



Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa - PRPGP
Programa de Pós Graduação "*Stricto Sensu*" em Ciências Genômicas e
Biotecnologia

**POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS RELACIONADOS A
DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA
LINFOIDE AGUDA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Autora: Marcela Aparecida Chiabai
Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília - DF
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCELA APARECIDA CHIABAI

**POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS RELACIONADOS A DROGAS
UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

C532p

Chiabai, Marcela Aparecida

Polimorfismos farmacogenéticos relacionados a drogas utilizadas no tratamento da leucemia linfóide aguda na população brasileira. / Thatiana Maia Tolentino. – 2010.

69f.; il. : 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2010.
Orientação: Rinaldo Wellerson Pereira

1. Leucemia Linfóide Aguda. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Drogas Biotecnologia. 4. População. I. Pereira, Rinaldo Wellerson, orient. II. Título.

CDU 575.17



Dissertação de autoria de Marcela Aparecida Chiabai, intitulada POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS RELACIONADOS A DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA, apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília em 14 de junho de 2010, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira
Orientador
(Universidade Católica de Brasília - UCB)

Prof. Dr. Robert Edward Pogue
(Universidade Católica de Brasília - UCB)

Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega
(Universidade de Brasília - UnB)

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, o Dr. Rinaldo Wellerson Pereira, por me incentivar sempre, pelos ensinamentos e por acreditar na minha formação acadêmica. Por ter me orientado, e as vezes desorientado, não só na vida acadêmica, tendo sido também um pai, pela amizade e pelas risadas nos momentos de descontração.

Aos meus pais, pelos ensinamentos e incentivo, por sempre me ajudarem e acreditarem em mim.

A minha irmã, Renata, que gosto muito, obrigada por tudo.

À minha família, que sempre torceu por mim.

Ao meu noivo, Wendell, que amo muito, obrigada pelos diversos momentos de alegria, por sempre ter me apoiado nas minhas escolhas, ter me dado conselhos e ter me ajudado sempre.

Ao Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega e Dr. Robert Edward Pogue, membros da banca avaliadora, agradeço pela avaliação e colaboração com esse projeto.

Aos colegas de bancada, Julia, Tailce, Tainá, Rômulo, Clarissa, pela ajuda com o trabalho e também pelas risadas.

Aos colegas de laboratório pelos momentos de aprendizado e descontração.

Ao Msc. Túlio Lins, pela ajuda com o trabalho.

Ao Dr. Robert E. Pogue, que sempre me ajudou e tirou dúvidas, me ajudando muito na formação acadêmica.

Aos técnicos do laboratório, que sem eles meu trabalho não seria possível.

Aos professores do programa de Ciências Genômicas e Biotecnologia, por todo o ensinamento e também risadas nos momentos de descontração.

Muito obrigada a todos!

We can do science
And with it, we can improve our lives

Carl Sagan

RESUMO

Referência: CHIABAI, Marcela Aparecida. Polimorfismos Farmacogenéticos Relacionados a Drogas Utilizadas no Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda na População Brasileira 75 páginas. Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

A variabilidade de resposta aos medicamentos ocorre tanto dentro de populações como entre populações. A análise de polimorfismos genéticos que possam explicar tal variação é estudada no contexto da farmacogenética. Neste trabalho, a proposição foi investigar em uma amostra da população brasileira a frequência de polimorfismos farmacogenéticos envolvidos na resposta a drogas utilizadas no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA), que é o tipo de câncer infantil mais comum. A amostra utilizada neste estudo foi composta por 200 indivíduos representando as cinco regiões geopolíticas do Brasil, com ancestralidade biogeográfica estimada com 28 AIMs. Foram genotipados 20 SNPs relacionados a drogas utilizadas no tratamento da LLA, principalmente o metotrexato. As amostras foram divididas em cinco grupos de acordo com as regiões geopolíticas brasileiras, e não foi encontrado valor de F_{st} significativo entre elas, indicando que do ponto de vista dos locos farmacogenéticos estudados nossa amostra representa uma população homogênea. Considerando a amostra total da população brasileira foi realizada a comparação com populações obtidas do projeto HapMap. A comparação entre as populações apontou que do ponto de vista dos locos farmacogenéticos estudados nossa população está mais próxima da europeia. A AMOVA loco a loco mostrou locos com F_{st} significativo entre populações pertencentes a uma mesma região geográfica, indicando que apesar de mais próximas elas se diferenciam em alguns locos e não podem ser agrupadas como uma só nem os dados sobre os locos extrapolados de uma para a outra. Não foi encontrada associação alta entre os polimorfismos e a ancestralidade nas amostras da população brasileira. Os resultados encontrados neste trabalho apontam para a necessidade de genotipar SNPs farmacogenéticos e não basear-se em atalhos para diferenças na resposta a drogas, como cor de pele e mesmo a ancestralidade genômica que são preditores pobres do genótipo que um indivíduo apresenta para os locos farmacogenéticos de interesse.

