8,0	11,8
	Outras	22	75,9	6,0	4	13,8	5,9	3	10,3	5,9

N* = número de indivíduos de cada etiologia em relação à autodeclaração de cor de pele correspondente.

Gráfico 7: Distribuição da autodeclaração de cor de pele em cada uma das etiologias da IC; valores referentes à porcentagem por linha.

De acordo com as análises dos haplogrupos mitocondriais em relação às etiologias, observamos que nos haplogrupos mitocondriais a etiologia hipertensiva foi a mais frequente (33,8%, n=79), enquanto que nos haplogrupos

européu e ameríndio a mais frequente foi a etiologia isquêmica, 35,2% (n=50) e 37% (n=47), respectivamente (Tabela 12; análise por coluna).

De acordo com os dados das etiologias em relação aos haplogrupos mitocondriais (análise por linha), todas aparecem com frequências maiores nos haplogrupos mitocondriais africano, com exceção da isquêmica, que está distribuída igualmente entre os três haplogrupos mitocondriais (Tabela 12; Gráfico 8), o que está de acordo com nosso resultado anterior (item 4.1.3.), que mostrou associação dos haplogrupos mitocondriais africano com o desenvolvimento da IC, uma vez que ela é a via final de todas essas etiologias.

Tabela 12: Distribuição das etiologias da IC de acordo com os haplogrupos mitocondriais.

		HAPLOGRUPO								
		Africano (N=234)			Ameríndio (N=142)			Europeu (N=127)		
		N	% Linha	% Coluna	N	% Linha	% Coluna	N	% Linha	% Coluna
ETIOLOGIAS	Chagásica	39	65,0	16,6	13	21,7	9,2	8	13,3	6,3
	Idiopática	23	46,0	9,9	13	26,0	9,2	14	28,0	11,0
	Hipertensiva	79	54,9	33,8	35	24,3	24,6	30	20,8	23,7
	Isquêmica	46	32,1	19,6	50	35,0	35,2	47	32,9	37,0
	Valvar	36	47,4	15,4	20	26,3	14,1	20	26,3	15,7
	Outras	11	36,7	4,7	11	36,7	7,7	8	26,6	6,3

Gráfico 8: Distribuição dos haplogrupos mitocondriais em cada um das etiologias da IC; valores referentes à porcentagem por linha.

As análises em relação aos INDELs mostraram que a maior contribuição da ancestralidade genômica europeia esteve presente entre os indivíduos com etiologia isquêmica (62,9% $\pm$ 20,1%), e a maior contribuição da ancestralidade genômica africana foi observada entre os indivíduos com etiologia hipertensiva (35,0% $\pm$ 24,6%). As médias da contribuição de ancestralidade genômica ameríndia foram semelhantes entre as etiologias (Tabela 13; Gráfico 9).

Tabela 13: Distribuição das etiologias da IC de acordo com a ancestralidade genômica autossômica.

		INDEL					
		Ameríndio		Europeu		Africano	
		Média	DP $\pm$	Média	DP $\pm$	Média	DP $\pm$
ETIOLOGIAS	Chagásica	0,142	0,096	0,560	0,211	0,298	0,202
	Idiopática	0,143	0,114	0,557	0,237	0,301	0,239
	Hipertensiva	0,141	0,098	0,509	0,243	0,350	0,246
	Isquêmica	0,148	0,102	0,629	0,201	0,223	0,185
	Valvar	0,126	0,093	0,598	0,192	0,276	0,195
	Outras	0,156	0,100	0,614	0,187	0,230	0,175

Gráfico 9: Distribuição da contribuição de ancestralidade genômica em cada uma das etiologias da IC.

As análises estatísticas realizadas a partir da autodeclaração de cor de pele, haplogrupos mitocondriais e ancestralidade genômica autossômica em relação às etiologias foram ajustadas para idade, sexo e hipertensão; somente para a etiologia hipertensiva é que a hipertensão não foi usada como ajuste da análise.

Dos nossos resultados combinados (Tabela 14), pôde-se observar que indivíduos pertencentes aos haplogrupos mitocondriais africano apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento da IC nas etiologias chagásica e hipertensiva, { $p=0,012$ [OR 2,32 (95%I.C.: 1,20-4,46)]} e { $p=0,003$ [OR 2,05 (95%I.C.: 1,29-3,25)]}, respectivamente. Em relação à análise dos INDELs, a maior contribuição de ancestralidade genômica africana apresentou risco aumentado { $p=0,002$ [OR 6,07 (95%I.C.: 1,96-18,86)]}, enquanto que a maior contribuição de ancestralidade genômica europeia apresentou risco diminuído { $p=0,001$ [OR 0,16 (95%I.C.: 0,05-0,47)]} para o desenvolvimento de IC na etiologia hipertensiva (Tabela 14).

Tabela 14: Análise estatística das variáveis: autodeclaração de cor de pele, haplogrupos mitocondriais e marcadores de ancestralidade genômica autossômica estratificada por etiologias da IC.

VARIÁVEIS		CHAGÁSICA		IDIOPÁTICA		HIPERTENSIVA		ISQUEMICA		VALVAR	
		<i>p-value</i>	Odds Ratio	<i>p-value</i>	Odds Ratio	<i>p-value</i>	Odds Ratio	<i>p-value</i>	Odds Ratio	<i>p-value</i>	Odds Ratio
AUTODECLARAÇÃO DE COR DE PELE	Branca	0,184	0,12(0,91-4,48)	0,937	1,62(0,55-3,09)	0,566	1,35(0,44-2,10)	0,243	0,71(0,46-1,43)	0,778	0,87(0,46-2,80)
	Parda	0,162	1,68(0,81-3,48)	0,891	1,06(0,45-2,49)	0,212	1,46(0,81-2,65)	0,201	0,63(0,31-1,28)	0,350	0,69(0,31-1,51)
	Negra	0,298	1,55(0,68-3,53)	0,722	1,18(0,47-2,95)	0,720	1,14(0,56-2,32)	0,081	0,44(0,18-1,11)	0,570	0,78(0,34-1,82)
HAPLOGRUPO	Africano	0,012	2,32(1,20-4,46)	0,956	1,10(0,67-2,05)	0,003	2,05(1,29-3,25)	0,408	0,82(0,51-1,32)	0,954	1,08(0,71-2,02)
	Ameríndio	0,154	0,60(0,29-1,21)	0,764	0,90(0,44-1,83)	0,228	0,75(0,47-1,20)	0,101	1,80(1,12-2,89)	0,839	1,06(0,59-1,90)
	Europeu	0,251	0,63(0,29-1,38)	0,907	0,96(0,47-1,95)	0,185	0,72(0,45-1,17)	0,902	1,03(0,62-1,71)	0,891	0,96(0,52-1,76)
INDEL	Ameríndio	0,987	1,02(0,07-15,5)	0,931	1,14(0,06-20,8)	0,903	0,89(0,13-6,22)	0,410	2,23(0,33-15,1)	0,138	0,13(0,01-1,94)
	Europeu	0,605	0,73(0,22-2,45)	0,562	0,68(0,19-2,50)	0,001	0,16(0,05-0,47)	0,224	2,06(0,64-6,63)	0,290	1,85(0,59-5,75)
	Africano	0,604	1,38(0,41-4,68)	0,580	1,45(0,39-5,34)	0,002	6,07(1,96-18,9)	0,168	0,41(0,11-1,16)	0,692	0,79(0,25-2,49)

O resultado em relação à maior contribuição da ancestralidade genômica autossômica europeia conferir risco diminuído para o desenvolvimento de IC na etiologia hipertensiva { $p=0,001$ [OR 0,16 (95%I.C.: 0,05-0,47)]} é semelhante a achados de outros estudos, que evidenciaram risco diminuído para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares: como diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia em amostras de indivíduos caucasianos europeus (Agyemang e Bhopal, 2002; Agyemang et al., 2012; Artaud-Wild et al., 1993; Chaturvedi, 2003; Yusuf et al., 2001). Esses estudos relacionaram tais resultados com um perfil lipoproteico mais saudável apresentado pelos indivíduos com ancestralidade europeia, além da influência de fatores socioeconômicos e estilos de vida como hábitos alimentares e prática de atividade física (Agyemang e Bhopal, 2002; Agyemang et al., 2012; Artaud-Wild et al., 1993; Chaturvedi, 2003; Yusuf et al., 2001).

Os resultados encontrados quanto ao maior risco na etiologia hipertensiva ser daqueles indivíduos com haplogrupos mitocondriais africano { $p=0,003$ [OR 2,05 (95%I.C.: 1,29-3,25)]} e maior contribuição de ancestralidade genômica africana { $p=0,002$ [OR 6,07 (95%I.C.: 1,96-18,86)]} concordam com nossos achados anteriores da comparação do grupo de pacientes com IC em relação aos controles saudáveis (item 4.1.3.). Nossos dados estão de acordo com outros estudos que avaliaram porto-riquenhos de Boston (Lai et al., 2009), mulheres americanas dos Estados Unidos (Kosoy et al., 2012) e costa-riquenhos (Ruiz-Narváez et al., 2010), que também afirmaram que a maior contribuição de ancestralidade genômica africana está associada com a hipertensão.

Um dos fatores importantes para o maior acometimento da hipertensão em indivíduos com maior contribuição de ancestralidade genômica africana e haplogrupos mitocondriais africano poderia ser o fato de indivíduos negros apresentarem maior propensão à retenção de sódio e menor biodisponibilidade de óxido nítrico (ON) (Dries et al., 1999; Ergul, 2000; Kalinowski et al., 2004; Scott, 2003; Yancy, 2000; Young et al., 2005). O sódio promove a retenção de água e, dessa forma, provoca a expansão do volume sanguíneo e o aumento da pressão arterial (Harshfield et al., 2009). Já o ON, em níveis normais, promove o relaxamento do músculo liso da parede do vaso, fazendo com que

este dilate, resultando em um aumento do fluxo sanguíneo; em níveis reduzidos o ON pode resultar em aumento da pressão arterial (Zuckerbraun et al., 2010), levando ao desenvolvimento da IC.

Na etiologia chagásica, os indivíduos com haplogrupos mitocondriais africano também apresentaram risco aumentado { $p=0,012$ [OR 2,32 (95% I.C.: 1,20- 4,46)]} para o desenvolvimento da IC. Para que esse dado fosse melhor elaborado, deveria haver uma comparação entre pacientes chagásicos com cardiomiopatia *versus* pacientes chagásicos que não desenvolveram cardiomiopatia; entretanto, não foi possível realizar esse tipo de análise nesse estudo, uma vez que não tínhamos amostras de pacientes chagásicos que não desenvolveram cardiomiopatia no momento de sua realização.

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi* e transmitida ao homem pelo inseto triatomíneo (*Triatoma infestans*); estimativas recentes mostram que, no Brasil, existem cerca de 1,9 milhões de pessoas infectadas. Dessas, de 25% a 35% tem comprometimento cardíaco, e somente 10% desenvolvem cardiomiopatia chagásica crônica grave (Serrano Jr et al., 2009).

A cardiomiopatia chagásica crônica é a principal causa da IC em áreas onde há a forma endêmica da doença de Chagas, devido à diminuição progressiva da massa muscular miocárdica, inflamação das fibras cardíacas e formação de extensas áreas de fibrose nos pacientes infectados (Braga et al., 2006; Bocchi et al., 2009; Rocha et al., 2003).

O principal mecanismo de defesa inato do hospedeiro contra o *T. cruzi* é o sistema complemento. Tem sido demonstrado que esse mecanismo é crucial para o controle e progressão da doença de Chagas, pois controla a infecção aguda; entretanto, na infecção crônica, onde o quadro clínico é mais grave, ocorre depósito de proteínas de defesa e “restos” de membrana do protozoário no tecido cardíaco, o que contribui para a necrose e fibrose do mesmo, acarretando assim o agravamento da cardiomiopatia chagásica (Aiello et al., 2002). O sistema complemento pode se tornar ativo por três vias, sendo uma delas a via da lectina, que é formada por 2 proteases, sendo que a MBL-protease associada à serina 2 (MASP2) é a mais importante (Boldt et al., 2011; Cestari et al., 2009; Luz et al., 2010).

Estudos indicam que menores níveis de MASP2 estão associados a um risco maior de desenvolver cardiomiopatia chagásica grave em indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (Boldt et al., 2011; Cestari et al., 2009; Luz et al., 2010), já tendo sido demonstrado que indivíduos negros apresentam menores níveis da protease MASP 2 (Thiel et al., 2007; Turner, 2003).

Com isso, podemos deduzir que pacientes com haplogrupos mitocondriais africano podem apresentar maiores complicações na cardiomiopatia chagásica e, conseqüentemente, maior predisposição para o desenvolvimento da IC, aliado a esse fato ainda existe o fator socioeconômico muito relacionado com a doença de Chagas.

A doença de Chagas apresenta sua distribuição coincidente com a distribuição das populações carentes, o que a torna uma patologia que se relaciona diretamente a questões socioeconômicas, assim as diferenças no nível socioeconômico podem estar associado ao fato dos indivíduos com haplogrupos mitocondriais africano apresentarem maior risco de desenvolvimento da IC em pacientes brasileiros.

4.2.3. Análise da Idade Média dos Pacientes para o Início dos Sintomas da IC em Relação aos Haplogrupos Mitocondriais e Etiologia

A seguir mostraremos os resultados em relação ao tempo para o início dos sintomas da insuficiência cardíaca. Esta análise é importante para identificação de indivíduos que apresentariam risco aumentado para o início precoce da IC. A identificação desses indivíduos poderia levar a intervenções que visam a prevenção dessa enfermidade, visto que a IC tem um efeito arrasador, não apenas na capacidade funcional do paciente, mas também sobre sua família e a sociedade.

De acordo com os nossos dados, a idade média geral dos pacientes para o início dos sintomas da IC foi de $55,2 \pm 15,1$ anos. A análise de *log-rank* (*p*) por comparação das curvas Kaplan-Meier dos haplogrupos mitocondriais apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos haplogrupos mitocondriais africano, ou seja, os pacientes com haplogrupos mitocondriais

africano desenvolveram a doença mais cedo (com idade menor) que os demais (Tabela 15; Gráfico 10). Quando estratificado o dado de idade média dos pacientes para o início dos sintomas da IC por etiologia, apenas na etiologia isquêmica houve diferença estatisticamente significativa em relação aos haplogrupos mitocondriais africano, ou seja, pacientes da etiologia isquêmica com haplogrupos mitocondriais africano desenvolveram a doença mais cedo do que os pacientes dos demais haplogrupos nesta etiologia (Tabela 15, Gráfico 11).

Tabela 15: Avaliação estatística da idade média dos pacientes para início dos sintomas da IC, estratificada por etiologia e de acordo com os haplogrupos mitocondriais.

Etiologias	Haplogrupos						Log-rank		
	Africano		Ameríndio		Europeu		Africano X Ameríndio	Africano X Europeu	Ameríndio X Europeu
	N (%)	Média±DP	N (%)	Média±DP	N (%)	Média±DP			
TOTAL, n=503	234 (46,5)	55,6±17,3	142 (28,2)	58,6±12,0	127 (25,3)	61,2±11,6	0,016	0,001	0,197
Chagásica, n=60 (11,9%)	39 (65,0)	55,1±12,3	13 (21,7)	57,1±12,1	8 (13,3)	58,1±13,2	0,145	0,578	0,111
Idiopática, n=50 (10,0%)	23 (46,0)	56,6±13,2	13 (26,0)	56,8±14,5	14 (28,0)	57,3±11,2	0,258	0,891	0,157
Hipertensiva, n=144 (28,6%)	79 (54,9)	58,6±10,0	35 (24,3)	60,1±09,2	30 (20,8)	60,5±09,8	0,578	0,475	0,100
Isquêmica, n=143 (28,4%)	46 (32,1)	59,9±17,2	50 (35,0)	66,1±10,7	47 (32,9)	65,8±10,5	0,013	0,015	0,928
Valvar, n=76 (15,1%)	36 (47,4)	57,2±11,2	20 (26,3)	58,2±15,2	20 (26,3)	58,7±12,8	0,589	0,487	0,877
Outras, n=30 (6,0%)	11 (36,7)	58,7±10,2	11 (36,7)	57,9±12,9	8 (26,6)	59,1±9,2	0,871	0,548	0,641

Gráfico 10: Curva Kaplan-Meier relativa a idade média dos pacientes para início dos sintomas da IC de acordo com os haplogrupos mitocondriais.

Gráfico 11: Curva Kaplan-Meier relativa a idade média dos pacientes para o início dos sintomas da IC na etiologia isquêmica de acordo com os haplogrupos mitocondriais.

De acordo com nossos resultados, os pacientes pertencentes aos haplogrupos mitocondriais africano desenvolveram a IC mais cedo do que os demais, principalmente os indivíduos da etiologia isquêmica. Esses dados estão de acordo com diversos estudos que mostraram que indivíduos negros desenvolvem a IC com idade menor que os indivíduos das demais etnias (classificadas por cor de pele) (Bahrami et al., 2008; Bibbins-Domingo et al., 2009; Jolly et al., 2010; Yancy, 2005).

Vários estudos populacionais e genéticos têm mostrado que pacientes negros apresentam diferenças genéticas que fazem com que eles tenham

maior propensão ao desenvolvimento precoce da IC em relação a pacientes brancos, além do fato de existirem diferenças no nível socioeconômico, disparidades no acesso e qualidade dos cuidados de saúde entre os diferentes grupos étnicos (Bahrami et al., 2008; Ergul, 2000; Jolly et al., 2010; Gordon et al., 2010; Kalinowski et al., 2004; Scott, 2003; Young et al., 2005).

Os dados desse tópico são variáveis quantitativas contínuas, assim como a ancestralidade genômica autossômica, por isso esta não foi avaliada nesse item.

4.2.4. Avaliação da Sobrevida nos Pacientes com IC, em Relação aos Haplogrupos Mitocondriais, Etiologia e Ancestralidade Genômica Autossômica

Ao final de 4 anos de avaliação, dos 503 pacientes com insuficiência cardíaca (IC), 50,3% (n=253) evoluíram para o óbito. A média de dias de vida desses pacientes, contados a partir do momento do diagnóstico até o óbito, foi de 1.401 dias (± 207 dias) (~3,8 anos).

A distribuição das médias de dias entre os haplogrupos mitocondriais pode ser visualizada na Tabela 16 e a curva de sobrevida dos pacientes no Gráfico 12. A análise de *log-rank* (*p*) por comparação das curvas Kaplan-Meier dos haplogrupos mitocondriais não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 16). Quando estratificada a sobrevida dos pacientes por etiologia, somente na etiologia valvar houve diferença estatisticamente significativa em relação aos haplogrupos mitocondriais africano, ou seja, pacientes da etiologia valvar com haplogrupos mitocondriais africano apresentaram maior tempo de sobrevida no curso de 4 anos de acompanhamento do que os pacientes dos demais haplogrupos nesta etiologia (Tabela 16; Gráfico 13).