Em cinco dos treze genes estudados, mais de um SNP foi genotipado, permitindo a análise de desequilíbrio de ligação e a análise de tagSNP em cada um destes cinco genes. Para a população brasileira foi possível avaliar o DL nos cinco genes, dos quais dois apresentaram DL, mas não suficiente para que somente um SNP pudesse ser genotipado dentro do conceito de tagSNP. Para a população europeia três genes puderam ser avaliados e os três se apresentaram em DL. Nas populações Africanas foi possível avaliar o DL em três genes e nenhum deles apresentou DL. Estes resultados estão de acordo com o que sabemos sobre DL e a história das populações humanas recentes. Para a população africana, com história de recombinação mais antiga o DL é de maneira geral menor que o que encontrado para populações europeias. Já a população brasileira apresenta valores intermediários de DL. Os pacientes com LLA apresentaram maior ancestralidade ameríndia e africana do que a amostra da população brasileira, sendo essa diferença significativa. Porém quando analisados nove polimorfismos farmacogenéticos nesses pacientes não foi encontrada diferenciação com a população brasileira. Os locos não tem correlação com a ancestralidade nos pacientes assim como na população brasileira.

Palavras-chave: SNP, população brasileira, polimorfismos farmacogenéticos, HapMap

ABSTRACT

Human populations around the world show meaningful variability in the way they respond to pharmaceuticals. The variability in drug response is investigated in the discipline of pharmacogenetics. Here is presented Brazilian population data regarding 20 pharmacogenetic polymorphisms mapping to 13 genes involved in the response to drug treatment in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Acute lymphoblastic leukemia is the most common type of childhood cancer, accounting for 25% of all cancers appearing in children. Currently the cure rate exceeds 80%. This study aimed to establish a single-base genotyping system and evaluate the polymorphisms and population data prior to initiating pharmacogenetic investigation in ALL patients. The sample comprised two hundred Brazilians from five geopolitical regions that had previously been investigated with regard to genomic ancestry. The ancestry of these samples was previously characterized using 28 ancestry-informative SNPs. With this information it was possible to look for correlations between the pharmacogenetic SNPs and the biogeographical ancestries of the subjects. The data from 20 SNPs genotyped in the Brazilian sample were compared to data from 11 other populations retrieved from the HapMap database. One out of the 20 SNPs presented as monomorphic and all others were in Hardy-Weinberg equilibrium. AMOVA analysis showed that samples from the five geopolitical regions can be treated as one homogenous population based on the pharmacogenetic SNPs genotyped. AMOVA analysis comparing the Brazilian population with all other populations retrieved from HapMap pointed to a genetic proximity with the European population. In the Brazilian population samples a high correlation between the pharmacogenetic polymorphisms and ancestry was not found. The poor correlation between ancestry and pharmacogenetic SNP genotypes points to the impossibility of using ancestry as a proxy for predicting drug response. In this way, any study aiming to correlate genetic factors and drug response in the Brazilian population should be based on SNP genotypes. More than one SNP was genotyped for five out of the thirteen genes studied. In these cases linkage disequilibrium (LD) and tagSNP analyses were carried out. In the Brazilian population LD was analyzed in the five genes, and two presented LD, but not sufficiently for only one SNP to be genotyped as a tagSNP. For the European population, three genes were analyzed and all of them showed SNPs in LD. In one pair out of the three the concept of tagSNP can be applied. In the African HapMap samples, three genes were

analyzed for LD, but no population showed LD for any of the three genes. These results agree with what we know about LD and the history of recent human populations. In the African population, with the longest history of recombination, LD is generally less common than in European populations. The Brazilian population shows intermediate values of linkage disequilibrium. The children with LLA had higher Amerindian and African ancestry compared with the Brazilian population, and this difference is significant. For nine pharmacogenetic polymorphisms differences between the children with LLA and the general Brazilian Population were not found. There is no correlation between these loci and ancestry in the Brazilian population, and the polymorphic status cannot be inferred by ancestry.

Keywords: SNPs, Brazilian population, pharmacogenetics polymorphisms, HapMap

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Eletroferograma da amplificação dos alelos por SNaPshot para o sistema multiplex 1.	36
Figura 2: Eletroferograma da amplificação dos alelos por SNaPshot para o sistema multiplex 2.	36
Figura 3: Eletroferograma da amplificação dos alelos por SNaPshot para o sistema multiplex 3.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos locos selecionados e as drogas associadas aos mesmos (MTX=metotrexato, MP=mercaptopurina, GC= glucocorticóides).	29
Tabela 2: Descrição da sequencia, direção, tamanho e multiplex a que pertencem os iniciadores utilizados na genotipagem.	30
Tabela 3: Genótipos recuperados em cada população do HapMap e os genotipados na população brasileira.	35
Tabela 4: Frequências alélicas dos 20 locos farmacogenéticos na população brasileira (BRA) e populações do HapMap. n/a= genótipo não recuperado.	38
Tabela 5: Frequências genótípicas dos 20 locos farmacogenéticos na população brasileira (BRA) e populações do HapMap. n/a= genótipo não recuperado.	40
Tabela 6: Heterozigozidade observada e esperada na população brasileira para os 20 locos. Não foi encontrado valor de p significativo ($p=0,002$).	43
Tabela 7: Fst estimado na análise par a par das regiões brasileiras para os 20 SNPs farmacogenéticos.	44
Tabela 8: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par, considerando todos os locos disponíveis entre elas..	44
Tabela 9: Valores de Fst da população brasileira com as populações do HapMap. Os valores em negrito indicam valor de p significativo.	46
Tabela 10: Correlação entre os locos e a ancestralidade na população brasileira. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$	47
Tabela 11: Correlação entre os locos e a ancestralidade na população ASW. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$	48
Tabela 12: Correlação entre os locos e a ancestralidade na população MEX. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$	48
Tabela 13: Valores de D' e r^2 para os locos de mesmo gene na população brasileira e nas populações do HapMap.	49
Tabela 14: Frequências alélicas dos 21 AIMs nos pacientes com LLA e na população brasileira total e separada por região geopolítica.	50
Tabela 15: Heterozigozidade observada e esperada nos pacientes com LLA para os 21 marcadores de ancestralidade. Não foi encontrado valor de p significativo ($p=0,002$).	51

Tabela 16: Ancestralidade Europeia, Africana e Ameríndia nos pacientes com LLA e na população brasileira.	52
Tabela 17: Valores de Fst da comparação par a par entre os pacientes com LLA e a população brasileira total e dividida por regiões geopolíticas. Valores em negrito indicam $p < 0,05$	52
Tabela 18: Matriz do Fst e p entre a população brasileira e os pacientes com LLA comparadas par a par, considerando todos os locos disponíveis entre elas.	54
Tabela 19: Frequências alélicas de 9 locos farmacogenéticos nos pacientes com LLA e na população brasileira.	55
Tabela 20: Heterozigozidade observada e esperada nos pacientes com LLA para os 9 locos. Não foi encontrado valor de p significativo ($p < 0,05$).	55
Tabela 21: Valores de Fst e p entre as populações BRA e LLA para nove locos farmacogenéticos. Em negrito valores de Fst com valor de p significativo ($p < 0,05$).	56
Tabela 22: Correlação entre os locos e a ancestralidade nos pacientes com LLA. Valores em negrito apresentam $p < 0,01$	57