Tabela 16: Média de dias de vida dos pacientes, estratificada por etiologia e de acordo com os haplogrupos mitocondriais, contados a partir do momento do diagnóstico até o óbito.

Etiologias	Haplogrupos						Log-rank		
	Africano		Ameríndio		Europeu		Africano X Ameríndio	Africano X Europeu	Ameríndio X Europeu
	N (%)	Média±DP	N (%)	Média±DP	N (%)	Média±DP			
TOTAL, n=503	234 (46,5)	1.411±302	142 (28,2)	1.200±368	127 (25,3)	1.302±392	0,250	0,495	0,641
Chagásica, n=60 (11,9%)	39 (65,0)	1.315±589	13 (21,7)	1.478±879	8 (13,3)	1.589±987	0,258	0,598	0,321
Idiopática, n=50 (10,0%)	23 (46,0)	1.245±555	13 (26,0)	1.458±879	14 (28,0)	1.570±354	0,789	0,547	0,784
Hipertensiva, n=144 (28,6%)	79 (54,9)	1.578±387	35 (24,3)	1.589±804	30 (20,8)	1.504±387	0,256	0,667	0,148
Isquêmica, n=143 (28,4%)	46 (32,1)	1.657±399	50 (35,0)	1.788±488	47 (32,9)	1.801±501	0,369	0,891	0,551
Valvar, n=76 (15,1%)	36 (47,4)	1.857±1.365	20 (26,3)	1.146±504	20 (26,3)	913±299	0,028	0,002	0,505
Outras, n=30 (6,0%)	11 (36,7)	1.117±845	11 (36,7)	1.201±875	8 (26,6)	1.357±507	0,333	0,801	0,314

Gráfico 12: Curva Kaplan-Meier de sobrevida dos pacientes de acordo com os haplogrupos mitocondriais.

Gráfico 13: Curva Kaplan-Meier de sobrevida dos pacientes com etiologia valvar de acordo com os haplogrupos mitocondriais.

Por meio de nossas análises pudemos constatar que pacientes da etiologia valvar com haplogrupos mitocondriais africano apresentaram maior tempo de sobrevida no curso de 4 anos de acompanhamento, dado que difere de estudos anteriores que relataram que pacientes negros com IC têm risco aumentado de progressão e mortalidade por IC em comparação com os

pacientes brancos (Dries et al., 1999; Gordon et al., 2010; Jolly et al., 2010). No entanto, nossos dados estão de acordo com o estudo clínico de Cappuccio (1997), que relatou existir um paradoxo na população do sul da Ásia, onde a hipertensão e a diabetes se mostraram mais prevalentes em afrodescendentes, sendo que esses indivíduos apresentaram menor mortalidade por DC, e com o estudo populacional de Gordon e colaboradores (2010), que relataram que as taxas de mortalidade após o tratamento e hospitalização por IC são menores em pacientes negros do que em pacientes brancos.

Recentemente, estudos populacionais têm apontado que pacientes negros que utilizavam como tratamento para a IC a associação de hidralazina e nitrato apresentavam menor morbidade e mortalidade (Cheng, 2006; Elkayam e Bitar, 2005; Giles, 2006). O mecanismo de ação da associação do nitrato e da hidralazina está relacionado ao efeito doador de óxido nítrico do nitrato e à ação antioxidante da hidralazina, resultando no aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, causando vasodilatação, resultando no aumento do débito cardíaco e redução da pós-carga (Taylor et al., 2004).

Assim, podem existir também outros mediadores desconhecidos que fazem com que pacientes dos haplogrupos mitocondriais africano tenham maior sobrevida em amostras brasileiras, apesar de apresentarem maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença.

A análise de ancestralidade genômica autossômica mostrou que a ancestralidade ameríndia apresentou maior sobrevida em relação às demais, independente da etiologia, mostrando um resultado estatisticamente significativo { $p= 0,004$ [OR 0,13 (95% I.C.: 0,03- 0,52)]}, podendo ser um preditor de sobrevida em amostra brasileira. Esse dado se manteve o mesmo quando ajustado para idade, sexo, autodeclaração de cor de pele e etiologias (Tabela 17).

Tabela 17: Análise estatística da sobrevida em relação à ancestralidade genômica autossômica.

Variáveis	p-value	Odds Ratio	95% I.C.	
			Inferior	Superior
Ancest. Ameríndio	0,004	0,13	0,03	0,52
Ancest. Europeu	0,653	1,15	0,63	2,10
Ancest. Africano	0,313	1,36	0,75	2,48

Não foram encontrados outros estudos sobre sobrevida em relação à ancestralidade genômica autossômica ameríndia relacionada a doenças cardiovasculares.

De acordo com Pavan e colaboradores (1999), indivíduos ameríndios têm menor incidência de doenças cardiovasculares devido ao estilo de vida mais saudável (alimentação a base de vegetais e altos gastos energéticos), corroborando dados de Ruiz-Narváez e colaboradores (2010) que mostraram que indivíduos com ancestralidade ameríndia têm menor ingestão de carboidratos e maior atividade física, podendo resultar em indivíduos mais saudáveis e tornando a sobrevida desses pacientes maior quando acometidos por doenças cardiovasculares.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

As análises dos haplogrupos mitocondriais e dos 48 AIMS autossômicos do tipo INDEL foram utilizadas para avaliar se a herança materna e/ou a ancestralidade genômica autossômica seriam fatores de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca em amostras brasileira. Os resultados encontrados permitem concluir que:

- A partir da análise comparativa entre os grupos de pacientes e controles foi observado que os indivíduos com haplogrupos mitocondriais africano apresentaram risco aumentado, enquanto os indivíduos com haplogrupos mitocondriais ameríndio apresentaram risco diminuído para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca;
- A análise comparativa da informação de autodeclaração de cor de pele com os marcadores genéticos uni e biparentais, evidenciou que 74,6% dos indivíduos se autodeclararam como brancos, mas 46,3% apresentaram haplogrupos mitocondriais africano e uma maior contribuição de ancestralidade genômica autossômica europeia;
- Pela análise do mtDNA, nas etiologias chagásica e hipertensiva, os indivíduos com haplogrupos mitocondriais africano apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento da IC;
- A partir da análise dos marcadores autossômicos, na etiologia hipertensiva, a maior contribuição de ancestralidade genômica africana conferiu risco aumentado, enquanto que a maior contribuição da ancestralidade europeia conferiu risco diminuído para o desenvolvimento da IC;

- Os pacientes pertencentes aos haplogrupos mitocondriais africano, principalmente os indivíduos da etiologia isquêmica, apresentaram os sintomas da IC mais cedo do que os demais;
- Os pacientes com maior contribuição de ancestralidade genômica autossômica ameríndia e aqueles da etiologia valvar com haplogrupos mitocondriais africano, apresentaram maior sobrevida no período avaliado.

Os resultados deste estudo enfatizaram a importância de compreender que as informações genéticas, pelo uso dos marcadores autossômicos (AIMs) e do mtDNA, fornecem estimativas mais precisas de ancestralidade continental de um indivíduo e/ou população, enquanto que a autodeclaração de cor de pele fornece indiretamente informações importantes sobre aspectos socioeconômicos e culturais. Assim, é interessante a utilização, especialmente em populações miscigenadas, de uma construção tridimensional de análise, pois pode fornecer dados mais informativos e complementares em estudos de associação entre etnia e fenótipos e/ou doenças complexas.

O uso das análises de marcadores genéticos (AIMs e mtDNA) poderia auxiliar na identificação dos indivíduos que possuem maior contribuição da ancestralidade genômica autossômica africana e/ou haplogrupos mitocondriais africano, pois são esses que apresentam maior risco de desenvolver precocemente a IC.

Essa identificação poderia ser útil para prevenção ou tratamento precoce com objetivo de fornecer melhor qualidade de vida a esses indivíduos.

6. ANEXO

6. ANEXO

Os resultados individuais referentes aos haplogrupos mitocondriais e às médias dos marcadores de ancestralidades, para ambos os grupos, e os dados de autodeclaração de cor de pele do grupo de pacientes, podem ser observados nas Tabelas 19 e 20, respectivamente.

Tabela 18: Haplogrupos mitocondriais e as proporções de ancestralidade genômica autossômica individual dos 188 controles.

DNA Controles	Haplogrupo Mitocondrial*	INDEL		
		Ameríndio	Europeu	Africano
129	L1b	0,103	0,482	0,415
131	L3e2b	0,070	0,403	0,527
214	B4b	0,209	0,598	0,193
215	A2	0,310	0,562	0,129
261	C1d	0,261	0,556	0,183
262	J1	0,114	0,831	0,055
373	L1c2a1	0,042	0,626	0,332
374	H2a	0,331	0,379	0,290
420	A2	0,389	0,463	0,147
421	B4b	0,252	0,664	0,083
454	B4b	0,053	0,853	0,094
455	L3d2	0,268	0,593	0,139
468	D1	0,085	0,859	0,056
469	L2c	0,033	0,853	0,115
496	J1c	0,072	0,874	0,054
497	H1m1	0,112	0,701	0,188
576	HV0	0,284	0,565	0,151
577	J1c	0,191	0,695	0,114
621	C1b	0,413	0,466	0,121
622	A2	0,187	0,745	0,068
640	J1c8	0,084	0,717	0,199
641	B4b	0,115	0,824	0,061
650	HV0a	0,057	0,838	0,105
651	L0a1b1	0,200	0,735	0,065
729	L3e2b	0,177	0,588	0,235
730	L3h1b2	0,059	0,606	0,336
750	B4b	0,055	0,908	0,036
751	H2a2a2	0,208	0,713	0,078
757	T2b	0,106	0,822	0,072

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2, L3 e L4); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D e Y); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 21

DNA Controles	Haplogrupo Mitocondrial*	INDEL		
		Ameríndio	Europeu	Africano
758	U5a1	0,062	0,588	0,350
768	H5	0,043	0,774	0,183
769	L2a1	0,193	0,725	0,082
777	U5b	0,122	0,473	0,405
778	B4b	0,050	0,685	0,264
845	A2	0,174	0,693	0,133
846	A2	0,038	0,433	0,530
901	U3a	0,137	0,564	0,298
902	C1b	0,151	0,739	0,110
916	L3e2a1	0,208	0,464	0,328
917	B4b	0,098	0,870	0,032
923	L3f1b1	0,029	0,855	0,116
924	B4b	0,158	0,705	0,138
973	L1b	0,125	0,581	0,294
974	H1c	0,035	0,595	0,369
982	X1a	0,233	0,655	0,112
983	H3c2	0,157	0,791	0,052
985	L3f1b	0,040	0,639	0,321
986	L3f1b	0,092	0,380	0,528
988	C1a	0,119	0,749	0,133
989	HV0	0,234	0,457	0,309
1014	C1a	0,183	0,693	0,124
1015	B4b	0,182	0,705	0,114
1039	U5a1d	0,042	0,871	0,087
1040	X2c	0,034	0,849	0,117
1055	L3e1	0,144	0,413	0,443
1056	L0d1c	0,282	0,499	0,219
1112	L2a1c1	0,224	0,144	0,633
1113	L3d3a	0,113	0,101	0,786
1123	A2	0,120	0,436	0,444
1124	L3e2a1	0,172	0,659	0,169
1189	L0a1b	0,070	0,504	0,426
1190	L1c1a2	0,077	0,111	0,812
1235	B4b	0,131	0,269	0,600
1236	L2a1	0,420	0,356	0,223
1238	T2b	0,132	0,814	0,054
1239	D1f1	0,162	0,791	0,047
1276	L1c3a	0,173	0,206	0,621
1277	L3e3	0,065	0,661	0,275
1283	C1b	0,176	0,227	0,597

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2, L3 e L4); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D e Y); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 18

DNA Controles	Haplogrupo Mitocondrial*	INDEL		
		Ameríndio	Europeu	Africano
1284	L1c3b1a	0,062	0,169	0,769
1315	D1	0,208	0,609	0,184
1316	C1b	0,232	0,480	0,288
1366	B4b	0,223	0,620	0,156
1378	A2	0,168	0,714	0,118
1393	K2b1	0,174	0,727	0,100
1394	B4b	0,398	0,550	0,052
1398	B4b	0,207	0,612	0,181
1399	R0	0,042	0,730	0,228
1419	L2c2	0,151	0,469	0,380
1420	L2b	0,197	0,387	0,416
1444	L2b	0,050	0,511	0,439
1445	C1b	0,075	0,447	0,478
1480	L3f1b1	0,164	0,671	0,165
1481	C1b	0,249	0,564	0,187
1615	A2	0,225	0,626	0,149
1616	A2	0,204	0,408	0,388
1692	L2a1	0,068	0,700	0,232
1693	L3b	0,199	0,183	0,618
1869	A2	0,073	0,623	0,304
1870	T2b	0,167	0,739	0,093
1904	L3f1b4a	0,060	0,743	0,197
2006	L1b	0,069	0,313	0,618
2026	D4o	0,091	0,358	0,551
2084	A2	0,057	0,897	0,046
2085	H1c1	0,131	0,750	0,120
2091	L3e2b3	0,061	0,744	0,195
2092	L1b	0,299	0,523	0,178
2103	B4b	0,270	0,705	0,026
2139	A2	0,040	0,501	0,458
2140	H2a	0,143	0,794	0,063
2146	H2c1	0,103	0,855	0,041
2150	D1	0,068	0,494	0,438
2153	T1a	0,048	0,890	0,062
2222	L2a1	0,128	0,575	0,297
2232	HV17	0,099	0,732	0,169
2279	R0	0,244	0,532	0,225
2301	L3b	0,055	0,657	0,288
2351	B4b	0,067	0,859	0,074
2361	R0	0,138	0,781	0,081

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2, L3 e L4); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D e Y); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Controles	Haplogrupo Mitocondrial*	INDEL		
		Ameríndio	Europeu	Africano
2418	R0	0,037	0,854	0,109
2426	R0a	0,180	0,685	0,136
2427	A2	0,244	0,630	0,126
2465	R0	0,061	0,693	0,246
2541	L1b	0,117	0,451	0,432
2557	HV0a	0,027	0,770	0,203
2558	B4b	0,389	0,534	0,077
2564	D4	0,283	0,505	0,212
2574	A2	0,102	0,561	0,337
2575	D1f1	0,283	0,588	0,129
2579	L3e2a1	0,080	0,546	0,375
2647	L3d1a1a	0,083	0,394	0,523
2666	K1a	0,079	0,698	0,222
2673	L3e2a1b1	0,076	0,421	0,503
2701	R0	0,264	0,535	0,200
2770	L1c3b2	0,127	0,735	0,138
2840	R0	0,076	0,823	0,100
2867	C1d	0,218	0,677	0,105
2881	L1c1b	0,062	0,582	0,357
2975	A2	0,066	0,236	0,698
3017	L1c3c	0,196	0,347	0,457
3018	A2	0,148	0,425	0,427
3066	A2	0,160	0,706	0,133
3138	L2a1	0,222	0,326	0,452
3178	U3a	0,043	0,779	0,178
3209	R0	0,033	0,843	0,124
3210	L3h1b2	0,069	0,791	0,141
3356	L2a1	0,114	0,765	0,121
3357	A2	0,049	0,710	0,241
3423	L2b1a	0,078	0,825	0,097
3454	D1e	0,047	0,683	0,270
3455	HV4a	0,167	0,534	0,299
3542	L4b2	0,116	0,214	0,670
3547	H1c	0,072	0,836	0,092
3604	K1a	0,038	0,881	0,081
3637	L1b	0,080	0,527	0,393
3643	C1b2	0,083	0,766	0,150
3649	H27	0,064	0,882	0,054
3650	I1	0,057	0,865	0,078
3676	HV0	0,031	0,901	0,068

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2, L3 e L4); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D e Y); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Tabela 18: Haplogrupos mitocondriais e as proporções de ancestralidade genômica autossômica individual dos 188 controles.

DNA Controles	Haplogrupo Mitocondrial*	INDEL		
		Ameríndio	Europeu	Africano
3699	L1b	0,317	0,547	0,136
3706	L3f1b1	0,277	0,341	0,383
3707	L0a1b1	0,333	0,522	0,145
3713	B4b	0,209	0,347	0,444
3731	C1b	0,064	0,849	0,087
3739	H1e	0,048	0,819	0,133
3740	L2a1	0,092	0,234	0,674
3764	L2c2	0,163	0,573	0,265
3799	L2a1	0,223	0,726	0,051
3800	T1a	0,035	0,773	0,192
3824	L1c3c	0,053	0,753	0,194
3825	C1b	0,061	0,842	0,097
3869	C1d	0,144	0,655	0,201
3880	L3e1	0,335	0,370	0,295
3914	L1c1'2'4'6	0,077	0,281	0,641
3926	L0a1a	0,261	0,560	0,179
3927	I	0,053	0,907	0,040
3931	R0	0,044	0,856	0,100
3956	A2	0,041	0,666	0,293
3970	C1b	0,205	0,743	0,053
3971	L0a2a2	0,126	0,547	0,328
3995	B4b	0,412	0,549	0,039
4061	C1b	0,239	0,287	0,474
4072	L1c4	0,371	0,261	0,368
4079	L3e1d	0,038	0,661	0,301
4096	D1	0,291	0,310	0,399
4097	L3h1b2	0,121	0,758	0,121
4104	B4b	0,432	0,378	0,190
4185	B4b	0,099	0,719	0,182
4297	Y1	0,351	0,477	0,172
4307	B5a	0,352	0,485	0,163
4315	B4b	0,232	0,685	0,083
4316	I1a1	0,221	0,644	0,135
4445	W	0,060	0,854	0,086
4448	I3	0,049	0,885	0,066
4478	L3e3	0,077	0,364	0,559
4479	L3d3a	0,065	0,242	0,693
4758	A2	0,072	0,745	0,182
4759	L0a1b1	0,165	0,746	0,089

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2, L3 e L4); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D e Y); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Tabela 19: Haplogrupos mitocondriais, autodeclaração de cor de pele e as proporções de ancestralidade genômica autossômica individual dos 503 pacientes.

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
1	L3f2b	Branca	0,163	0,538	0,300
2	L1c3b2	Negra	0,083	0,427	0,489
3	L1b	Branca	0,197	0,640	0,163
4	L2c2b	Branca	0,127	0,518	0,355
5	L1c2	Negra	0,075	0,157	0,768
6	A2	Parda	0,211	0,280	0,509
7	L1c1b	Negra	0,032	0,315	0,653
8	H1as1	Branca	0,039	0,894	0,067
9	T2b	Branca	0,110	0,749	0,141
10	L1c3a1b	Branca	0,091	0,414	0,495
11	D1	Branca	0,093	0,786	0,120
12	D1	Branca	0,087	0,716	0,196
13	A2	Parda	0,046	0,496	0,457
14	H2a5a1	Branca	0,049	0,771	0,180
15	R0	Branca	0,125	0,830	0,045
16	C1b	Parda	0,489	0,355	0,156
17	C1b	Branca	0,135	0,333	0,532
18	HV0	Negra	0,181	0,169	0,649
19	L3f1b	Branca	0,321	0,517	0,162
20	B4b	Branca	0,170	0,748	0,082
21	L1c2	Branca	0,350	0,578	0,072
22	C1b	Branca	0,454	0,402	0,144
23	L1b	Parda	0,100	0,443	0,457
24	H11a	Parda	0,419	0,552	0,029
25	L2a1	Parda	0,045	0,566	0,390
26	L3d1a1a	Branca	0,145	0,427	0,428
27	M10a2	Branca	0,110	0,810	0,080
28	A2	Branca	0,028	0,883	0,089
29	L2b1a	Parda	0,069	0,473	0,459
30	R0	Branca	0,206	0,392	0,402
31	A2	Branca	0,201	0,742	0,057
32	H3v	Branca	0,155	0,789	0,056
33	L3e2b	Branca	0,039	0,584	0,377
34	J1b1a1	Branca	0,035	0,906	0,059
35	A2	Branca	0,428	0,279	0,293
36	U3a1c	Branca	0,211	0,691	0,097
37	L2a1a2	Branca	0,075	0,780	0,144
38	L2a1i	Negra	0,081	0,188	0,730
39	R0	Branca	0,058	0,884	0,058

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
40	L3f1b1a	Branca	0,050	0,584	0,366
41	L0a1b	Parda	0,056	0,571	0,373
42	L3d3a	Branca	0,357	0,138	0,505
43	B4b	Branca	0,159	0,625	0,215
44	L3b	Branca	0,064	0,566	0,369
45	U5b2b3a	Branca	0,073	0,871	0,057
46	H24	Branca	0,157	0,483	0,360
47	L1b2a	Parda	0,054	0,828	0,118
48	H5n	Branca	0,256	0,547	0,198
49	L2a1	Branca	0,064	0,705	0,231
50	A2	Parda	0,156	0,765	0,079
51	L3d1b3a	Branca	0,057	0,812	0,131
52	L1c1	Branca	0,096	0,616	0,288
53	C1b8	Parda	0,117	0,346	0,537
54	L2a1	Branca	0,042	0,519	0,439
55	H1j8	Branca	0,099	0,853	0,047
56	A2	Branca	0,378	0,582	0,040
57	H10	Branca	0,168	0,615	0,217
58	U5b2b3a	Nulo	0,073	0,879	0,048
59	L3f1b	Parda	0,320	0,107	0,572
60	C1b	Parda	0,042	0,834	0,123
61	C1b	Branca	0,267	0,189	0,544
62	H11a	Branca	0,051	0,851	0,098
63	L1c1b'd	Parda	0,217	0,507	0,276
64	T1a1'3	Branca	0,212	0,632	0,156
65	L3b	Nulo	0,069	0,600	0,331
66	L3d1b3a	Branca	0,174	0,771	0,055
67	C1b	Branca	0,064	0,848	0,087
68	L2a1c1	Branca	0,143	0,643	0,214
69	L3e2b	Parda	0,074	0,400	0,526
70	K1a3a	Branca	0,075	0,840	0,085
71	H1au	Branca	0,145	0,752	0,103
72	C1b	Branca	0,151	0,429	0,420
73	A2	Branca	0,246	0,605	0,148
74	L2c3	Branca	0,217	0,549	0,234
75	L3f1b1a	Negra	0,052	0,161	0,787
76	L3e1a1	Negra	0,191	0,105	0,704
77	L2a1	Negra	0,129	0,614	0,257
78	J1c	Branca	0,124	0,666	0,210
79	B4b	Branca	0,146	0,770	0,083

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
80	R0	Parda	0,048	0,501	0,451
81	A2	Branca	0,198	0,401	0,402
82	L3e2	Parda	0,113	0,705	0,182
83	W	Branca	0,153	0,768	0,078
84	L3e1	Branca	0,063	0,734	0,203
85	L1c1b	Parda	0,085	0,344	0,572
86	L2a1	Branca	0,215	0,679	0,106
87	L3e1d	Branca	0,343	0,470	0,187
88	L2a1c1	Negra	0,066	0,450	0,484
90	L3e1b	Branca	0,224	0,436	0,340
91	A2	Branca	0,348	0,450	0,201
92	A2	Branca	0,154	0,353	0,493
93	B4b	Branca	0,423	0,256	0,321
94	L1b1a	Branca	0,079	0,751	0,170
95	A2	Negra	0,100	0,395	0,505
96	K1a26	Branca	0,244	0,684	0,072
97	C1d	Branca	0,101	0,541	0,358
98	B2h	Branca	0,322	0,370	0,308
99	L2c2	Parda	0,082	0,367	0,551
100	L2a1a1	Parda	0,077	0,661	0,262
101	D1	Parda	0,323	0,227	0,450
102	L1b	Branca	0,098	0,760	0,142
103	L1c3b2	Nulo	0,061	0,475	0,464
104	H5a4a	Branca	0,090	0,834	0,076
105	L3f1b	Branca	0,136	0,719	0,144
106	R0	Branca	0,038	0,890	0,072
107	R0	Branca	0,039	0,892	0,069
108	L3e3b3	Branca	0,229	0,403	0,368
109	A2	Branca	0,127	0,773	0,100
110	A2	Branca	0,288	0,458	0,253
111	U5b1d1b	Branca	0,213	0,722	0,066
112	M10a1	Branca	0,107	0,837	0,057
113	L3e1d	Negra	0,084	0,265	0,651
114	L2a1	Negra	0,022	0,075	0,903
115	A2	Branca	0,072	0,689	0,239
116	R0	Branca	0,098	0,861	0,041
117	H1	Branca	0,064	0,802	0,134
118	U2e1	Branca	0,137	0,715	0,149
119	L3e2a1	Parda	0,098	0,405	0,497
120	L3f1b1a	Branca	0,113	0,557	0,331

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
121	A2	Branca	0,130	0,806	0,064
122	H1e1a1	Branca	0,174	0,776	0,050
123	L3e2b	Negra	0,167	0,278	0,555
124	L1c1d	Branca	0,156	0,787	0,057
125	L2c3	Parda	0,028	0,091	0,881
126	M9	Branca	0,061	0,860	0,079
127	J2b1c1	Branca	0,054	0,415	0,531
128	L3d1c	Parda	0,127	0,495	0,378
129	B4b	Branca	0,058	0,911	0,031
130	C1	Parda	0,051	0,472	0,476
131	A2	Branca	0,290	0,560	0,150
132	B2c2	Nulo	0,124	0,517	0,359
133	B2c2	Branca	0,101	0,317	0,582
134	B4b	Branca	0,130	0,621	0,249
135	J2a2	Branca	0,065	0,775	0,160
136	L3e3	Branca	0,049	0,764	0,188
137	L3e1b	Branca	0,064	0,738	0,199
138	K2a	Branca	0,092	0,810	0,098
139	T2b4a	Branca	0,115	0,644	0,242
140	L2a1	Branca	0,050	0,157	0,792
141	L3e2b	Branca	0,098	0,677	0,226
142	L1c2	Branca	0,108	0,684	0,208
143	K1a4a1a	Parda	0,040	0,721	0,239
144	R0	Branca	0,148	0,804	0,048
145	A2	Branca	0,095	0,849	0,056
146	H2a1	Branca	0,081	0,622	0,298
147	L3e3	Branca	0,204	0,740	0,056
148	L3e2b	Branca	0,120	0,543	0,337
149	D1f1	Branca	0,481	0,481	0,038
150	L0a2a2	Branca	0,120	0,585	0,295
151	B4b	Negra	0,111	0,432	0,456
152	C1b	Branca	0,497	0,323	0,180
153	B4b	Branca	0,079	0,712	0,209
154	A2	Branca	0,025	0,931	0,044
155	L2c2b	Branca	0,092	0,672	0,237
156	L1c3a1b	Parda	0,047	0,654	0,298
157	L1b1a	Parda	0,043	0,077	0,879
158	L0a1b	Parda	0,175	0,360	0,465
159	A2	Branca	0,093	0,732	0,175
160	L3e1	Negra	0,120	0,566	0,313

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
161	L2a1c	Branca	0,150	0,587	0,262
162	B4b	Parda	0,044	0,617	0,339
163	B4b	Branca	0,058	0,459	0,483
164	L2b	Branca	0,101	0,377	0,522
165	A2	Branca	0,259	0,593	0,148
166	L0a1b	Negra	0,031	0,357	0,612
167	H24	Branca	0,227	0,232	0,541
168	R0	Branca	0,047	0,715	0,238
169	L3e2b	Branca	0,029	0,908	0,063
170	L1c2	Negra	0,175	0,655	0,169
172	L2c	Negra	0,047	0,184	0,769
174	A2	Branca	0,047	0,468	0,486
175	H6	Branca	0,146	0,770	0,084
176	L3d1b3a	Branca	0,098	0,353	0,549
177	L1c1a2	Parda	0,088	0,184	0,728
178	L1c	Branca	0,081	0,737	0,182
179	V3c	Branca	0,212	0,492	0,296
180	R0	Branca	0,063	0,762	0,175
182	H2a5a1	Branca	0,056	0,829	0,116
183	L1c3c	Parda	0,074	0,055	0,872
184	C1b	Branca	0,314	0,603	0,082
185	L1c1a2	Negra	0,203	0,066	0,731
186	B4b	Branca	0,112	0,668	0,220
187	L3e1g	Parda	0,140	0,458	0,402
188	U6a	Branca	0,086	0,690	0,224
189	L3e2b	Branca	0,095	0,072	0,833
190	C1b	Branca	0,085	0,591	0,324
191	R0	Branca	0,273	0,466	0,260
192	B4b	Branca	0,084	0,259	0,657
193	B5	Negra	0,098	0,823	0,079
194	A2f3	Branca	0,128	0,786	0,086
198	D4n	Amarela	0,431	0,436	0,133
199	L1c	Branca	0,184	0,356	0,460
200	HV0	Branca	0,092	0,862	0,046
201	A2	Branca	0,263	0,508	0,229
202	H57	Branca	0,050	0,902	0,048

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
203	B4b	Branca	0,117	0,551	0,333
204	B4b	Branca	0,063	0,892	0,045
205	L2a1a1	Parda	0,086	0,282	0,632
206	L1c1	Negra	0,067	0,069	0,864
207	L3e4a	Branca	0,160	0,596	0,244
210	B4b	Branca	0,080	0,848	0,071
211	L1b1	Branca	0,071	0,574	0,356
212	L2b	Branca	0,249	0,558	0,193
213	C1b	Branca	0,170	0,518	0,312
214	A2	Branca	0,054	0,804	0,142
215	C1a	Branca	0,133	0,495	0,372
216	A2	Parda	0,198	0,421	0,380
217	L1c3b2	Negra	0,049	0,132	0,819
218	L3e2	Branca	0,066	0,199	0,736
219	B4b	Branca	0,090	0,857	0,053
220	H2a1	Branca	0,139	0,811	0,049
221	L0a1b	Parda	0,178	0,244	0,577
222	L3e2b	Parda	0,043	0,672	0,285
223	T1b	Branca	0,058	0,858	0,084
224	B4b	Branca	0,229	0,670	0,101
225	L0a1b	Branca	0,039	0,504	0,457
226	H1a1	Branca	0,076	0,801	0,123
228	L2c	Negra	0,185	0,376	0,439
229	L3e1a1	Negra	0,047	0,205	0,748
230	L1b	Branca	0,346	0,487	0,167
231	L3e1a	Negra	0,042	0,102	0,856
232	A2	Branca	0,179	0,437	0,384
233	L1b1a	Negra	0,035	0,057	0,908
234	H5a4a	Branca	0,082	0,523	0,396
235	B2c2	Parda	0,262	0,491	0,247
236	L3e3	Branca	0,095	0,342	0,563
237	L2a1	Branca	0,096	0,166	0,738
238	L3f1b	Parda	0,116	0,533	0,352
239	L1c2	Branca	0,399	0,331	0,270
240	L2c	Branca	0,128	0,626	0,246
241	L1c1	Negra	0,033	0,030	0,937
242	L2a1	Branca	0,260	0,623	0,118

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
243	HV0	Branca	0,086	0,851	0,063
244	C1b8	Branca	0,046	0,919	0,034
245	L2a1a2	Branca	0,091	0,629	0,280
246	C1b	Branca	0,250	0,589	0,160
247	H1n1b	Branca	0,043	0,914	0,042
248	L3e1a2	Branca	0,150	0,517	0,333
249	L1b1a10	Branca	0,186	0,697	0,117
250	L3e1	Parda	0,319	0,503	0,179
251	R0	Branca	0,031	0,872	0,097
252	R0	Branca	0,211	0,614	0,175
253	H7a2	Branca	0,074	0,802	0,124
254	A2	Branca	0,418	0,426	0,156
255	J1c1	Branca	0,199	0,753	0,048
256	L0a1a	Branca	0,117	0,072	0,812
257	L2c2	Branca	0,143	0,145	0,712
258	A2	Branca	0,225	0,681	0,095
259	L0a2a2	Parda	0,083	0,039	0,878
260	I	Branca	0,057	0,913	0,029
261	A2	Parda	0,040	0,835	0,125
262	H3c2	Branca	0,033	0,934	0,033
263	L2a1a2	Parda	0,158	0,108	0,734
264	H29	Branca	0,089	0,826	0,086
265	N1a3	Branca	0,047	0,797	0,155
266	L2a1	Branca	0,235	0,565	0,200
267	L1c3b2	Branca	0,106	0,403	0,491
268	L3e2b	Branca	0,144	0,792	0,063
269	L3d1b3a	Branca	0,112	0,784	0,104
270	B4b	Branca	0,068	0,673	0,260
271	L3e2b	Branca	0,078	0,801	0,121
272	L2b	Branca	0,280	0,538	0,182
273	N1b1	Branca	0,172	0,711	0,118
274	A2	Branca	0,067	0,765	0,168
275	L2a1i	Branca	0,105	0,197	0,699
276	U3a	Branca	0,161	0,269	0,569
277	H10	Branca	0,038	0,866	0,096
278	H1q2	Branca	0,095	0,866	0,039
279	L2a1b1	Branca	0,058	0,372	0,570
280	L3e2a1b1	Branca	0,221	0,694	0,085
281	L0d1'2	Amarela	0,196	0,447	0,357

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
283	L2c2	Parda	0,035	0,532	0,433
284	L0a2a2	Branca	0,028	0,660	0,312
285	H1b	Branca	0,054	0,834	0,112
286	U5a1	Branca	0,027	0,924	0,050
287	L3e3	Negra	0,047	0,692	0,261
288	N1b1	Branca	0,057	0,588	0,355
289	H1a3	Branca	0,069	0,862	0,069
290	B4b	Parda	0,031	0,714	0,255
291	X2d	Branca	0,186	0,675	0,139
292	D1f1	Branca	0,114	0,520	0,367
293	L2a1	Parda	0,097	0,806	0,096
294	L2a1g	Branca	0,053	0,791	0,155
295	U5a2a	Branca	0,166	0,750	0,084
296	A2	Branca	0,117	0,759	0,124
297	L2b2a	Branca	0,051	0,408	0,540
298	C1b	Branca	0,082	0,824	0,095
299	HV0	Branca	0,072	0,869	0,059
300	L3f1b	Branca	0,042	0,712	0,246
302	H1e4a	Branca	0,191	0,732	0,077
303	U3b2	Branca	0,064	0,855	0,081
304	C1b	Branca	0,270	0,413	0,317
305	L2b1a	Negra	0,109	0,320	0,571
306	U5a1	Branca	0,065	0,842	0,092
307	L1c1b'd	Branca	0,209	0,447	0,344
308	L3e2	Negra	0,048	0,699	0,253
309	L0a1b	Branca	0,152	0,158	0,690
310	L0d1'2	Branca	0,094	0,418	0,489
311	J2a2	Negra	0,384	0,323	0,292
312	K1a4a1a	Branca	0,085	0,811	0,105
313	L1b	Branca	0,084	0,757	0,160
314	L1c4	Branca	0,248	0,560	0,191
315	L3f1b1a	Parda	0,364	0,266	0,371
316	B4b	Branca	0,112	0,572	0,315
317	L2a1g	Negra	0,087	0,183	0,730
318	HV0	Branca	0,080	0,815	0,105
319	L3b1a3	Parda	0,104	0,525	0,371
320	L3e1	Branca	0,146	0,596	0,258
321	C1	Branca	0,488	0,400	0,112
322	L0a1a2	Branca	0,149	0,789	0,062
323	B4b	Branca	0,105	0,829	0,066

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
324	D4o	Branca	0,321	0,629	0,051
325	C1d	Branca	0,040	0,846	0,114
326	L1c3	Negra	0,092	0,159	0,748
327	A2	Branca	0,291	0,611	0,099
328	L2a1	Branca	0,417	0,236	0,346
329	U4a1	Branca	0,102	0,685	0,213
330	B4b	Branca	0,041	0,835	0,125
331	H29	Amarela	0,376	0,522	0,102
332	A2	Branca	0,201	0,696	0,103
333	L0a2a2	Negra	0,052	0,257	0,692
334	HV0	Branca	0,104	0,712	0,184
335	D1	Branca	0,091	0,588	0,322
336	L3d3a	Branca	0,265	0,579	0,156
337	L2a1	Branca	0,375	0,542	0,083
338	L3d2	Branca	0,124	0,627	0,249
339	T1a1'3	Branca	0,344	0,407	0,249
341	L3e1d	Branca	0,115	0,498	0,387
342	L1c3b	Branca	0,057	0,715	0,228
343	H2a2b	Branca	0,216	0,534	0,250
344	C1d	Branca	0,068	0,870	0,063
345	A2	Branca	0,075	0,861	0,064
346	R0	Branca	0,134	0,642	0,224
347	L2b1a	Negra	0,029	0,072	0,900
348	L3e3b3	Branca	0,254	0,608	0,138
349	B4b	Parda	0,164	0,566	0,270
350	L2b3	Branca	0,352	0,415	0,233
351	L0a1b2a	Indígena	0,034	0,404	0,562
352	H1c	Branca	0,065	0,816	0,119
353	L2a1	Branca	0,150	0,410	0,440
354	L3b2	Branca	0,193	0,529	0,277
355	A2	Branca	0,256	0,400	0,344
356	HV17	Branca	0,145	0,766	0,089
357	B4b	Branca	0,231	0,705	0,063
358	L2a1	Branca	0,145	0,575	0,280
359	L0a1a2	Branca	0,192	0,685	0,123
360	R0	Branca	0,093	0,838	0,069
361	L2a1	Branca	0,213	0,546	0,241
362	A2	Branca	0,157	0,336	0,506
363	L1c1b	Branca	0,223	0,391	0,386
364	K1a26	Branca	0,529	0,267	0,204