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1801133.	78
Apêndice 2: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1801131.	78
Apêndice 3: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1695.	78
Apêndice 4: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1051266.	79
Apêndice 5: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1138272. *= loco monomórfico para as populações	79
Apêndice 6: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs717620.	79
Apêndice 7: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs11545078.	80
Apêndice 8: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs2236225.	80
Apêndice 9: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1142345.	80
Apêndice 10: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1800584.	80
Apêndice 11: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1122608.	81
Apêndice 12: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs10821936.	81
Apêndice 13: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs7270101. *= loco monomórfico para as populações	81
Apêndice 14: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs17323225.	82
Apêndice 15: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs17011368. *= loco monomórfico para as populações	82
Apêndice 16: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs852977.	82

Apêndice 17: Matriz do F_{st} e p entre as populações comparadas par a par para o locus10264272.	83
Apêndice 18: Matriz do F_{st} e p entre as populações comparadas par a par para o locus4986913. *= loco monomórfico para as populações	83
Apêndice 19: Valores de F_{st} e p entre as populações das regiões geopolíticas brasileiras, CO e as outras populações.	83
Apêndice 20: Valores de F_{st} e p entre as populações das regiões geopolíticas brasileiras, N e as outras populações. *=loco monomórfico para as populações.	84
Apêndice 21: Valores de F_{st} e p entre as populações das regiões geopolíticas brasileiras.	84

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1. Leucemias	18
1.2. Leucemia Linfóide Aguda	18
1.3. Tratamento da LLA.....	19
1.4. Farmacogenética	20
1.5. Farmacogenética em Populações Miscigenadas	21
1.6. População Brasileira	22
1.7. Ancestralidade Biogeográfica	22
1.8. Farmacogenética da LLA.....	24
2. Justificativa	26
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4. Metodologia.....	28
4.1. Amostras Populacionais	28
4.1.1. Amostra da População Brasileira.....	28
4.1.2. Amostra dos pacientes com LLA e extração do DNA	28
4.2. Genotipagem dos polimorfismos farmacogenéticos	29
4.2.1. SNPs selecionados	29
4.2.2. Desenho dos Iniciadores	30
4.2.3. Genotipagem.....	32
4.3. Genotipagem dos Marcadores Informativos de Ancestralidade	33
4.3.1. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)	33
4.3.2. Genotipagem dos AIMs	33
4.4. Análise Estatística	34
5. Resultados.....	35
5.1. Variabilidade de Polimorfismos Farmacogenéticos em uma amostra da população brasileira.....	35
5.2. Ancestralidade e polimorfismos farmacogenéticos em crianças com LLA	50
5.2.1. Ancestralidade Biogeográfica.....	50
5.2.2. Polimorfismos Farmacogenéticos.....	55
6. Discussão	58

6.1. Variabilidade de Polimorfismos Farmacogenéticos em uma amostra da população brasileira.....	58
6.2. Ancestralidade e polimorfismos farmacogenéticos em crianças com LLA	65
7. Referências Bibliográficas.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEUCEMIAS

A leucemia é uma neoplasia proveniente da expansão clonal dos blastos que darão origem as células sanguíneas na medula óssea. As células-tronco hematopoiéticas diferenciam-se primeiramente em dois tipos celulares, a linhagem linfóide e a linhagem mieloide (Schoch e cols. 2001). Na leucemia, os progenitores mielóides ou linfóides são incapazes de se diferenciar em células maduras, se acumulando na medula e impedindo a formação das células sanguíneas normais. As leucemias representam 2,04% dos casos de neoplasia no Brasil (INCA, 2008), sendo separadas em formas crônica e aguda.

Na forma crônica ocorre a proliferação e acúmulo lento e gradativo dos clones neoplásicos na medula óssea e no sangue, que se apresentam em uma fase tardia da maturação. Já na forma aguda ocorrem vários eventos malignos nos blastos na fase inicial da maturação. Esses blastos são incapazes de se diferenciar devido a um bloqueio na maturação, havendo uma proliferação descontrolada (Harris e cols. 1999). A leucemia aguda é o tipo de câncer infantil mais comum e uma das principais causas de morte por doenças hematológicas em adultos. A leucemia linfóide aguda (LLA) ocorre mais em crianças e a leucemia mieloide aguda (LMA) é mais frequente em adultos (Mullighan 2009).