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
365	C1b	Branca	0,071	0,535	0,394
366	L1c2a1a	Branca	0,036	0,456	0,508
367	L1c3b1a	Branca	0,055	0,832	0,114
368	B2c2	Branca	0,089	0,828	0,083
369	H24	Branca	0,179	0,682	0,139
370	H1c	Parda	0,108	0,397	0,495
371	L3b1b	Branca	0,102	0,538	0,360
372	D1f1	Parda	0,100	0,599	0,301
373	L2a1i	Negra	0,182	0,059	0,759
374	L3e1a1	Branca	0,122	0,582	0,296
375	C1d	Branca	0,076	0,807	0,117
376	L2b	Branca	0,034	0,811	0,155
377	A2	Branca	0,106	0,608	0,286
378	B4b	Branca	0,141	0,828	0,031
379	H2a3	Branca	0,216	0,528	0,256
380	J1c2	Branca	0,048	0,925	0,027
381	B4b	Branca	0,258	0,676	0,066
382	L1c1b	Branca	0,278	0,642	0,081
383	M1b2	Branca	0,037	0,785	0,178
384	L3e2b	Branca	0,178	0,200	0,622
385	L0d1c	Branca	0,155	0,382	0,463
386	H1e1a4	Branca	0,123	0,766	0,111
387	L3b1a3	Parda	0,192	0,518	0,290
388	L3f2	Branca	0,065	0,893	0,042
389	L3e2b	Negra	0,193	0,590	0,217
390	U5b	Branca	0,038	0,888	0,073
391	J1c16	Branca	0,395	0,491	0,114
392	B4b	Branca	0,445	0,441	0,114
393	L2a1g	Branca	0,094	0,511	0,395
394	J1c2	Branca	0,081	0,591	0,329
395	L0a1b	Negra	0,248	0,580	0,171
396	L1c1b'd	Branca	0,088	0,553	0,359
397	L1b1a	Parda	0,079	0,751	0,170
398	L3e2b	Branca	0,268	0,401	0,331
399	H32	Branca	0,114	0,749	0,138
400	D1	Branca	0,481	0,481	0,038
401	H11a	Branca	0,309	0,662	0,029
402	L1c3c	Branca	0,032	0,315	0,653
403	H1ba	Branca	0,105	0,796	0,099
404	L1c	Negra	0,203	0,066	0,731

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
405	L3b1b	Branca	0,057	0,416	0,528
406	L3e2b	Branca	0,066	0,877	0,057
407	D4o	Negra	0,160	0,189	0,651
408	B4b	Branca	0,129	0,798	0,073
409	L2a1	Parda	0,319	0,575	0,106
410	T1a	Amarela	0,137	0,483	0,380
411	L3h1b1	Branca	0,170	0,644	0,186
412	L2a1	Negra	0,051	0,236	0,713
413	L2a1a2	Parda	0,094	0,387	0,520
414	L3f1b	Branca	0,123	0,278	0,598
415	B4b	Parda	0,246	0,374	0,380
416	B4b	Branca	0,156	0,798	0,046
417	A2	Branca	0,078	0,426	0,496
418	T2b	Branca	0,062	0,766	0,172
419	R0	Branca	0,081	0,818	0,100
420	R0	Branca	0,035	0,900	0,065
421	B2i1	Branca	0,290	0,189	0,521
422	H5a5	Branca	0,146	0,768	0,087
423	H3v	Branca	0,072	0,864	0,064
424	L3d4	Branca	0,141	0,479	0,380
425	L2d	Branca	0,052	0,571	0,377
426	B4b	Parda	0,242	0,416	0,342
427	H1b	Branca	0,077	0,846	0,077
428	L3b1a3	Negra	0,327	0,220	0,452
429	L3b1b	Branca	0,103	0,631	0,266
430	B4b	Branca	0,146	0,457	0,398
431	A2	Branca	0,075	0,836	0,090
432	A2	Branca	0,130	0,587	0,283
433	L1c1b	Negra	0,129	0,522	0,349
434	A2	Amarela	0,057	0,896	0,047
435	L1c1b	Negra	0,072	0,436	0,492
436	K1a	Branca	0,126	0,800	0,074
437	A2	Branca	0,218	0,657	0,125
438	L3e2a1	Negra	0,050	0,109	0,842
439	L3d1a1a	Negra	0,107	0,554	0,339
440	L2a1a2	Branca	0,046	0,385	0,569
441	K1a	Branca	0,072	0,599	0,329
442	L3b	Branca	0,062	0,504	0,434
443	L1c1a2	Branca	0,115	0,608	0,276
444	L2a1b1	Branca	0,042	0,650	0,307

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Continuação da Tabela 19

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
445	L1c3a	Negra	0,094	0,420	0,486
446	L3e3b3	Branca	0,299	0,540	0,161
447	B4b	Branca	0,255	0,594	0,152
448	A2	Branca	0,064	0,793	0,143
449	K1a	Branca	0,062	0,865	0,074
450	L3f1b1a	Parda	0,123	0,278	0,598
451	M7e	Branca	0,066	0,890	0,044
452	D1f1	Branca	0,246	0,639	0,115
453	R0	Branca	0,103	0,834	0,063
454	H7a2	Branca	0,103	0,844	0,053
455	HV0	Branca	0,159	0,718	0,122
456	B2c2	Branca	0,056	0,759	0,185
457	L2b1b	Branca	0,239	0,565	0,196
458	L3b2	Branca	0,150	0,751	0,098
459	L2b1b	Parda	0,032	0,049	0,919
460	L2a1	Parda	0,066	0,584	0,350
461	L1c3b2	Branca	0,266	0,485	0,249
462	L1c3a1b	Branca	0,187	0,344	0,469
463	B2c2	Branca	0,160	0,497	0,343
464	L3d1a1a	Branca	0,320	0,292	0,388
465	L1c3a	Branca	0,127	0,653	0,220
466	B4b	Branca	0,091	0,580	0,329
467	B4b	Branca	0,200	0,767	0,034
468	A2	Branca	0,346	0,517	0,136
469	L3d4	Branca	0,149	0,723	0,128
470	L3d1b3	Parda	0,085	0,665	0,250
471	L2a1c2a	Parda	0,192	0,270	0,538
472	L1b1a	Branca	0,047	0,455	0,498
473	U5b	Branca	0,123	0,832	0,046
474	L2c2	Parda	0,050	0,567	0,383
475	L2a1i	Branca	0,056	0,800	0,144
476	C1b	Branca	0,330	0,603	0,067
477	B4b	Branca	0,030	0,565	0,405
478	H1k	Branca	0,079	0,588	0,334
479	L2b1a	Branca	0,093	0,333	0,574
480	T2b	Negra	0,101	0,456	0,443
481	T1a9	Branca	0,071	0,322	0,607
482	H6	Branca	0,078	0,859	0,063
483	L2a1c1	Branca	0,204	0,459	0,337
484	R0	Branca	0,050	0,831	0,119

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

Tabela 19: Haplogrupos mitocondriais, autodeclaração de cor de pele e as proporções de ancestralidade genômica autossômica individual dos 503 pacientes.

DNA Pacientes	Haplogrupo Mitocondrial*	Autodeclaração de Cor de Pele	INDEL		
			Ameríndio	Europeu	Africano
485	L1b1a	Parda	0,093	0,173	0,733
486	A2	Branca	0,267	0,612	0,121
487	A2	Branca	0,413	0,512	0,074
488	B4b	Negra	0,136	0,397	0,466
489	L2a1d	Branca	0,176	0,590	0,234
490	U3	Branca	0,364	0,367	0,268
491	L3e3b2	Parda	0,299	0,540	0,161
492	A2	Branca	0,245	0,644	0,111
493	L2a1	Branca	0,207	0,616	0,177
494	L3d3a	Parda	0,042	0,538	0,420
495	L3b1b	Branca	0,048	0,544	0,408
496	L3e2b	Branca	0,268	0,401	0,331
497	A4	Branca	0,146	0,817	0,037
498	U6a	Branca	0,263	0,675	0,062
499	U4b2a1	Branca	0,181	0,721	0,098
500	L1c2	Parda	0,357	0,399	0,244
501	R0	Nulo	0,050	0,831	0,119
502	L2a1	Nulo	0,312	0,463	0,225
503	L2c2	Nulo	0,177	0,142	0,681
504	U6a3b1	Nulo	0,104	0,558	0,337
505	L1c3b1a	Branca	0,072	0,658	0,270
506	L3f1b1a	Branca	0,061	0,815	0,124
507	L2a5	Branca	0,126	0,680	0,194
508	B4b	Branca	0,155	0,653	0,192
509	A2	Negra	0,220	0,710	0,070
510	L3b2	Parda	0,141	0,336	0,523
511	L3e1a1	Nulo	0,116	0,805	0,080
512	K1c	Nulo	0,144	0,799	0,058
513	HV0	Negra	0,144	0,461	0,394
514	L0a1b	Nulo	0,075	0,351	0,575
515	K1a11a	Branca	0,152	0,737	0,111
516	I3a	Branca	0,099	0,849	0,052

*Haplogrupo africano (L0, L1, L2 e L3); Haplogrupo ameríndio/asiático (A, B, C, D, M e N); Haplogrupo europeu (H, HV, I, J, K, R, T, U, W e X). Continua.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mousa A, Gonzalez AM, Larruga JM, Cabrera VM, Dzimiri N. The mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010;14(1):43-7.

Agyemang C, Bhopal RS. Is the blood pressure of South Asian adults in the UK higher or lower than that in European white adults? A review of cross-sectional data. *J Hum Hypertens*. 2002;16(11):739-51.

Agyemang C, Bindraban N, Mairuhu G, Montfrans Gv, Koopmans R, Stronks K; SUNSET (Surinamese in The Netherlands: Study on Ethnicity and Health) Study Group. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among Black Surinamese, South Asian Surinamese and White Dutch in Amsterdam, The Netherlands: the SUNSET study. *J Hypertens*. 2005; 23:1971–1977.

Agyemang C, Humphry RW, Bhopal R. Divergence with age in blood pressure in African-Caribbean and white populations in England: implications for screening for hypertension. *Am J Hypertens*. 2012;25(1):89-96.

Aiello VD, Reis MM, Benvenuti LA Higuchi M de L, Ramires JA, Halperin JA. A possible role for complement in the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. *J Pathol*. 2002;197:224-9.

Alexe G, Fuku N, Bilal E, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, Ito M, Arai Y, Hirose N, Bhanot G, Tanaka M. Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population. *Hum Genet*. 2007;121(3-4):347-56.

Alvarez-Iglesias V, Mosquera-Miguel A, Cerezo M, Quintáns B, Zarrabeitia MT, Cuscó I, Lareu MV, García O, Pérez-Jurado L, Carracedo A, Salas A. New population and phylogenetic features of the internal variation within mitochondrial DNA macro-haplogroup R0. *PLoS One*. 2009;4(4):e5112.

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2000;67(2):444-61.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-65.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999;23(2):147.

Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, Connor WE. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland: a paradox. *Circulation*. 1993;88:2771–2779.

- Asari M, Azumi J, Shimizu K, Shiono H. Differences in tissue distribution of HV2 length heteroplasmy in mitochondrial DNA between mothers and children. *Forensic Sci Int*. 2008;175(2-3):155-9.
- Bahrami H, Kronmal R, Bluemke DA, Olson J, Shea S, Liu K, Burke GL, Lima JA. Differences in the incidence of congestive heart failure by ethnicity: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arch Intern Med*. 2008;168:2138-45.
- Bailliet G, Rothhammer F, Carnese FR, Bravi CM, Bianchi NO. Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am J Hum Genet*. 1994;55(1):27-33.
- Bamshad M, Guthery SL. Race, genetics and medicine: does the color of a leopard's spots matter? *Curr Opin Pediatr*. 2007;19(6):613-8.
- Bandelt HJ, Parson W. Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region: a reappraisal. *Int J Legal Med*. 2008;122(1):11-21.
- Bandelt HJ, van Oven M, Salas A. Haplogrouping mitochondrial DNA sequences in Legal Medicine/Forensic Genetics. *Int J Legal Med*. 2012;126(6):901-16.
- Barnholtz-Sloan JS, Chakraborty R, Sellers TA, Schwartz AG. Examining population stratification via individual ancestry estimates versus self-reported race. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:1545-51.
- Bastos JL, Peres MA, Peres KG, Dumith SC, Gigante DP. Diferenças socioeconômicas entre autotclassificação e heterotclassificação de cor/raça. *Rev. Saúde Pública*. 2008;42:324-34.
- Batloun M, Souza AD, Barretto ACP, Melo EP, Albanesi FM. II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(4):1-30.
- Behar DM, Vilems R, Soodyall H, Blue-Smith J. The dawn of human matrilineal diversity. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(5):1130-40.
- Behar DM, van Oven M, Rosset S, Metspalu M, Loogväli EL, Silva NM, Kivisild T, Torroni A, Vilems R. A "Copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *Am J Hum Genet*. 2012;90(4):675-84.
- Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet*. 1996;59(6):1276-87.
- Benn M, Schwartz M, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Mitochondrial haplogroups: ischemic cardiovascular disease, other diseases, mortality, and longevity in the general population. *Circulation*. 2008;117:2492-2501.
- Bhat A, Koul A, Sharma S, Rai E, Bukhari SI, Dhar MK, Bamezai RN. The possible role of 10398A and 16189 mtDNA variants in providing susceptibility to T2DM in two North Indian populations: a replicative study. *Hum Genet*. 2007;120(6):821-6.
- Bibbins-Domingo K, Pletcher MJ, Lin F, Vittinghoff E, Gardin JM, Arynchyn A, Lewis CE, Williams OD, Hulley SB. Racial Differences in Incident Heart Failure among Young Adults. *N Engl J Med*. 2009;360(12):1179-90.

- Biffi A, Anderson CD, Nalls MA, Rahman R. Principal-Component Analysis for Assessment of Population Stratification in Mitochondrial Medical Genetics. *Am J Hum Genet.* 2010;86(6):904-17.
- Bini C, Pappalardo G. mtDNA HVI length heteroplasmic profile in different tissues of maternally related members. *Forensic Sci Int.* 2005;152(1):35-8.
- Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1 supl.1):1-71.
- Boldt AB, Luz PR, Messias-Reason IJ. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic Chagas disease. *Clin Immunol.* 2011;140(1):63-70.
- Braga JCV, Reis F, Aras R, Costa ND, Bastos C, Silva R, Soares A, Moura Júnior A, Ásfora S, Latado AL. Aspectos clínicos e terapêuticos da insuficiência cardíaca por doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(4):297-302.
- Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database –update. *Nucleic Acids Research.* 2005;33:611-3.
- Brandstätter A, Niederstätter H, Parson W. Monitoring the inheritance of heteroplasmy by computer-assisted detection of mixed basecalls in the entire human mitochondrial DNA control region. *Int J Legal Med.* 2004;118(1):47-54.
- Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Tratado de medicina cardiovascular. 6ª Edição. Vol 1. São Paulo: Roca; 2003.
- Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, Scozzari R, Cruciani F, Wallace DC. mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am J Hum Genet.* 1998;63(6):1852-61.
- Brulé H, Holmes WM, Keith G, Giegé R, Florentz C. Effect of a mutation in the anticodon of human mitochondrial tRNA^{Pro} on its post-transcriptional modification pattern. *Nucleic Acids Res.* 1998;15;26(2):537-543.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003;4:119-41.
- Cai XY, Wang XF, Li SL, Qian J, Qian DG, Chen F, Yang YJ, Yuan ZY, Xu J, Bai Y, Yu SZ, Jin L. Association of mitochondrial DNA haplogroups with exceptional longevity in a Chinese population. *PLoS One.* 2009;4(7):e6423.
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 1987;325:31-6.
- Cann RL. Genetic clues to dispersal of human populations: retracing the past from the present. *Science.* 2001;291:1742–8.
- Cappuccio FP. Ethnicity and cardiovascular risk: variations in people of African ancestry and South Asian origin. *J Hum Hypertens.* 1997;11(9):571-6.

- Cardena MM, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. A new duplication in the mitochondrially encoded tRNA proline gene in a patient with dilated cardiomyopathy. *Mitochondrial DNA*. 2013a;24(1):46-9.
- Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals. *PLoS One*. 2013b;8(4):e62005.
- Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension. Part I: Definition and Etiology. *Circulation*. 2000;101:329-35.
- Case JT, Wallace DC. Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somat. Cell Genet*. 1981;7:103-8.
- Castro MG, Huerta C, Reguero JR, Soto MI, Doménech E, Alvarez V, Gómez-Zaera M, Nunes V, González P, Corao A, Coto E. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2006;112(2):202-6.
- Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*. 2003;361(9357):598-604.
- Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:266-75.
- Cestari I dos S, Krarup A, Sim RB, Inal JM, Ramirez MI. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):426-37.
- Chakraborty R, Kamboh MI, Nwankwo M, Ferrell RE. Caucasian genes in American blacks: new data. *Am J Hum Genet*. 1992;50(1):145-55.
- Chaturvedi N. Ethnic differences in cardiovascular disease. *Heart*. 2003; 89(6): 681-686.
- Chen A, Raule N, Chomyn A, Attardi G. Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial haplogroups associated with longevity. *PLoS One*. 2012;7(10):e46473.
- Cheng JW. A review of isosorbide dinitrate and hydralazine in the management of heart failure in black patients, with a focus on a new fixed-dose combination. *Clin Ther*. 2006;28(5):666-78.
- Cheng CY, Reich D, Haiman CA, Tandon A, Patterson N, Selvin E, Akyzbekova EL, Brancati FL, Coresh J, Boerwinkle E, Altshuler D, Taylor HA, Henderson BE, Wilson JG, Kao WH. African ancestry and its correlation to type 2 diabetes in African Americans: a genetic admixture analysis in three U.S. population cohorts. *PLoS One*. 2012;7(3):e32840.
- Chinnery PF, Elliott HR, Patel S, Lambert C, Keers SM, Durham SE, McCarthy MI, Hitman GA, Hattersley AT, Walker M. Role of the mitochondrial DNA 16184-16193 poly-C tract in type 2 diabetes. *Lancet*. 2005;366(9497):1650-1.

- Chinnery PF, Elliot HR, Syed A, Rothwell PM. Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. *Lancet Neurol*. 2010;9:498-503.
- Chung U, Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Shin KJ. Mitochondrial DNA CA dinucleotide repeats in Koreans: the presence of length heteroplasmy. *Int J Legal Med*. 2005;119(1):50-3.
- Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol*. 1991;7:453-78.
- Collins-Schramm HE, Phillips CM, Operario DJ, Lee JS, Weber JL, Hanson RL, Knowler WC, Cooper R, Li H, Seldin MF. Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 2002;70:737-750.
- Crispim D, Fagundes NJ, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Roisenberg I. Role of the mitochondrial m.16189T>C variant in type 2 diabetes mellitus in southern Brazil. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006;74(2):204-6.
- Coviello J. Heart failure: an update. *Home Healthc Nurse*. 2009;27(6):354-61;362-3.
- Davenport C, Cheng EY, Kwok YT, Lai AH, Wakabayashi T, Hyde C, Connock M. Assessing the diagnostic test accuracy of natriuretic peptides and ECG in the diagnosis of left ventricular dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Br J Gen Pract*. 2006;56(522):48-56.
- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2656-68.
- Dries DL, Exner DV, Gersh BJ, Cooper HA, Carson PE, Domanski MJ. Racial differences in the outcome of left ventricular dysfunction. *N Engl J Med*. 1999;340:609-616.
- Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2010;375(9710):181-3.
- Egeland T, Bøvelstad HM, Storvik GO, Salas A. Inferring the most likely geographical origin of mtDNA sequence profiles. *Ann Hum Genet*. 2004;68(Pt 5):461-71.
- Elkayam U, Bitar F. Effects of nitrates and hydralazine in heart failure: clinical evidence before the African American heart failure trial. *Am J Card*. 2005;96(7B):37i-43i.
- Enoch MA, Shen PH, Xu K, Hodgkinson C, Goldman D. Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification. *J Psychopharmacol*. 2006;20(4 Suppl):19-26.
- Ergul A. Hypertension in Black Patients. An Emerging Role of the Endothelin System in Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension*. 2000;36:62-7.
- Feder J, Ovadia O, Blech I, Cohen J, Wainstein J, Harman-Boehm I, Glaser B, Mishmar D. Parental diabetes stat reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Med Genet*. 2009;10:60.

- Feldman AM. The emerging role of pharmacogenomics in the treatment of patients with heart failure. *Ann Thorac Surg.* 2003;76:S2246-253.
- Fernández JR, Shiver MD. Using genetic admixture to study the biology of obesity traits and to map genes in admixed populations. *Nutr Rev.* 2004;62(7 Pt 2):S69-74.
- Florez JC, Price AL, Campbell D, Riba L, Parra MV, Yu F, Duque C, Saxena R, Gallego N, Tello-Ruiz M, Franco L, Rodríguez-Torres M, Villegas A, Bedoya G, Aguilar-Salinas CA, Tusié-Luna MT, Ruiz-Linares A, Reich D. Strong association of socioeconomic status with genetic ancestry in Latinos: implications for admixture studies of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52(8):1528-36.
- Foley RA, Lahr MM. Mode 3 technologies and the evolution of modern humans. *Cambridge Journal of Archaeology.* 1997;7:3-36.
- Forster P, Matsumura S. Evolution. Did early humans go North or South? *Science.* 2005; 308(5724):965-6.
- Francez PA, Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos SE. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(1):132-5.
- Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Nozawa Y, Lee HK, Tanaka M. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(3):407-15.
- Galanter JM, Fernandez-Lopez JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernandez-Rozadilla C, Via M, Hidalgo-Miranda A, Contreras AV, Figueroa LU, Raska P, Jimenez-Sanchez G, Zolezzi IS, Torres M, Ponte CR, Ruiz Y, Salas A, Nguyen E, Eng C, Borjas L, Zabala W, Barreto G, González FR, Ibarra A, Taboada P, Porras L, Moreno F, Bigham A, Gutierrez G, Brutsaert T, León-Velarde F, Moore LG, Vargas E, Cruz M, Escobedo J, Rodriguez-Santana J, Rodriguez-Cintrón W, Chapela R, Ford JG, Bustamante C, Seminara D, Shriver M, Ziv E, Burchard EG, Haile R, Parra E, Carracedo A; LACE Consortium. Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002554.
- Gallagher D, Albu J, He Q, Heshka S, Boxt L, Krasnow N, Elia M. Small organs with a high metabolic rate explain lower resting energy expenditure in African American than in white adults. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1062–7.
- Gallardo ME, García-Pavía P, Chamorro R, Vázquez ME, Gómez-Bueno M, Millán I, Almoguera B, Domingo V, Segovia J, Vilches C, Alonso-Pulpón L, Garesse R, Bornstein B. Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *Eur Heart J.* 2012;33(3):346-53.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl. Acad Sc. USA.* 1980;77:6715–19.
- Giles TD. Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2006;8(12 Suppl 4):2-16.

- Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, Seidman JG, Seidman CE, Krieger JE, Pereira AC. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(1):111-6.
- Gonçalves VF, Stenderup J, Rodrigues-Carvalho C, Silva HP, Gonçalves-Dornelas H, Liryo A, Kivisild T, Malaspinas AS, Campos PF, Rasmussen M, Willerslev E, Pena SD. Identification of Polynesian mtDNA haplogroups in remains of Botocudo Amerindians from Brazil. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(16):6465-9.
- Gordon HS, Nowlin PR, Maynard D, Berbaum ML, Deswal A. Mortality after hospitalization for heart failure in blacks compared to whites. *Am J Cardiol.* 2010;105(5):694-700.
- Gray MW. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol.* 1992;141-233.
- Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene.* 1983;21:33-49.
- Guimarães ASA. Classes, raças e democracia. São Paulo: 2002; 34.
- Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2002.
- Guzmán N, Lanás F, Salazar LA. Influence of Amerindian mitochondrial DNA haplogroups on thrombosis susceptibility and frequency of four genetic prothrombotic variants in Southern Chilean subjects. *Clin Chim Acta.* 2010;411(5-6):444-7.
- Haber M, Youhanna SC, Balanovsky O, Saade S, Martínez-Cruz B, Ghassibe-Sabbagh M, Shasha N, Osman R, el Bayeh H, Koshel S, Zaporozhchenko V, Balanovska E, Soria-Hernanz DF, Platt DE, Zalloua PA. mtDNA lineages reveal coronary artery disease-associated structures in the Lebanese population. *Ann Hum Genet.* 2012;76(1):1-8.
- Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA.* 2003;290(2):199-206.
- Harshfield GA, Dong Y, Kapuku GK, Zhu H, Hanevold CD. Stress-induced sodium retention and hypertension: a review and hypothesis. *Curr Hypertens Rep.* 2009;11(1):29-34.
- Hedman M, Brandstätter A, Pimenoff V, Sistonen P, Palo JU, Parson W, Sajantila A. Finnish mitochondrial DNA HVS-I and HVS-II population data. *Forensic Sci Int.* 2007;172(2-3):171-8.
- Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Bonilla C, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1492-1504.
- Holland MM. Molecular analysis of the human mitochondrial DNA control region for forensic identity testing. *Curr Protoc Hum Genet.* 2012;14:14.7.
- Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Ver.* 1999;11:21-50.

- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, Tajima K. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol.* 1993;10(1):23-47.
- Howell N, Kubacka I, Mackey DA. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am J Hum Genet.* 1996;59(3):501-9.
- Hublin JJ. *The Geography of Neandertals and Modern Humans in Europe and the Greater Mediterranean*, eds Bar-Yosef O., Pilbeam D. (Peabody Museum, Harvard Univ. Press, Cambridge, MA), 2000;157–182.
- Hudson G, Nalls M, Evans JR, Breen DP, Winder-Rhodes S, Morrison KE, Morris HR, Williams-Gray CH, Barker RA, Singleton AB, Hardy J, Wood NE, Burn DJ, Chinnery PF. Two-stage association study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in Parkinson disease. *Neurology.* 2013;80(22):2042-2048.
- Huhne J, Pfeiffer H, Brinkmann B. Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples. *Int J Legal Med.* 1999;112(1): 27-30.
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 2005;20:112(12):e154-235.
- Hunter GR, Weinsier RL, Darnell BE, Zuckerman PA, Goran MI. Racial differences in energy expenditure and aerobic fitness in premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:500–6.
- Hutchinson CA 3rd, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature.* 1974;251:536–38.
- Hwang S, Kwak SH, Bhak J, Kang HS, Lee YR, Koo BK, Park KS, Lee HK, Cho YM. Gene expression pattern in transmitochondrial cytoplasmic hybrid cells harboring type 2 diabetes-associated mitochondrial DNA haplogroups. *PLoS One.* 2011;6(7):e22116.
- IBGE. Síntese de Indicadores Sociais. Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicsois2010/SIS_2010.pdf>.
- Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 2000;408:708-13.
- Irwin JA, Saunier JL, Beh P, Strouss KM, Paintner CD, Parsons TJ. Mitochondrial DNA control region variation in a population sample from Hong Kong, China. *Forensic Sci Int.* 2009;3:119-125.
- Ismail-Beigi F. Clinical practice. Glycemic management of type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2012;366(14):1319-27.

- Jazin EE, Cavelier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(22):12382-7.
- Jin L, Su B. Natives or immigrants: modern human origin in East Asia. *Nat Rev Genet*. 2000;1(2):126-33.
- Jolly S, Vittinghoff E, Chattopadhyay A, Bibbins-Domingo K. Higher cardiovascular disease prevalence and mortality among younger blacks compared to whites. *Am J Med*. 2010;123(9):811-8.
- Kalinowski L, Dobrucki I, Malinski T. Race-specific differences in endothelial function: predisposition of African Americans to vascular disease. *Circulation*. 2004;109:2511-7.
- Klatsky AL. Epidemiology of coronary heart disease--influence of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994;18(1):88-96.
- Khogali SS, Mayosi BM, Beattie JM, McKenna WJ, Watkins H, Poulton J. A common mitochondrial DNA variant associated with susceptibility to dilated cardiomyopathy in two different populations. *Lancet*. 2001;357:1265-7.
- Kramer H, Han C, Post W, Goff D, Diez-Roux A, Cooper R, Jinagouda S, Shea S. Racial/ethnic differences in hypertension and hypertension treatment and control in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Am J Hypertens*. 2004;17(10):963-70.
- Kofler B, Mueller EE, Eder W, Stanger O, Maier R, Weger M, Haas A, Winker R, Schmut O, Paulweber B, Iglseder B, Renner W, Wiesbauer M, Aigner I, Santic D, Zimmermann FA, Mayr JA, Sperl W. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet*. 2009;21;10:35.
- Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, Wang CY, Zhong L, Zhu CL, Wu SF, Torroni A, Zhang YP. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum Mol Genet*. 2006;15(13):2076-2086.
- Kosoy R, Qi L, Nassir R, Garcia L, Allison M, Shigeta R, Robbins J, Seldin MF. Relationship between hypertension and admixture in post-menopausal African American and Hispanic American women. *J Hum Hypertens*. 2012;26(6):365-73.
- Krishnan N, Dickman MB, Becker DF. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biol Med*. 2008;44(4):671-681.
- Laguardia J. O Uso da Variável “Raça” na Pesquisa em Saúde. *PHYSIS: Rev. Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro. 2004;14(2):197-234.
- Lahr MM, Foley RA. Towards a theory of modern human origins: Geography, demography, and diversity in recent human evolution. *Yearbook of Physical Anthropology*. 1998;41:127-76.

- Lai CQ, Tucker KL, Choudhry S, Parnell LD, Mattei J, García-Bailo B, Beckman K, Burchard EG, Ordovás JM. Population admixture associated with disease prevalence in the Boston Puerto Rican health study. *Hum Genet.* 2009;125(2):199-209.
- Lee HR, Johnson K. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 2006. In press.
- Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Chung U, Shin KJ. Mitochondrial DNA control region sequences in Koreans: identification of useful variable sites and phylogenetic analysis for mtDNA data quality control. *Int J Legal Med.* 2006;120(1):5-14.
- Lee C, Măndoiu II, Nelson CE. Inferring ethnicity from mitochondrial DNA sequence. *BMC Proc.* 2011;5 Suppl 2:S11.
- Leite TK, Fonseca RM, de França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported "color" and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One.* 2011;6(11):e27162.
- Levin L, Zhidkov I, Gurman Y, Hawlena H, Mishmar D. Functional recurrent mutations in the human mitochondrial phylogeny: dual roles in evolution and disease. *Genome Biol Evol.* 2013;5(5):876-90.
- Levine RL, Berlett BS, Moskowitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 1999;107(3):323-32.
- Liao WQ, Pang Y, Yu CA, Wen JY, Zhang YG, Li XH. Novel mutations of mitochondrial DNA associated with type 2 diabetes in Chinese Han population. *Tohoku J Exp Med.* 2008;215(4):377-84.
- Lin TK, Chen SD, Wang PW, Wei YH, Lee CF, Chen TL, Chuang YC, Tan TY, Chang KC, Liou CW. Increased oxidative damage with altered antioxidative status in type 2 diabetic patients harboring the 16189 T to C variant of mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2005a;1042:64-9.
- Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2005b;280(6):4617-26.
- Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, Collins SP, Ezekowitz JA, Givertz MM, Katz SD, Klapholz M, Moser DK, Rogers JG, Starling RC, Stevenson WG, Tang WH, Teerlink JR, Walsh MN. HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail.* 2010;16(6):e1-194.
- Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol.* 2010;22(2):187-92.
- Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, Oliveira RJ, Pereira RW. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol.* 2011;21(4):240-5.

- Lins TC, Pires AS, Paula RS, Moraes CF, Vieira RG, Vianna LG, Nobrega OT, Pereira RW. Association of serum lipid components and obesity with genetic ancestry in an admixed population of elderly women. *Genet Mol Biol.* 2012;35(3):575-82.
- Liou CW, Lin TK, Chen JB, Tiao MM, Weng SW, Chen SD, Chuang YC, Wang PW. Association between a common mitochondrial DNA D-loop polycytocine variant and alteration of mitochondrial copy number in human peripheral blood cells. *J Med Genet.* 2010;47:723–728.
- Lu Z, Chen H, Meng Y, Wang Y, Xue L, Zhi S, Qiu Q, Yang L, Mo JQ, Guan MX. The tRNAMet 4435A>G mutation in the mitochondrial haplogroup G2a1 is responsible for maternally inherited hypertension in a Chinese pedigree. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(11):1181-6.
- Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum Genet.* 1997;101:384.
- Lutz S, Wittig H, Weisser HJ, Heizmann J, Junge A, Dimo-Simonin N, Parson W, Edelmann J, Anslinger K, Jung S, Augustin C. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci Int.* 2000a;113(1-3):97-101.
- Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals. *Int J Legal Med.* 2000b;113(3):155-61.
- Lutz-Bonengel S, Sanger T, Pollak S, Szibor R. Different methods to determine length heteroplasmy within the mitochondrial control region, *Int J Legal Med.* 2004;118(5):274-81.
- Luz PR, Miyazaki MI, Neto NC, Nisihara RN, Messias-Reason IJ. High levels of mannose-binding lectin are associated with the risk of severe cardiomyopathy in chronic Chagas Disease. *Int. J. Cardiol.* 2010;143:448–50.
- Malik S, Sudoyo H, Pramoonjago P, Suryadi H, Sukarna T, Njunting M, Sahiratmadja E, Marzuki S. Nuclear mitochondrial interplay in the modulation of the homopolymeric tract length heteroplasmy in the control (D-loop) region of the mitochondrial DNA. *Hum Genet.* 2002;110(5):402-11.
- Manta FS, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol.* 2013;40(1):94-8.
- Marchington DR, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: support for a genetic bottleneck. *Am J Hum Genet.* 1997;60(2):408-16.
- Marks AR. A guide for the perplexed: towards an understanding of the molecular basis of heart failures. *Circulation.* 2003;107(11):1456-9.
- Maruszak A, Gaweda-Walerych K, Sołtyszewski I, Zekanowski C. Mitochondrial DNA in pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Acta Neurobiol. Exp.* 2006;66:153-76.

- Maruszak A, Adamczyk JG, Siewierski M, Sozański H, Gajewski A, Zekanowski C. Mitochondrial DNA variation is associated with elite athletic status in the Polish population. *Scand J Med Sci Sports*. 2012. doi: 10.1111/sms.12012.
- McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB: The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med*. 1971;285(26):1441-6.
- McKeigue PM, Carpenter JR, Parra EJ, Shriver MD. Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African-American populations. *Ann Hum Genet*. 2000;64(Pt 2):171-86.
- McKeigue PM. Prospects for admixture mapping of complex traits. *Am J Hum Genet*. 2005;76(1):1-7.
- Mellars P. Why did modern human populations disperse from Africa ca. 60,000 years ago? A new model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(25):9381-6.
- Melton T. Mitochondrial DNA Heteroplasmy. *Forensic Science Review*. 2004;16(1):1-20.
- Micheloud D, Berenguer J, Guzmán-Fulgencio M, Campos Y, García-Álvarez M, Catalán P, Cosín J, Miralles P, López JC, Resino S. Europea mitochondrial DNA haplogroups and metabolic disorders in HIV/HCV-coinfected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;58(4):371-8.
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(1):171-6.
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <<http://www.mitomap.org>>, 2013.
- Mohlke KL, Jackson AU, Scott LJ, Peck EC, Suh YD, Chines PS, Watanabe RM, Buchanan TA, Conneely KN, Erdos MR, Narisu N, Enloe S, Valle TT, Tuomilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS. Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Hum Genet*. 2005;118(2):245-54.
- Momiyama Y, Furutani M, Suzuki Y, Ohmori R, Imamura S, Mokubo A, Asahina T, Murata C, Kato K, Anazawa S, Hosokawa K, Atsumi Y, Matsuoka K, Kimura M, Kasanuki H, Ohsuzu F, Matsuoka R. A mitochondrial DNA variant associated with left ventricular hypertrophy in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312(3):858-64.
- Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007;93(9):1137-46.
- Mueller EE, Eder W, Ebner S, Schwaiger E, Santic D, Kreindl T, Stanger O, Paulweber B, Iglseder B, Oberkofler H, Maier R, Mayr JA, Krempler F, Weitgasser R, Patsch W, Sperl W, Kofler B. The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European population. *PLoS One*. 2011;6(1):e16455.
- Nassir R, Qi L, Kosoy R, Garcia L, Allison M, Ochs-Balcom HM, Tylavsky F, Manson JE, Shigeta R, Robbins J, Seldin MF. Relationship between adiposity and admixture in African-American and Hispanic-American women. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(2):304-13.

- Nelson TM, Just RS, Loreille O, Schanfield MS, Podini D. Development of a Multiplex single base extension assay for mitochondrial DNA haplogroup typing. *Croat Med J*. 2007;48:460-72.
- Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Tanaka M. Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. *Hum Genet*. 2007;120(6):827-36.
- Nishigaki Y, Fuku N, Tanaka M. Mitochondrial haplogroups associated with lifestyle-related diseases and longevity in the Japanese population. *Geriatr Gerontol Int*. 2010;10 Suppl 1:S221-35.
- Palacín M, Alvarez V, Martín M, Díaz M, Corao AI, Alonso B, Díaz-Molina B, Lozano I, Avanzas P, Morís C, Reguero JR, Rodríguez I, López-Larrea C, Cannata-Andía J, Batalla A, Ruiz-Ortega M, Martínez-Camblor P, Coto E. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion*. 2011;11(1):176-81.
- Palmieri VO, De Rasmo D, Signorile A, Sardanelli AM, Grattagliano I, Minerva F, Cardinale G, Portincasa P, Papa S, Palasciano G. T16189C mitochondrial DNA variant is associated with metabolic syndrome in Caucasian subjects. *Nutrition*. 2011;27(7-8):773-7.
- Park KS, Chan JC, Chuang LM, Suzuki S, Araki E, Nanjo K, Ji L, Ng M, Nishi M, Furuta H, Shirotani T, Ahn BY, Chung SS, Min HK, Lee SW, Kim JH, Cho YM, Lee HK; Study Group of Molecular Diabetology in Asia. A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. *Diabetologia*. 2008;51(4):602-8.
- Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, Forrester T, Allison DB, Deka R, Ferrell RE, Shriver MD. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet*. 1998;63(6):1839-51.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(1):177-82.
- Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Legal Med*. 1998;111(3):124-32.
- Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland MM. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet*. 1997;15(4):363-8.
- Pashou P, Ziv E, Burchard EG, Choudhry S, Rodriguez-Cintron W, Mahoney MW, Drineas P. PCA-Correlated SNPs for Structure Identification in Worldwide Human Populations. *Plos Genet*. 2007;3(9):1672-86.
- Pavan L, Casiglia E, Braga LM, Winnicki M, Puato M, Pauletto P, Pessina AC. Effects of a traditional lifestyle on the cardiovascular risk profile: the Amondava population of the Brazilian Amazon. Comparison with matched African, Italian and Polish populations. *J Hypertens*. 1999;17, 749-756.