1.2. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

A leucemia linfóide aguda (LLA) ocorre a partir da expansão dos linfoblastos, em 80% dos casos a origem é a linhagem dos linfócitos B e em 20% a linhagem dos linfócitos T. A LLA é o tipo de câncer infantil mais comum, correspondendo a 75% dos casos de leucemia aguda e aproximadamente a 25% de cânceres infantis em geral. O pico de incidência ocorre entre 2 e 5 anos, com maior incidência em meninos e em crianças brancas (Cheok e cols. 2006; Onciu 2009; Pui e cols. 2004). A LLA apresenta uma maior incidência em portadores de outras afecções, como distúrbios genéticos (síndrome de Down) ou com síndromes de imunodeficiência, correspondendo a apenas 5% dos casos, sendo que na grande maioria dos casos não há uma explicação causal possível (Pui e cols. 2004). Atualmente sabe-se que por trás da maioria das neoplasias está a expressão de um ou mais oncogenes, que são responsáveis por alterações no controle do ciclo celular e apoptose levando a multiplicação desordenada das células (Drakaki e Iliopoulos 2009).

1.3. TRATAMENTO DA LLA

Ao longo das últimas décadas o prognóstico para LLA vem experimentado grande melhora em função da descoberta de agentes quimioterápicos, da divisão em grupos de risco e desenvolvimento de esquemas terapêuticos adequados para cada grupo e também de sensível melhora nos cuidados com o paciente. A taxa de sobrevida de crianças com LLA aumentou de 10% em 1960 para 75 a 80% nos dias atuais (Cheok e Evans 2006; Henze 2008; Onciu 2009; Pui e Evans 2006; Pui e cols. 2004).

Atualmente todos os pacientes com LLA são estratificados em grupos de baixo ou alto risco de recidiva. Esta estratificação pode variar de acordo com o protocolo adotado, sendo alguns dos critérios a linhagem da LLA (células B ou T), idade ao diagnóstico, contagem inicial dos leucócitos, imunofenótipo, citogenética, resposta precoce à indução, e presença de linfoblastos no SNC (Jeha e Pui 2009; Onciu 2009).

O tratamento consiste em quimioterapia antineoplásica e se divide em três fases. A primeira fase é a indução, buscando o retorno à hematopoiese normal. Para esta etapa, atualmente está bem estabelecido que a utilização de um esquema quimioterápico indutório contendo corticosteroide, vincristina, L-asparaginase, durante quatro semanas é capaz de levar mais de 95% dos pacientes à remissão (Pui e Evans 2006).

A segunda fase é a consolidação e busca manter a remissão e evitar infiltrações no SNC. Esta fase tem duração de 2 a 8 meses, sendo administrado metotrexato em altas doses por punção lombar. A terceira fase é a terapia de manutenção, com duração de pelo menos 2 anos para o devido controle da doença. Nesta fase, a utilização de metotrexato em baixas doses combinado com mercaptopurina constitui a base da maioria dos esquemas de manutenção (Jeha e Pui 2009; Pui e Evans 2006). O transplante com células hematopoiéticas pode ser feito em pacientes que não respondem bem ao tratamento quimioterápico, consistindo em um transplante de células extraídas da medula óssea, do sangue periférico ou do cordão umbilical de um doador compatível (Jeha e Pui 2009).

O metotrexato (MTX) é um dos principais medicamentos utilizados durante o tratamento da LLA, sendo utilizado durante a segunda e terceira fase do tratamento. O antifolato MTX consiste em um metabólito antineoplásico com propriedades imunossupressoras, sendo utilizado no tratamento da LLA e outras doenças como a artrite reumatoide (Kremer 2004; Tian e Cronstein 2007). Alguns mecanismos de ação do MTX têm sido propostos, como a inibição da síntese de purina e pirimidina, supressão de reações de transmetilação com acumulação de poliaminas, redução da proliferação do antígeno

dependente da célula-T, e promoção da liberação de adenosina com supressão da adenosina mediadora da inflamação (Tian e Cronstein 2007). Ele é uma das drogas mais estudadas, com vários polimorfismos em genes relacionados ao seu metabolismo que podem ser relevantes na resposta a droga (de Jonge e cols. 2009; Kremer 2006).