Pena SDJ. Razões para banir o conceito de etnia da medicina brasileira. *História, Ciência, Saúde – Manguinhos*. 2005;12(1):321-46.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011;6(2):e17063.

Pepinski W, Abreu-Glowacka M, Koralewska-Kordel M, Michalak E, Kordel K, Niemcunowicz-Janica A, Szeremeta M, Konarzewska M. Population genetics of 30 INDELs in populations of Poland and Taiwan. *Mol Biol Rep*. 2013. [Epub ahead of print].

Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, Carracedo Á, Gusmão L. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One*. 2012;7(1):e29684.

Pfaff CL, Barnholtz-Sloan J, Wagner JK, Long JC. Information on ancestry from genetic markers. *Genet Epidemiol*. 2004;26(4):305-15.

Poulton J, Scott Brown M, Cooper A, Marchington DR, Phillips DIW. A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life. *Diabetologia*. 1998;41:54–8.

Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet*. 2002;11(13):1581-3.

Price AL, Patterson N, Yu F, Cox DR, Waliszewska A, McDonald GJ, Tandon A, Schirmer C, Neubauer J, Bedoya G, Duque C, Villegas A, Bortolini MC, Salzano FM, Gallo C, Mazzotti G, Tello-Ruiz M, Riba L, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S, Menjivar M, Klitz W, Henderson B, Haiman CA, Winkler C, Tusie-Luna T, Ruiz-Linares A, Reich D. A genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet*. 2007;80(6):1024-36.

Qi L, Nassir R, Kosoy R, Garcia L, Curb JD, Tinker L, Howard BV, Robbins J, Seldin MF. Relationship between diabetes risk and admixture in postmenopausal African-American and Hispanic-American women. *Diabetologia*. 2012;55(5):1329-37.

Reidla M, Kivisild T, Metspalu E, Kaldma K, Tambets K, Tolk HV, Parik J, Loogväli EL, Derenko M, Malyarchuk B, Bermisheva M, Zhadanov S, Pennarun E, Gubina M, Golubenko M, Damba L, Fedorova S, Gusar V, Grechanina E, Mikerezi I, Moisan JP, Chaventré A, Khusnutdinova E, Osipova L, Stepanov V, Voevoda M, Achilli A, Rengo C, Rickards O, De Stefano GF, Papiha S, Beckman L, Janicijevic B, Rudan P, Anagnou N, Michalodimitrakis E, Koziel S, Usanga E, Geberhiwot T, Herrnstadt C, Howell N, Torroni A, Villems R. Origin and diffusion of mtDNA haplogroup X. *Am J Hum Genet*. 2003;73(5):1178-90.

Reiner AP, Carlson CS, Ziv E, Iribarren C, Jaquish CE, Nickerson DA. Genetic ancestry, population sub-structure, and cardiovascular disease-related traits among African-American participants in the CARDIA Study. *Hum Genet*. 2007;121(5):565-75.

- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsas I et al: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93(5):841-2.
- Rocha AMFS. *Refined characterization of Portuguese mtDNA diversity for forensic purposes*. Porto, Portugal: Faculdade de Ciências Universidade do Porto; 2012.
- Rocha MOC, Correia PC, Barros MV, Torres RM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Cardiovascular function in elderly patients with chronic chagasic cardiopathy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):545-50.
- Rosa A, Fonseca BV, Krug T, Manso H, Gouveia L, Albergaria I, Gaspar G, Correia M, Viana-Baptista M, Simões RM, Pinto AN, Taipa R, Ferreira C, Fontes JR, Silva MR, Gabriel JP, Matos I, Lopes G, Ferro JM, Vicente AM, Oliveira SA. Mitochondrial haplogroup H1 is protective for ischemic stroke in Portuguese patients. *BMC Med Genet*. 2008;9:57.
- Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008;117(4):e25-146.
- Royal CD, Novembre J, Fullerton SM, Goldstein DB, Long JC, Bamshad MJ, Clark AG. Inferring genetic ancestry: opportunities, challenges, and implications. *Am J Hum Genet*. 2010;86:661-73.
- Ruiz-Narváez EA, Bare L, Arellano A, Catanese J, Campos H. West African and Amerindian ancestry and risk of myocardial infarction and metabolic syndrome in the Central Valley population of Costa Rica. *Hum Genet*. 2010;127(6):629-38.
- Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:D823-8.
- Ruppert V, Nolte D, Aschenbrenner T, Pankuweit S, Funck R, Maisch B. Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:535-43.
- Salas A, Carracedo A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ. A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(3):891-9.
- Salzano FM, Botolini MC. *Evolution and genetics of Latin American populations*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat*. 2010;31(2):184-90.

- Saunier JL, Irwin JA, Strouss KM, Ragab H, Sturk KA, Parsons TJ. Mitochondrial control region sequences from an Egyptian population sample. *Forensic Sci Int Genet*. 2009;3(3):e97-103.
- Sawabe M, Tanaka M, Chida K, Arai T, Nishigaki Y, Fuku N, Mieno MN, Kuchiba A, Tanaka N. Mitochondrial haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese elderly: an autopsy study of 1,536 patients. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(2):166-75.
- Sawyer DB. Oxidative stress in heart failure: what are we missing? *Am J Med Sci*. 2011;342(2):120-4.
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(12):878-90.
- Scott RL. Is heart failure in African Americans a distinct entity? *Congest Heart Fail*. 2003;9(4):193-6.
- Serrano Junior C, Timerman A, Stefanini E. Tratado de Cardiologia SOCESP. 2ª Edição, Vol.1, Barueri, São Paulo: *Manole*, 2009.
- Shahabi A, Wilson ML, Lewinger JP, Goodwin TM, Stern MC, Ingles SA. Genetic admixture and risk of hypertensive disorders of pregnancy among Latinas in Los Angeles County. *Epidemiology*. 2013;24(2):285-94.
- Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:409-35.
- Shields GF, Schmiechen AM, Frazier BL, Redd A, Voevoda MI, Reed JK, Ward RH. mtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and northern North American populations. *Am J Hum Genet*. 1993;53(3):549-62.
- Shriver MD, Smith MW, Jin L, Marcini A, Akey JM, Deka R, Ferrell RE. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet*. 1997;60(4):957-64.
- Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, Balam-Ortiz E, del Bosque-Plata L, Velazquez-Fernandez D, Lara C, Goya R, Hernandez-Lemus E, Davila C, Barrientos E, March S, Jimenez-Sanchez G. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(21):8611-6.
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*. 2001;293(5529):489-93.
- Stewart JE, Fisher CL, Aagaard PJ, Wilson MR, Isenberg AR, Polanskey D, Pokorak E, DiZinno JA, Budowle B. Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. *J Forensic Sci*. 2001;46(4):862-70.
- Stringer C. Coasting fora da África. *Nature*. 2000;405:24-7.

- Sucheston LE, Bensen JT, Xu Z, Singh PK, Preus L, Mohler JL, Su LJ, Fontham ET, Ruiz B, Smith GJ, Taylor JA. Genetic ancestry, self-reported race and ethnicity in African Americans and European Americans in the PCaP cohort. *PLoS One*. 2012;7(3):e30950.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 1999;402(6760):371-2.
- Takagi K, Yamada Y, Gong JS, Sone T, Yokota M, et al. Association of a 5178C→A (Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals. *Atherosclerosis*. 2004;175(2):281-6.
- Takamatsu C, Umeda S, Ohsato T, Ohno T, Abe Y, Fukuoh A, Shinagawa H, Hamasaki N, Kang D. Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep*. 2002;3(5):451-6.
- Tanaka M, Gong J, Zhang J, Yamada Y, Borgeld HJ, et al. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mech Ageing Dev*. 2000;116(2-3):65-76.
- Tanaka M, Fuku N, Nishigaki Y, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Ito M, Nozawa Y, Yamada Y. Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. *Diabetes*. 2007;56(2):518-21.
- Tandon A, Patterson N, Reich D. Ancestry informative marker panels for African Americans based on subsets of commercially available SNP arrays. *Genet Epidemiol*. 2011;35(1):80-3.
- Tang H, Quertermous T, Rodriguez B, Kardia SL, Zhu X, Brown A, Pankow JS, Province MA, Hunt SC, Boerwinkle E, Schork NJ, Risch NJ. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Am J Hum Genet*. 2005;76:268-275.
- Tang DL, Zhou X, Li X, Zhao L, Liu F. Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006a;73(1):77-82.
- Tang H, Jorgenson E, Gadde M, Kardia SL, Rao DC, Zhu X, Schork NJ, Hanis CL, Risch N. Racial admixture and its impact on BMI and blood pressure in African and Mexican Americans. *Hum Genet*. 2006b;119(6):624-33.
- Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, Carson P, D'Agostino R Jr, Ferdinand K, Taylor M, Adams K, Sabolinski M, Worcel M, Cohn JN; African-American Heart Failure Trial Investigators. Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N Engl J Med*. 2004;351(20):2049-57.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(5):389-402.
- Templeton A. Out of Africa again and again. *Nature*. 2002;416(6876):45-51.
- The Criteria Committee of the New York Heart Association. Diseases of the heart and blood vessels: nomenclature and criteria for diagnosis. Boston: Little, Brown and Co; 1964.

- Telles EE. Racial ambiguity among the Brazilian population. *Ethn Racial Stud.* 2002;25:415-41.
- Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, Ip WK, Lau YL, Reason IJ, Eiberg H, Gadjeva M, Ruseva M, Jensenius JC. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun.* 2007;8(2):154-63.
- Thygesen K, Alpert JS, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2007;28(20):2525-38.
- Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet.* 1993a;53(3):563-90.
- Torroni A, Sukernik RI, Schurr TG, Starikorskaya YB, Cabell MF, Crawford MH, Comuzzie AG, Wallace DC. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am J Hum Genet.* 1993b;53:591-608
- Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC. mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet.* 1994;55(4):760-76.
- Torroni A, Achilli A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet.* 2006;22:339-45.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative Stress and Heart Failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):H2181-90.
- Tsutsumi H, Komuro T, Mukoyama R, Nogami H. Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA from dental pulp and a family analysis. *J Oral Sci.* 2006;48(3):145-52.
- Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003;40(7):423-9.
- van Owen M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat.* 2009;30(2):E386-94. <http://www.phylotree.org>.
- Vanecek T, Vorel F, Sip M. Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data. *Int J Legal Med.* 2004;118(1):14-8.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene.* 1999;30:211-38.
- Wang D, Taniyama M, Suzuki Y, Katagiri T, Ban Y. Association of the mitochondrial DNA 5178A/C polymorphism with maternal inheritance and onset of type 2 diabetes in Japanese patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109(7):361-4.
- Wassel CL, Pankow JS, Peralta CA, Choudhry S, Seldin MF, Arnett DK. Genetic ancestry is associated with subclinical cardiovascular disease in African-Americans

and Hispanics from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(6):629-36.

Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/ deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2002;71:854-62.

Wei YL, Yu CA, Yang P, Li AL, Wen JY, Zhao SM, Liu HX, Ke YN, Campbell W, Zhang YG, Li XH, Liao WQ. Novel mitochondrial DNA mutations associated with Chinese familial hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 Mar 26.

Weng SW, Liou CW, Lin TK, Wei YH, Lee CF, Eng HL, Chen SD, Liu RT, Chen JF, Chen IY, Chen MH, Wang PW. Association of mitochondrial deoxyribonucleic acid 16189 variant (T->C transition) with metabolic syndrome in Chinese adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5037-40.

Winkler CA, Nelson GW, Smith MW. Admixture mapping comes of age. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:65-89.

White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol*. 2008;17(23):4925-42.

Wilson MR, Allard MW, Monson K, Miller KW, Budowle B. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. *Forensic Sci Int*. 2002;129(1):35-42.

Yancy CW. Heart failure in African Americans: a cardiovascular enigma. *J Card Fail*. 2000;6:183-6.

Yancy CW. Heart failure in African Americans. *Am J Cardiol*. 2005;96(7B):3i-12i.

Young JH, Chang YP, Kim JD, Chretien JP, Klag MJ, Levine MA, Ruff CB, Wang NY, Chakravarti A. Differential susceptibility to hypertension is due to selection during the out-of-Africa expansion. *PLoS Genet*. 2005;1(6):e82.

Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation*. 2001;104(23):2855-64.

Zhao H, Shen J, Medico L, Platek M, Ambrosone CB. Length heteroplasmies in human mitochondrial DNA control regions and breast cancer risk. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2010;1(3):184-92.

Zuckerbraun BS, Shiva S, Ifedigbo E, Mathier MA, Mollen KP, Rao J, Bauer PM, Choi JJ, Curtis E, Choi AM, Gladwin MT. Nitrite potently inhibits hypoxic and inflammatory pulmonary arterial hypertension and smooth muscle proliferation via xanthine oxidoreductase-dependent nitric oxide generation. *Circulation*. 2010;121(1):98-109.

APÊNDICE

APÊNDICE

Artigos publicados:

- ✓ **APÊNDICE A:** Cardena MM, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. A new duplication in the mitochondrially encoded tRNA proline gene in a patient with dilated cardiomyopathy. Mitochondrial DNA. 2013;24(1):46-9.

- ✓ **APÊNDICE B:** Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals. PLoS One. 2013;8(4):e62005.

SHORT COMMUNICATION

A new duplication in the *mitochondrially encoded tRNA proline* gene in a patient with dilated cardiomyopathy

MARI MAKI SIRIA GODOY CARDENA¹, ALFREDO JOSÉ MANSUR², ALEXANDRE DA COSTA PEREIRA², & CINTIA FRIDMAN¹

¹Department of Legal Medicine, Ethics and Occupational Health, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, and ²Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Department of Cardiology, Medical School, Heart Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

(Received 24 May 2012; revised 27 July 2012; accepted 27 July 2012)

Abstract

Mitochondria provide an environment conducive to mutations in DNA molecules (mtDNA). Analyses of mtDNA have shown mutations potentially leading to many cardiovascular traits. Here, we describe a patient with dilated cardiomyopathy and new mtDNA duplication. The patient presented symptoms of heart failure New York Heart Association functional class III and was diagnosed with non-familial dilated cardiomyopathy with important left ventricular systolic dysfunction. Sequencing of mtDNA control region was done, and a 15 bp duplication was observed between nucleotides 16,018 and 16,032. Part of this duplication is localized within the tRNA proline gene (*tRNA^{Pro}*) that has an important role in cell protection against oxidative stress and is considered an important regulatory factor for cellular reactive oxygen species balance. This duplication could alter the stability or secondary structure of *tRNA^{Pro}*, affecting mt-protein synthesis. In turn, the presence of duplication in *tRNA^{Pro}* could cause some oxidative stress imbalance and, so, mitochondrial dysfunction could result in the pathogenicity.

Keywords: Dilated cardiomyopathy, genetic duplication, heart failure, mitochondrial DNA, *tRNA^{Pro}* gene

Introduction

The mitochondria are the major generator of reactive oxygen species (ROS) and free radical oxidative phosphorylation (OXPHOS). Mitochondrial DNA (mtDNA) lacks the histone proteins that play a protective role in nuclear DNA. Furthermore, the mtDNA polymerase has low fidelity than nuclear DNA polymerase. Therefore, the loss of mtDNA repair mechanism causes an environment conducive to mutations in this molecule (Lee and Johnson 2006).

Over the years, different types of mutations such as deletions, duplications, insertions, point mutations, and large-scale rearrangements in mtDNA coding region have been associated with some human diseases, such as cancer, Alzheimer, Parkinson, and some cardiovascular diseases

(Ballinger 2005; Brandon et al. 2006; Elango et al. 2011; Coskun et al. 2012).

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in many countries, but especially heart failure (HF) is the leading cause of death in developed countries (Albanesi 2005). Several mechanisms have been involved in the genesis of HF such as neurohormonal, hemodynamic, and genetic factors. It is known that several autosomal *loci* are associated with HF from different etiologies, especially for dilated cardiomyopathy (Lindenfeld et al. 2010).

Genetic analysis of mtDNA has shown mutations in different populations related to cardiomyopathies (Wei et al. 2009), hypertension (Zhu et al. 2009), myocardial infarction (Takagi et al. 2004), and coronary artery disease (Kofler et al. 2009), and all

Correspondence: C. Fridman, Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho – FMUSP, Rua Teodoro Sampaio, 115, CEP: 05405-000, São Paulo, SP, Brazil. Tel: + 55 11 3061 8408. Fax: + 55 11 3061 8408. E-mail: cfridman@usp.br

these diseases predispose to the onset of HF. Furthermore, some studies have suggested the relationship between oxidative stress, resulting from dysfunction of mtDNA, and HF (Tsutsui 2006; Blum 2009).

Herein, we describe a new mtDNA rearrangement in a patient with dilated cardiomyopathy.

Case presentation

The patient, a male Black individual, presented to our service with signs and symptoms of HF, NYHA functional class III when he was 54 years old. Symptoms had started 5 months anteceding his enrollment in our service. No previous history of HF symptoms was described. The patient had never searched for medical care before. After a diagnosis work-up he was diagnosed as a patient with dilated cardiomyopathy with important left ventricular systolic dysfunction. No involvement of other systems was noted. No facial dysmorphic features were noted, and no muscular, hearing, or metabolic phenotypes were described during the entire follow-up period at our institution. He died due to cardiogenic shock after 7 years of follow-up in our service, so no other test could be done, since the only tissue collected was blood. Since the contact with family was lost, we have no chance to do further analyses with them either.

Materials and methods

The patient's DNA extracted from peripheral blood was amplified for mitochondrial control subregions HV1, HV2, and HV3 by a simple Polymerase Chain Reaction using primers L15879 (5'-AATGGGCCT-GTCCTTGTAGT-3') and H727 (5'-AGGGTGAA-CTCACTGGAACG-3'). The PCR was conducted in

50 ng genomic DNA, 2.5 pmol of each primer, 1.25 mM deoxyribonucleotide triphosphates, 2 units of Taq polymerase. Thermocycling was done in a thermocycler Mastercycler Eppendorf, with conditions of initial denaturation at 95°C for 1 min, followed by 36 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. The final extension was done at 72°C for 7 min.

The PCR product was purified using Exonuclease I/ Shrimp Alkaline Phosphatase, and was sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's protocol. Capillary electrophoresis was done using the ABI3130 sequencer (Applied Biosystems) and the resulted sequence was analyzed using specific software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). The sequence obtained was compared with the revised Cambridge reference sequence (rCRS) (Andrews et al. 1999).

Results and discussion

The control region of mtDNA is composed of subregions HV1, HV2, and HV3, which are known to be very polymorphic and due to it this region has been used routinely for cases of human identification, forensic evaluations, and anthropological studies (Budowle et al. 2003).

The sequencing of mtDNA control region of the patient with HF has allowed their classification in the African haplogroup L1c2. Analysis of HV1 region revealed a duplication of 15 bp between nucleotides 16,018 and 16,032 (Figure 1), not previously reported. This duplication includes the last nucleotides of the gene for tRNA proline, *TRNP*, or tRNA^{Pro}

Figure 1. (A) Electropherogram of an individual showing normal sequence between positions 16,018 and 16,032 (black key). (B) Sequence of the dilated cardiomyopathy patient containing the 15 bp duplication between positions 16,018 and 16,032 (gray key).

Figure 2. (A) Normal sequence of mt-tRNA^{Pro} gene mapped between 15,955 and 16,023 (in gray). (B) The sequence containing the duplication 15 bp. The normal sequence between 16,018 and 16,032 is marked in gray and the duplication is marked in gray underlined.

(official name: *mitochondrially encoded tRNA proline*; official symbol: MT-TP) which is located in the segment between nucleotides 15,955 and 16,023 (Figure 2) (Brulé et al. 1998). Because of this, one can infer that this duplication results in a variation or some kind of error in the tRNA^{Pro} product.

The gene for tRNA^{Pro} is one of the less polymorphic mt-tRNA genes, with only six point mutations (positions 15,965; 15,967; 15,795; 15,990; 15,995, and 16,002) reported as pathogenic until now, in the following diseases: Parkinson disease, myoclonic epilepsy and ragged red muscle fibers, ataxia, retinitis pigmentosa, deafness, mitochondrial myopathy, and mitochondrial cytopathy, respectively (Moraes et al. 1993; Ionasescu et al. 1994; Brulé et al. 1998; Grasbon-Frodl et al. 1999; Seneca et al. 2000; Wong et al. 2002; Blakely et al. 2009; Da Pozzo et al. 2009).

Few duplications in the control region have been described in the last decades. The most common is a 260 bp duplication between nucleotides 308 and 567 which was already reported in patients with mitochondrial myopathy with additional mtDNA deletions (Brockington et al. 1993) as well as in normal individuals belonging to European haplogroup I (Torroni et al. 1994) and in patients with different types of cancer such as gastric, breast, hepatocellular, colon, and lung (Hung et al. 2008). Additionally, Tengan et al. (2002) showed that four types of duplications between nucleotides 314 and 465 (151 bp), 301 and 498 (197 bp), 311 and 573 (262 bp), and 315 and 965 (650 bp) were already observed in normal individuals.

Although in these studies there was no association between the duplications and diseases, the authors suggested that duplication may be pathogenic *per se*, if present at high levels in specific tissues. The explanation would be the combination of damage caused by free radicals and mispairing that could generate duplications in mtDNA control region. Furthermore, it was proposed that the accumulation

of these duplications in mtDNA may be indicative of the presence of other defects in the molecule, which could be harmful for the respiratory chain function (Brockington et al. 1993). Damage in the respiratory chain can result in the accumulation of electrons and increased generation of ROS (Blum 2009).

The tRNAs play an essential role in the synthesis of proteins involved in energy metabolism. However, mutations in tRNAs can have negative effects on their classical function, especially on aminoacylation properties or might interfere with correct tRNA processing, resulting in the inhibition of mt-protein synthesis and consequent defects in the mitochondrial OXPHOS, being the main source of ROS (Wittenhagen and Kelley 2003; Da Pozzo et al. 2009).

Krishnan et al. (2008) attributed an antioxidant feature to amino acid proline, which can protect human cells against oxidative stress; therefore, proline might be an important regulator of cellular ROS balance.

One of the most important risk factors for cardiovascular disease is increased oxidative stress caused by changes in the function of mitochondria, resulting in damage to mtDNA. Studies have suggested that the formation of ROS, resulting in oxidative stress, can cause the onset occurring or worsening of HF (Blum 2009).

Conclusion

Although our patient presented a typical clinical picture of HF due to dilated cardiomyopathy, it is still unclear whether the observed duplication could have resulted in pathogenicity. Nonetheless, this mutation could change the stability or secondary structure of tRNA^{Pro}, or both. Consequently, it could have affected mt-protein synthesis and, in turn, the presence of duplication in the tRNA^{Pro} could cause some imbalance in oxidative stress and, so, mitochondrial dysfunction could result in the pathogenicity.

Unfortunately, with patient's death, we have no chance to do additional functional assays.

Declaration of interest: This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 2010/05317-4) and HC-LIM/FMUSP. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Albanesi FFM. 2005. What is the current scenario for heart failure in Brazil? *Arq Bras Cardiol* 85:155–156.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23:147.
- Ballinger SW. 2005. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 38(10):1278–1295.
- Blakely EL, Trip SA, Swallow H, He L, Wren DR, Rich P, Turnbull DM, Omer SE, Taylor RW. 2009. A new mitochondrial transfer RNAPro gene mutation associated with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers and other neurological features. *Arch Neurol* 66(3):399–402.
- Blum A. 2009. Heart failure—new insights. *IMAJ* 11:105–111.
- Brandon M, Baldi P, Wallace DC. 2006. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25:4647–4662.
- Brockington M, Sweeney MG, Hammans SR, Morgan-Hughes JA, Harding AE. 1993. A tandem duplication in the D-loop of human mitochondrial DNA is associated with deletions in mitochondrial myopathies. *Nat Genet* 4:67–71.
- Brulé H, Holmes WM, Keith G, Giegé R, Florentz C. 1998. Effect of a mutation in the anticodon of human mitochondrial tRNAPro on its post-transcriptional modification pattern. *Nucleic Acids Res* 26(2):537–543.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. 2003. Forensics and mitochondrial DNA: Applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:119–141.
- Coskun P, Wyrembak J, Schriner S, Chen HW, Marciniak C, Laferla F, Wallace DC. 2012. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta* 1820(5):553–564.
- Da Pozzo P, Cardaioli E, Malfatti E, Gallus GN, Malandrini A, Gaudiano C, Berti G, Invernizzi F, Zeviani M, Federico A. 2009. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Pro) gene associated with late-onset ataxia, retinitis pigmentosa, deafness, leukoencephalopathy and complex I deficiency. *Eur J Hum Genet* 17(8):1092–1096.
- Elango S, Govindaraj P, Vishwanadha VP, Reddy AG, Tamang R, Muthusami U, Kunnoth S, Koyilil VK, Lakshman M, Shanmugasundharam N, Singh L, Thangaraj K. 2011. Analysis of mitochondrial genome revealed a rare 50 bp deletion and substitutions in a family with hypertension. *Mitochondrion* 11(6):878–885.
- Grasbon-Frodl EM, Kösel S, Sprinzl M, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB. 1999. Two novel point mutations of mitochondrial tRNA genes in histologically confirmed Parkinson disease. *Neurogenetics* 2(2):121–127.
- Hung WY, Lin JC, Lee LM, Wu CW, Tseng LM, Yin PH, Chi CW, Lee HC. 2008. Tandem duplication/triplication correlated with poly-cytosine stretch variation in human mitochondrial DNA D-loop region. *Mutagenesis* 23(2):137–142.
- Ionasescu VV, Hart M, DiMauro S, Moraes CT. 1994. Clinical and morphologic features of a myopathy associated with a point mutation in the mitochondrial tRNAPro gene. *Neurology* 44(5):975–977.
- Kofler B, Mueller EE, Eder W, Stanger O, Maier R, Weger M, Haas A, Winker R, Schmut O, Paulweber B, Iglseder B, Renner W, Wiesbauer M, Aigner I, Santic D, Zimmermann FA, Mayr JA, Sperl W. 2009. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: A case control study. *BMC Med Genet* 10(35):1–7.
- Krishnan N, Dickman MB, Becker DF. 2008. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 44(4):671–681.
- Lee HR, Johnson K. 2006. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 281(47):36236–36240.
- Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, Collins SP, Ezekowitz JA, Givertz MM, Katz SD, Klapholz M, Moser DK, Rogers JG, Starling RC, Stevenson WG, Tang WH, Teerlink JR, Walsh MN. 2010. Executive summary: HFSA 2010 comprehensive heart failure practice guideline. *J Card Fail* 16:475–539.
- Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Ionasescu V, Schon EA, DiMauro S. 1993. A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat Genet* 4(3):284–288.
- Seneca S, Ceuterik-De Groote C, Van Coster R, De Meirleir L. 2000. A novel mitochondrial transfer RNA proline mutation. *J Inher Metab Dis* 23(8):853–854.
- Takagi K, Yamada Y, Gong JS, Sone T, Yokota M, Tanaka M. 2004. Association of a 5178C → A (Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals. *Hum Genet Atheroscler* 175:281–286.
- Tengan CH, Ferreira-Barros C, Cardeal M, Fireman MA, Oliveira AS, Kiyomoto BH, Gabbai AA. 2002. Frequency of duplications in the D-loop in patients with mitochondrial DNA deletions. *Biochim Biophys Acta* 1588(1):65–70.
- Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Laverne L, Wallace DC. 1994. Mitochondria DNA and the origin of Caucasians. Identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet* 55:760–776.
- Tsutsui H. 2006. Mitochondrial oxidative stress and heart failure. *Intern Med* 45(13):809–813.
- Wei YL, Yu CA, Yang P, Li AL, Wen JY, Zhao SM, Liu HX, Ke YN, Campbell W, Zhang YG, Li XH, Liao WQ. 2009. Novel mitochondrial DNA mutations associated with Chinese familial hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(9):933–939.
- Wittenhagen LM, Kelley SO. 2003. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem Sci* 28(11):605–611.
- Wong LJ, Liang MH, Kwon H, Bai RK, Alper O, Gropman A. 2002. A cystic fibrosis patient with two novel mutations in mitochondrial DNA: Mild disease led to delayed diagnosis of both disorders. *Am J Med Genet* 113(1):59–64.
- Zhu HY, Wang SW, Martin LJ, Liu L, Li YH, Chen R, Wang L, Zhang ML, Benson DW. 2009. The role of mitochondrial genome in essential hypertension in a Chinese Han population. *Eur J Hum Genet* 17(11):1501–1506.

Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals

Mari M.S.G. Cardena¹, Ândrea Ribeiro-dos-Santos², Sidney Santos², Alfredo J. Mansur³, Alexandre C. Pereira³, Cintia Fridman^{1*}

1 Department of Legal Medicine, Ethics and Occupational Health, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Laboratory of Human Genetics and Medicine, Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil, **3** Department of Cardiology, Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

In populations that have a high degree of admixture, such as in Brazil, the sole use of ethnicity self-declaration information is not a good method for classifying individuals regarding their ethnicity. Here, we evaluate the relationship of self-declared ethnicities with genomic ancestry and mitochondrial haplogroups in 492 individuals from southeastern Brazil. Mitochondrial haplogroups were obtained by analyzing the hypervariable regions of the mitochondrial DNA (mtDNA), and the genomic ancestry was obtained using 48 autosomal insertion-deletion ancestry informative markers (AIM). Of the 492 individuals, 74.6% self-declared as White, 13.8% as Brown and 10.4% as Black. Classification of the mtDNA haplogroups showed that 46.3% had African mtDNA, and the genomic ancestry analysis showed that the main contribution was European (57.4%). When we looked at the distribution of mtDNA and genomic ancestry according to the self-declared ethnicities from 367 individuals who self-declared as White, 37.6% showed African mtDNA, and they had a high contribution of European genomic ancestry (63.3%) but also a significant contribution of African ancestry (22.2%). Of the 68 individuals who self-declared as Brown, 25% showed Amerindian mtDNA and similar contribution of European and African genomic ancestries. Of the 51 subjects who self-declared as black, 80.4% had African mtDNA, and the main contribution of genomic ancestry was African (55.6%), but they also had a significant proportion of European ancestry (32.1%). The Brazilian population had a uniform degree of Amerindian genomic ancestry, and it was only with the use of genetic markers (autosomal or mitochondrial) that we were able to capture Amerindian ancestry information. Additionally, it was possible to observe a high degree of heterogeneity in the ancestry for both types of genetic markers, which shows the high genetic admixture that is present in the Brazilian population. We suggest that in epidemiological studies, the use of these methods could provide complementary information.

Citation: Cardena MMSG, Ribeiro-dos-Santos Â, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, et al. (2013) Assessment of the Relationship between Self-Declared Ethnicity, Mitochondrial Haplogroups and Genomic Ancestry in Brazilian Individuals. PLoS ONE 8(4): e62005. doi:10.1371/journal.pone.0062005

Editor: David C. Samuels, Vanderbilt University Medical Center, United States of America

Received: December 7, 2012; **Accepted:** March 15, 2013; **Published:** April 24, 2013

Copyright: © 2013 Cardena et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-2010/05317-4) and HC-LIM/FMUSP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cfridman@usp.br

Introduction

In the past few years, various applications of ethnicity information, such as in forensic science, epidemiological studies, and clinical and pharmacological trials, have been proposed in the literature. However, in highly admixed populations, such as in Brazil, this personal information cannot provide the same robust estimations as in less diverse populations [1–3].

The Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world and is the result of five centuries of crossings between inter-ethnic individuals from three continents, European settlers, African slaves and Brazilian native Amerindians [4], which results in the incorporation of various social cultures in Brazil. Consequently, the genotypic and phenotypic characteristics of these populations have been added to the native population [5,6]. This high rate of admixture makes physical appearance characteristics such as skin and eye color, hair, and the shape of the lips

and nose poor indicators of the geographical origin of a Brazilian individual's ancestors [7].

Ancestry Informative Markers (AIMs) are autosomal markers that have been used to estimate the genomic ancestry of a population or individual because they show differences in allele frequencies between distinct populations [8–10]. These markers have a substantial advantage with respect to physical features because they are constant throughout life [7,11].

Mitochondrial DNA (mtDNA) has also proved to be a good marker for inferring maternal ethnicity. Several studies have indicated the feasibility of inferring the probable geographic origin of an individual from the sequence of hypervariable regions (HV) of the mitochondrial genome. These studies clearly demonstrate that the mitochondrial sequence alone does not determine one's ethnicity because it relates exclusively to maternal inheritance [2,12,13].

Therefore, to understand the relationship between the population sub-structure and the genetic makeup, autosomal markers are

Table 1. Characterization of the 492 Brazilian individuals.

Variables	Results
Age (years), n(mean $\pm$ SD)	492 (58 $\pm$ 14.4)
Gender, n (%)	
Male	297 (60.4)
Female	195 (39.6)
Self-Reported Ethnicities, n (%)	
White	367 (74.6)
Brown	68 (13.8)
Black	51 (10.4)
Yellow	5 (1.0)
Indigenous	1 (0.2)

doi:10.1371/journal.pone.0062005.t001

routinely used to estimate individual ancestry, whereas markers in the mtDNA and Y chromosome are used to scale inferences about human evolutionary history. The analysis of both types of information, AIMs and mtDNA, could be strongly associated and, thereby, used to infer more accurately the ethnic origin of an individual [2,12,13].

The aim of this study was to evaluate the relationship between self-declared ethnicity, genomic ancestry and mitochondrial haplogroups (mtDNA) in 492 individuals from southeastern Brazil.

Materials and Methods

Population Samples

We studied 492 individuals who had volunteered as part of a healthcare program developed by the Heart Institute of the Medical School, University of São Paulo, located in the Southeast of Brazil (São Paulo, SP-Brazil). The volunteers answered a questionnaire that included a multiple-choice question on self-declared ethnicity, which was based on the method used by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) national census survey, which classifies individuals as “Branços” (i.e., White), “Pardos” (i.e., Brown), “Pretos” (i.e., Black), “Amarelos” (i.e., Yellow) and “Indígenas” (i.e., Indigenous).

All of the individuals signed an informed consent form, and the Ethics Committee of the Clinical Hospital from the Medical School, University of São Paulo, approved the research protocol. The individuals were included in the study from August 2002 to March 2004.

Mitochondrial DNA Analysis

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes following standard salting out techniques [14].

The samples were analyzed for the hypervariable regions HV1, HV2 and HV3 to obtain the mtDNA composition of the haplotypes (sequences) and their mtDNA classification.

The DNA samples were amplified by a single PCR reaction, using primers designed with the Primer3 program (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). The primers used were L15879 (5'-AATGGGCTGTCTTGTAGT-3') and H727 (5'-AGGGTGAACCTCACTGGAACG-3'). The amplified segment refers to the nucleotide sequence 15879–727, which contains 1417 base pairs (bp) comprising the three regions of interest (HV1, HV2 and HV3).

The PCR reactions were performed in a total volume of 10 μ l that contained 50 ng of genomic DNA, 2.5 pMol of each primer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 1.25 mM dNTP (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and 0.75 units of Platinum Taq polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Thermocycling was performed in a thermocycler Eppendorf Mastercycler under conditions of initial denaturation at 95°C for 1 minute followed by 36 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute and annealing at 60°C for 1 minute and extension 72°C for 1 minute. The final extension was at 72°C for 7 minutes.

The PCR products were purified using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (EXO/SAP, Thermo Scientific Fermentas), according to the manufacturer's recommendations, and were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to manufacturer's protocol. All of the samples were sequenced in both directions, forward and reverse, using the same PCR primers, L15879 and H727, respectively. For the samples that showed length heteroplasmy in the HV1 or HV2 regions, additional primers L16548 (5'-GGGAACGTGTGGGCTATTTA-3') and H16413 (5'-TGAAATCAATATCCCGCACA-3') were used in a new sequencing reaction to analyze all of the sequence. Capillary electrophoresis was performed in an automated sequencer ABI3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the results were analyzed using specific software called BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Individual sequences were compared with the Cambridge Reference sequence (rCRS) [15,16] using the ClustalW alignment program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and the program HaploSite (<http://www.haploSite.com/haploSearch/>) for final definition of the haplotypes. The differences found in each sequence regarding the rCRS were typed following the nomen-

Table 2. Distribution of mtDNA classification and genomic ancestry according to the self-declared ethnicities.

Variables		Total (n = 492)	Self-Reported Ethnicities				
			White (n = 367)	Brown (n = 68)	Black (n = 51)	Yellow (n = 5)	Indigenous (n = 1)
mt-DNA, n (%)	African	228 (46.3)	138 (37.6)	47 (69.1)	41 (80.4)	1 (20.0)	1 (100)
	Amerindian	141 (28.7)	116 (31.6)	17 (25.0)	6 (11.8)	2 (40.0)	-
	European	123 (25.0)	113 (30.8)	4 (5.9)	4 (7.8)	2 (40.0)	-
Genomic Ancestry, mean $\pm$ SD	African	0.283 $\pm$ 0.217	0.220 $\pm$ 0.169	0.410 $\pm$ 0.212	0.556 $\pm$ 0.236	0.204 $\pm$ 0.154	0.562
	European	0.574 $\pm$ 0.221	0.633 $\pm$ 0.190	0.454 $\pm$ 0.205	0.321 $\pm$ 0.211	0.557 $\pm$ 0.193	0.404
	Amerindian	0.143 $\pm$ 0.101	0.147 $\pm$ 0.101	0.136 $\pm$ 0.106	0.113 $\pm$ 0.077	0.239 $\pm$ 0.159	0.034

doi:10.1371/journal.pone.0062005.t002

clature recommendations [17–21]. Classification of mtDNA was performed using specific programs, mtDNAmanager (http://mtmanager.yonsei.ac.kr/search_sample.php) and Phylotree (<http://www.phylotree.org/tree/main.htm>) [22].