Apesar de a taxa de sobrevida ter aumentado nos últimos anos para 80%, 20% das crianças apresentam recidiva ou não respondem ao tratamento, e muitas das crianças sofrem efeitos adversos devido ao tratamento quimioterápico, incluindo toxicidade e complicações posteriores como tumores secundários (Jamroziak e Robak 2009). O tratamento convencional da LLA cura aproximadamente 30% das crianças que apresentam recidiva, sendo a distribuição dos pacientes em grupos de risco essencial para o tratamento (Hutchinson e cols. 2003; Lange e cols. 2002). Entende-se que os critérios de estratificação em grupos de risco para a seguinte utilização de um protocolo de tratamento adequado precisam ser melhorados para alcançar algo próximo a 100% de cura (Pui e cols. 2008).

1.4. FARMACOGENÉTICA

Diversos fatores influenciam na resposta aos medicamentos, como idade, sexo, alimentação, peso, e fatores genéticos. Polimorfismos genéticos em enzimas metabolizadoras, transportadores e receptores de drogas utilizadas no tratamento podem ter uma grande influência na eficiência e toxicidade do tratamento, contribuindo para a variação na resposta ao tratamento (Evans e Johnson 2001; Sadee e Dai 2005). O estudo dessas variações é chamado de farmacogenética. Os primeiros estudos farmacogenéticos foram realizados nos anos 50, surgindo como uma nova disciplina (Meyer 2004). Os efeitos de polimorfismos farmacogenéticos na resposta a drogas podem ser farmacocinéticos (afetando a concentração da droga) e farmacodinâmicos (afetando a ação da droga) (Gardiner e Begg 2006).

A variabilidade individual na resposta as drogas é um dos maiores problemas clínicos no tratamento de doenças. Estudos realizados em hospitais dos Estados Unidos mostram que reações adversas a drogas são responsáveis por aproximadamente 2,2 milhões de internações e 100 mil mortes por ano (Frueh e Gurwitz 2004). A farmacogenética tem potencial para prever a melhor dose da droga ao paciente baseada nos polimorfismos farmacogenéticos, podendo ser utilizada clinicamente no que é chamada medicina personalizada. Um exemplo dessa utilização são polimorfismos no gene TPMT (tiopurina metil-transferase) que podem resultar em degradação alterada da 6-mercaptopurina (6-MP, um agente quimioterápico) e

pode ser fatal. A genotipagem de mutações no TPMT pode evitar sérios efeitos adversos causados pela toxicidade da 6-MP (Relling e cols. 1999).

1.5. FARMACOGENÉTICA EM POPULAÇÕES MISCIGENADAS

Entre populações de diferentes regiões geográficas, e até entre populações de uma mesma região, existem variações entre locos, e isso incluiu os locos farmacogenéticos. Com base nisso alguns medicamentos em que já se tem dados de polimorfismos farmacogenéticos associados a resposta do mesmo, tem algumas indicações para determinadas populações. Um exemplo disso é a Warfarina, um anticoagulante oral de ampla utilização na medicina atual. É recomendado utilizar uma menor dose em asiáticos e em pacientes com as variantes sensíveis para os genes *VKORC1* e *CYP2C9* (Klein e cols. 2009). O conhecimento dessas variações entre populações relacionadas a resposta a drogas podem ser utilizadas no estabelecimento de políticas de saúde pública.

Essas variações entre populações podem refletir a seleção do ambiente que as mesmas sofreram no passado (Jobling 2004). Na história do homem moderno ocorreram fatos importantes, como a migração e saída da África, e a ocupação de novos ambientes teve consequências adaptativas climáticas, como a coloração da pele, e mudanças nos hábitos alimentares (Balaresque e cols. 2007). Essa seleção do ambiente sofrida pelas populações no passado tem papel importante nas variações entre as diferentes populações, tendo a alimentação um papel importante nessas variações. As adaptações devido a dieta alimentar envolvem a seleção em genes envolvidos no metabolismo de alguns compostos alimentares, como carboidratos e álcool. Esses mesmos genes podem ter relação com a resposta a drogas utilizadas atualmente, tendo frequências diferenciadas entre populações devido a dieta alimentar (Balaresque e cols. 2007; Jobling 2004).