Ancestry Informative Marker Analysis

The evaluation of genomic ancestry was conducted using forty-eight biallelic ancestry informative markers (AIMs), type insertion-deletion (INDELs), from autosomal chromosomes, which were pre-selected based on three main criteria: (1) large differences in the allelic frequencies ($\delta \geq 40\%$) between African, European and Native American populations, (2) mapping on different chromosomes or in different regions of the same physical chromosome, and (3) variable size between 3 and 40 bp to allow simultaneous genotyping of multiple markers. The selection process was based on data from Weber et al. [23] and the online database from the Marshfield Clinic (<http://www.marshfieldclinic.org/mgs/?page=didp>).

For this study, we selected 16 markers of African ancestry, 16 markers of European ancestry and 16 Native American ancestry-informative markers, presenting high values of δ between Africans versus Europeans or Native Americans. They were previously used by Santos et al. [24] and have been successfully used to assess the parental genetic contribution in different populations [25–27]. All of the DNA markers used were ascertained to be sensitive for indicating bio-geographic ancestry on the level of the three continental regions (Africa, Europe and Native American) that are expected to have contributed to the current Brazilian population.

The DNA samples were genotyped for 48 INDELs using three amplifications of type 16-plex PCR. All of the multiplex PCR was performed in a final volume of 12.5 μ L that contained 10 ng of DNA, 10 μ Mol forward and reverse primers and 60 μ L of Taq PCR Master Mix (Qiagen). The conditions for thermocycling PCR were 11 min at 95°C followed by 1 min at 94°C; 1 min at 60°C and 2 min at 70°C for 10 cycles; followed by 1 min at 90°C, 1 min at 60°C and 2 min at 70°C for 17 cycles; and a final extension of 60 min at 60°C.

Before capillary electrophoresis, 1 μ L of the PCR product was added to a mix that contained 8.7 μ L of deionized formamide HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 0.3 μ L GeneScan 500 LIZ size standard (Applied Biosystems). DNA fragments were separated using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and the results were analyzed with GeneMapper IDv3.2 software (Applied Biosystems).

Estimation of the parental ancestry of the Brazilian samples was performed using the software STRUCTURE v.2.2 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>) considering three parental populations (Native American, European, and African) from our database, which was evaluated by Santos et al. [24] and Francez et al. [26].

Results

Our sample was composed of 297 (60.4%) men and 195 (39.6%) women. The mean age of the individuals was 58 years (standard deviation (SD) ± 14.4) (minimum 18; maximum 93; median 59). From a total of 492 individuals evaluated in this study, 74.6% self-declared as white, 13.8% as Brown and 10.4% as Black (Table 1).

Of the 492 individuals, 46.3% ($n = 228$) showed African mtDNA; the remainder were almost evenly distributed between Amerindian and European mtDNA, 28.7% ($n = 141$) and 25% ($n = 123$), respectively. From the analysis of 48 INDELs, the major contribution in our sample was of European genomic ancestry,

with an average of 57.4% ($\pm 22.1\%$), followed by the contribution of African genomic ancestry at 28.3% ($\pm 21.7\%$) (Table 2).

When determining the distribution of mtDNA haplogroups according to self-declared ethnicities, it is interesting to note that of 367 individuals who self-declared as white, most of them, 37.6% ($n = 138$), showed African mtDNA, with the remaining individuals being distributed equally between Amerindian and European mtDNA, 31.6% ($n = 116$) and 30.8% ($n = 113$), respectively. Of the individuals who self-declared as black and brown, 80.4% ($n = 41$) and 69.1% ($n = 47$), respectively, had African mtDNA. Interestingly, 25% ($n = 17$) of the individuals who self-declared as brown showed Amerindian mtDNA. The individuals who self-declared as yellow had Amerindian and European mtDNA, with 40% ($n = 2$) and 40% ($n = 2$), respectively. The individual who self-declared as indigenous had African mtDNA (Table 2).

The genomic ancestry results showed that individuals who self-declared as White had a higher contribution of European ancestry ($63.3\% \pm 19\%$), but we must emphasize that these individuals also had a significant contribution from African genomic ancestry ($22.2\% \pm 16.9\%$). Individuals who self-declared as brown showed similar average contribution of European ($45.4\% \pm 20.5\%$) and African ($41\% \pm 21.2\%$) genomic ancestries. Of those who self-declared as black, the main genomic contribution was from African genomic ancestry ($55.6\% \pm 23.6\%$), but these individuals also had a significant proportion of European genomic ancestry ($32.1\% \pm 21.1\%$). For those who self-declared as yellow, the main contribution was from European genomic ancestry ($55.7\% \pm 19.3\%$), and for the individual who self-declared as indigenous, the main contribution was from African genomic ancestry (56.2%) followed by European genomic ancestry (40.4%) (Table 2).

When analyzing the three pieces of information together (self-declared ethnicities, mtDNA and genomic ancestry), it was possible to observe that the contribution of European genomic ancestry was higher in European mtDNA for individuals who self-declared as white and was lowest in African mtDNA for individuals who self-declared as black (Figure 1). The major contribution of African genomic ancestry was more prevalent in African mtDNA, in black and brown subjects, and in Amerindian mtDNA in black individuals (Figure 1). Interestingly, the Amerindian contribution had the same distribution in all of the self-declared ethnicities and mtDNA (Figure 1). Nonetheless, the full spectrum of combinations was observed in our sample.

Individual results can be analyzed in Table S1.

Discussion and Conclusions

Of the 492 individuals who reported their ethnicity, 74.6% self-declared as white (Table 1), which suggests a social process of “whitening”. According to the Institute of Geography and Statistics (IBGE), Brazil’s population is composed of 48.2% individuals who self-declare as white, and in southeastern Brazil, this percentage is 56.7% [28]. Currently, the demographic censuses are the only source of nationwide information on the ethnic composition of the Brazilian population. However, there are doubts about the information that is generated by the self-definition of skin color, mainly because of two considerations. The first consideration arises from the large number of terms that Brazilians use to identify the variations in skin color between the two extremes (white and black). The second consideration refers to the influence of other variables on the ethnic classification, such as social position, the subjective perception of their color, education, sex, the age of respondents, and regional and cultural variations [29,30].

Figure 1. Distribution of each genomic ancestry in relation to mtDNA and the self-declared ethnicities.
doi:10.1371/journal.pone.0062005.g001

Moreover, even in Brazil, for some people there is still the concept that black individuals, i.e., people with dark skin, are related to many types of negative stereotypes, lower social class and social exclusion. In this context, the individuals who are brown or even black and who have lighter skin have a tendency to self-declare as white [31]. Government programs aimed at social inclusion use self-declared ethnicity as inclusion/exclusion criteria, making ethnic self-declaration an even more complex construct to be dissected.

Furthermore, a recent study by Leite et al. [32] demonstrated that even among biological brothers, there is disagreement in the declaration of ethnicity: in this study, one brother self-declared as white and another as brown. These findings demonstrate the existence of problems in the methodology that is used for acquiring information on ethnicity in the Brazilian population, which results

in major difficulties when using these data in epidemiological studies. Various genetics studies with different Brazilian sub-populations have demonstrated the discrepancy between the self-declared information and the individual's genetic background [6,32,33], including the present study.

Regarding mitochondrial analysis, our results showed that 46.3% ($n = 228$) of all of the individuals and 37.6% ($n = 138$) of the individuals who self-reported as white presented African mtDNA (Table 2). This result is quite similar to Alves-Silva et al. [4], which assessed 247 individuals who self-declared as white from five major geographic regions of Brazil. When evaluating only the 99 individuals from the southeast (especially from the state of Minas Gerais), they found 34% with African mtDNA, 33% with Amerindian mtDNA and 31% with European mtDNA [4].

Clearly, the self-definition of skin color is not completely related to matrilineal ancestry in the southeastern Brazilian population.

When comparing the mtDNA in each of the three ethnicities, we observed that there were disparities: in individuals who self-declared as white, 37.6% ($n = 138$) had African mtDNA, while 25% ($n = 17$) of the individuals who self-declared as brown had Amerindian mtDNA (Table 2). These data emphasize the fact that in a population where there is a high degree of admixture and where superficial physical traits can vary with age and environmental factors, using only the self-declaration of ethnicity is not a good method for ethnic classification [7,32,33].

Human ethnic identity is a difficult and complicated topic. Every human being is a complex mosaic of genetic material from multiple sources of ancestors. Despite this complexity, humans can be divided in a general way into different ethnic groups that typically reflect their geographic ancestry, by using uni-parental and/or bi-parental markers [2]. Because of this, some studies have suggested that mitochondrial DNA can be an excellent marker for inferring maternal ethnic affiliation. Although the mtDNA represents only a very small segment of the mosaic of the genetic ancestry of a human being, it also provides reliable information about the range of composition and the proportions of an individual's ancestral roots, and this information could be very useful in clinical and forensic investigations [2,13].

The genomic ancestry found in this study showed that the Brazilian population has a major contribution of European ancestry ($57.5\% \pm 22.2\%$) (Table 2). Although these data corroborate with previous studies in relation to the major contributions of genomic ancestry [3,34], it is possible to observe that there were differences between our data and these other studies because we found a slightly larger percentage of African genomic ancestry and a slightly lower percentage of European genomic ancestry in the black and brown individuals. Differences regarding the described mean ancestry of the studied individuals can be mainly due to the socio-economic bias that exists in the Brazilian population. The Pena et al. sample was obtained in a high socio-economic class (undergraduate and graduate students and civil servants), while our sample was from individuals with heart failure who were being followed in a public hospital. Interestingly, the Amerindian genomic ancestry component tends to be rather low in our study and in previous studies [3,32–34].

When analyzing the genomic ancestry contributions in each of the three ethnicities that have been reported, it is interesting to note that there is considerable admixture of the three ancestries in all of the ethnic groups (Table 2). Moreover, we could observe what was expected, namely, that individuals who reported being white had, on average, a greater European contribution than individuals who reported being brown, and the lowest European contribution was observed among those who reported to be black. The opposite is observed for the African contribution. These observations in our study were also observed in other studies on the Brazilian population [7,32,33].

An important point to highlight is that only with the use of genetic markers (autosomal or mitochondrial) were we able to capture the information about the Amerindian component of the Brazilian population, even with only one individual who was self-declared as indigenous. We observed a 14.2% ($\pm 10\%$) genomic contribution from Amerindian ancestry, and 28.7% ($n = 141$) of the subjects had Amerindian mtDNA when we looked at the sample as a whole (Table 2).

By combining the ancestry information of self-declared ethnicities, matrilineal and bi-parental markers, it is possible to observe a high degree of heterogeneity of the ancestry in both types of genetic markers (mtDNA and AIMs), which shows the genetic mix

in the Brazilian population; these results cannot be measured by using only self-declared ethnicity (Figure 1, Table S1). Again, the combined results show that, in Brazil, the self-defined ethnicity has relatively little relationship to the genetic ancestry of each individual, a fact that has been demonstrated and discussed by other studies on the Brazilian population [3,7,10,32–34].

Although these studies have demonstrated that there is no strong correlation between self-declared ethnicity and genetic ancestry, in the present study, we suggest that increased information content can be brought through the use of combined information from self-declared ethnicity with the different types of inheritance, uni-parental and bi-parental.

By using mtDNA, which provides a clear pattern of historical events that are not obscured by the factors of recombination [35], and by using information from AIMs, which can estimate individual and population interethnic admixtures [8], one can have an accurate reconstitution of the genetic ancestry of a certain population or individual. Nevertheless, self-declared ethnicity can bring different information to the researcher. This self-declared information is the result of visual traits such as skin color combined with socio-cultural aspects [36,37] and is determined by factors that might not be captured by genetic markers of admixture or geographical ancestry.

Thus, the results of this study emphasize that it is important to understand that genetic ancestry information provides more accurate estimates of the continental ancestry of an individual, while the self-reported ethnicity indirectly provides important information about his/her socio-economic and cultural background. Thus, it is tempting to suggest that the combined use of this information can provide new and complementary insights in the understanding of complex phenotype determination.

There are potential limitations to our study. First, we do not have information on Y-chromosome markers. Additionally, by using patrilineal information, one can anticipate that more information would be available, and most likely a different covariance structure between the described dimensions would arise. Second, we have not considered East Asian ancestry markers in our model. This specific ancestry is most likely biasing Native-American components. Nonetheless, we do not believe that the number of individuals of Asian descent in the studied sample significantly biases our results.

We demonstrated that the genetic ancestry varies significantly between different self-declarations of skin color as well as between the same ethnic groups. Moreover, the image of complex genetic ancestry detected in our study highlights the need for the use of combined information from self-reported ethnicity with sensitive markers of both uni-parental, as well as bi-parental ancestry, to obtain more precise conclusions about bio-geographical origin, which is relevant in epidemiological studies and in historical and forensic areas.

In conclusion, this study revealed that the genomes of most Brazilians are mixed, having mtDNA and genomic ancestry of different phylogeographical origins, and that these markers are also capable of providing new and valuable insight into the current structure of the Brazilian people. Regardless of their skin color, the majority of individuals from southeastern Brazil presented African matrilineages; they have a high degree of European genomic ancestry and a very uniform degree of Amerindian genomic ancestry. Because of the overall low correlation between ethnic, genetic and matrilineal information, we propose that, especially in admixed populations, the use of a three-dimensional construct can provide more predictive power when studying the association between ethnicity and complex human phenotypes.

Supporting Information

Table S1 Individual Results of Self-declared, AIMs analyses, Mitochondrial Haplogroups and Mitochondrial DNA Haplotypes.

(XLS)

Acknowledgments

We thank Dayse Oliveira Alencar for technical assistance during the ancestry marker analysis.

References

- Barnholtz-Sloan JS, Chakraborty R, Sellers TA, Schwartz AG (2005) Examining population stratification via individual ancestry estimates versus self-reported race. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1545–1551.
- Lee C, Mändoiu II, Nelson CE (2011) Inferring ethnicity from mitochondrial DNA sequence. *BMC Proc* 5: S11.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, et al. (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6: e17063.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, et al. (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67: 444–461.
- Ribeiro D (1995) O Povo Brasileiro: Formação e Sentido do Brasil. São Paulo: Companhia das Letras. 25–257 p.
- Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, et al. (2012) Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* 20: 111–116.
- Pena SDJ (2005) Razões para banir o conceito de etnia da medicina brasileira. *História, Ciência, Saúde – Manguinhos* 12: 321–346.
- Chakraborty R, Kamboh MI, Nwankwo M, Ferrell RE (1992) Caucasian genes in American blacks: new data. *Am J Hum Genet* 50: 145–155.
- Shriver MD, Smith MW, Jin L, Marcini A, Akey JM, et al. (1997) Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* 60: 957–964.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, et al. (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 177–182.
- Enoch MA, Shen PH, Xu K, Hodgkinson C, Goldman D (2006) Using ancestry-informative markers to define populations and detect population stratification. *J Psychopharmacol* 20: 19–26.
- Röhl A, Brinkmann B, Forster L, Forster P (2001) An annotated mtDNA database. *Int J Legal Med* 115: 29–39.
- Egeland T, Bøvelstad HM, Storvik GO, Salas A (2004) Inferring the most likely geographical origin of mtDNA sequence profiles. *Ann Hum Genet* 68: 461–471.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, et al. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23: 147.
- Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, et al. (2000) DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* 110: 79–85.
- Wilson MR, Allard MW, Monson K, Miller KW, Budowle B (2002) Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. *Forensic Sci Int* 129: 35–42.
- Salas A, Carracedo A, Macaulay V, Richards M, Bandelt HJ (2005) A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 891–899.
- Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Chung U, Shin KJ (2006) Mitochondrial DNA control region sequences in Koreans: identification of useful variable sites and phylogenetic analysis for mtDNA data quality control. *Int J Legal Med* 120: 5–14.
- Bandelt HJ, Parson W (2008) Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region: a reappraisal. *Int J Legal Med* 122: 11–21.
- van Owen M, Kayser M (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30: E386–394.
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, et al. (2002) Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 71: 854–862.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, et al. (2010) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 31: 184–190.
- Tarazona-Santos E, Castilho L, Amaral DR, Costa DC, Furlani NG, et al. (2011) Population genetics of GYPB and association study between GYPB*S/s polymorphism and susceptibility to *P. falciparum* infection in the Brazilian Amazon. *PLoS One* 6: e16123.
- Francez PA, Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos SE (2012) Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Forensic Sci Int Genet* 6: 132–135.
- Kimura L, Ribeiro-Rodrigues EM, De Mello Auricchio MT, Vicente JP, Batista Santos SE, et al. (2012) Genomic ancestry of rural African-derived populations from Southeastern Brazil. *Am J Hum Biol* doi: 10.1002/ajhb.22335.
- IBGE. Síntese de Indicadores Sociais. Uma Análise das Condições de Vida da População Brasileira. Available: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/indicadoresminimos/sinteseindicadores2010/SIS_2010.pdf. Accessed 2012 Nov 10.
- Telles EE (2002) Racial ambiguity among the Brazilian population. *Ethn Racial Stud* 25: 415–441.
- Bastos JL, Peres MA, Peres KG, Dumith SC, Gigante DP (2008) Diferenças socioeconômicas entre autotclassificação e heterotclassificação de cor/raça. *Rev. Saúde Pública* 42: 324–334.
- Guimarães ASA (1999) Racismo e anti-racismo no Brasil. São Paulo: 34. 18–130 p.
- Leite TK, Fonseca RM, de França NM, Parra EJ, Pereira RW (2011) Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One* 6: e27162.
- Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, et al. (2011) Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol* 21: 240–245.
- Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW (2010) Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* 22: 187–192.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT (1999) Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 30: 211–238.
- Bamshad M, Guthery SL (2007) Race, genetics and medicine: does the color of a leopard’s spots matter? *Curr Opin Pediatr* 19: 613–618.
- Sucheston LE, Bensen JT, Xu Z, Singh PK, Preus L, et al. (2012) Genetic ancestry, self-reported race and ethnicity in African Americans and European Americans in the PCaP cohort. *PLoS One* 7: e30950.

Data deposition

The sequence data reported in this paper has been deposited in the NCBI GenBank database under accession numbers: KC676330-KC676585 and KC688421-KC688674.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MMSGC ACP CF. Performed the experiments: MMSGC CF. Analyzed the data: MMSGC ARS SEBS AJM ACP CF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MMSGC ARS SEBS AJM ACP CF. Wrote the paper: MMSGC ACP CF.