Mas com a miscigenação populacional os dados das populações parentais não podem ser extrapolados, sendo essa extrapolação de dados de uma população para as outras incerta. As populações miscigenadas apresentam uma grande heterogeneidade genética, sendo necessária a estratificação da mesma. Se não controlada, a estrutura populacional pode confundir a associação de fatores genéticos com a resposta a drogas, o que não é necessário em populações não miscigenadas (Suarez-Kurtz 2005). A utilização de populações miscigenada em estudos de doenças genéticas e estudos farmacogenéticos é importante, pois permite o estudo de desequilíbrio de ligação e identificação e seleção de marcadores (tagSNPs) que são suficientes para representar toda a variação comum na região de interesse,

sendo um pré-requisito para esta aplicação um bom entendimento das proporções da miscigenação e da dinâmica do processo de miscigenação, entendimento esse possível através dos marcadores informativos de ancestralidade (Parra e cols. 1998; Suarez-Kurtz 2005). Outra possibilidade é no sentido de coletar informações sobre outros grupos pouco estudados, como ameríndios e africanos, geralmente excluídos nos estudos farmacogenéticos, ou com tamanho populacional pequeno nos estudos realizados (Suarez-Kurtz 2005).

1.6. POPULAÇÃO BRASILEIRA

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, resultado da mistura entre europeus, africanos e ameríndios. Quando os europeus chegaram à América, no final do século XV, existiam aproximadamente 2,5 milhões de indígenas vivendo na área que atualmente é o Brasil. Desde o início da colonização do Brasil pelos portugueses houve intensa mistura com os indígenas, e posteriormente com os africanos trazidos ao Brasil para servirem como escravos. Nos séculos XIX e XX foram recebidos no Brasil imigrantes italianos, espanhóis e alemães, além dos japoneses (Ribeiro 1995).

A ancestralidade da população brasileira estimada com mtDNA mostra que a contribuição relativa da linhagem matrilinea em uma amostra de população urbana branca é de 33% ameríndia, 28% de africana e 39% de linhagens europeias (Alves-Silva e cols. 2000). A linhagem patrilinea é determinada pelo cromossomo Y, e nos brasileiros brancos brasileiros mostrou que a maioria dos cromossomos Y tem origem europeia, com uma frequência muito baixa de Africanos subsaarianos e inexistência de contribuição dos ameríndios (Carvalho-Silva e cols. 2001). Esse resultado mostra a formação da população brasileira por homens europeus e mulheres ameríndias e africanas, estando de acordo com a história da colonização no Brasil desde 1500 (Carvalho-Silva e cols. 2001; Parra e cols. 2003). Em populações latinas foi encontrado resultado semelhante utilizando marcadores autossômicos, no cromossomo X e Y e mtDNA, mostrando contribuição desproporcional de homens europeus e mulheres ameríndias (Bryc e cols. 2010).

1.7. ANCESTRALIDADE BIOGEOGRÁFICA

A história evolutiva do homem moderno, desde sua origem na África passando pela ocupação de todo o globo provavelmente ocorreu nos últimos 200.000 anos. Este é o cenário mais aceito, sendo conhecido como origem recente na África (Relethford 2008). Ao longo

desta caminhada as variações em DNA presentes na população ancestral e aquelas novas variações que surgiram pelo processo mutacional sofreram pressões genômicas e demográficas para sua manutenção ou eliminação. Entre as forças genômicas a seleção e recombinação são as principais. Entre as forças demográficas, a deriva genética, a miscigenação, as reduções e expansões populacionais, e as migrações são as principais forças a moldarem a variabilidade genética nas populações humanas (Relethford 2008; Stringer 2002).

Uma população humana pode ser biologicamente identificada por pequenas diferenças acumuladas na frequência dos alelos (Rosenberg e cols. 2002). Grupos populacionais podem ser reconhecidos utilizando essas diferenças genéticas. Utilizando 377 microssatélites em 1056 indivíduos de 52 populações, Rosenberg e colaboradores, sem informações sobre a ancestralidade dos indivíduos, foram capazes de identificar 6 grupos genéticos, que correspondem a 6 regiões geográficas. A maior variação ocorre entre indivíduos de uma mesma população, chegando a 92 a 95%, enquanto a diferenciação entre populações varia entre 3 a 5% (Rosenberg e cols. 2002). Li e colaboradores utilizando 650.000 SNPs em 938 indivíduos de 51 populações conseguiram identificar 7 grupos populacionais (Li e cols. 2008). Esses estudos mostram que é possível caracterizar variabilidade genética populacional utilizando marcadores que permitem essa identificação. Essa ancestralidade biogeográfica do indivíduo pode ser estimada utilizando marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) (Parra e cols. 1998; Shriver e cols. 2003). Alguns alelos são mais frequentes em uma população que em outra, e estes podem ser marcadores genéticos de DNA específicos de uma população. As diferenças genéticas são visíveis pelas variações morfológicas entre os grupos étnicos, resposta a drogas e susceptibilidade e resistência a doenças (Jobling 2004). Os AIMs constituem cerca de 0,01% do genoma humano (Frudakis 2007).

Nos últimos anos aumentou o número de AIMs conforme o progresso dos métodos e técnicas genômicas para localizá-los entre as populações, sendo propostos vários painéis de ancestralidade para Europeus, Africanos, Afro-Americanos, Hispânicos e Nativo Americanos (Halder e cols. 2008; Mao e cols. 2007; Parra e cols. 1998; Price e cols. 2007; Shriver e cols. 2003; Smith e cols. 2001). Os polimorfismos de única base (SNPs) são variações no DNA em um único nucleotídeo no genoma de indivíduos da mesma espécie (Sobrinho e cols. 2005). Eles não estão distribuídos de forma aleatória no genoma e tem frequência de aproximadamente 1% (Brettell e cols. 2007; Frudakis 2007; Lins 2007).

Em populações que foram recentemente miscigenadas, como a brasileira, os indivíduos não conseguem informar precisamente a sua ancestralidade (Barnholtz-Sloan e

cols. 2005). Para testar e controlar a estratificação populacional podem ser utilizados marcadores informativos de ancestralidade (Barnholtz-Sloan e cols. 2008).

1.8. FARMACOGENÉTICA DA LLA

A toxicidade dos esquemas terapêuticos utilizados no tratamento da LLA tem um papel importante na aderência ao tratamento e obviamente na qualidade de vida dos pacientes. Outro aspecto importante relacionado à estratificação é que nem sempre aqueles pacientes estratificados com de baixo risco, realmente respondem dentro do esperado (Rocha e cols. 2005).

A LLA é uma doença geneticamente heterogênea e o diagnóstico de cura varia de modo significativo entre esses subgrupos (Pui e cols. 2004). O envolvimento de genes associados à farmacocinética e farmacodinâmica das drogas utilizadas nos protocolos de tratamento apresentem um grande potencial de estarem mediando tanto a toxicidade quanto a efetividade dos protocolos de tratamento (Bhatia e cols. 2002; Cheok e cols. 2009; Rocha e cols. 2005).

A potencial identificação de genes associados à resposta aos protocolos terapêuticos utilizados no tratamento da LLA e sua incorporação na decisão dos esquemas terapêuticos a serem utilizados podem aumentar ainda mais a taxa de cura e reduzir os efeitos colaterais. Para isso vários estudos farmacogenéticos tem sido realizados em crianças com LLA (Cheok e cols. 2009; Davidsen e cols. 2008; de Jonge e cols. 2009; Rocha e cols. 2005). Porém nenhum estudo do tipo foi realizado ainda na população brasileira.

Uma droga de ampla utilização no tratamento da LLA é o metotrexato, utilizado nas fases de consolidação e manutenção, sofrendo variações de dosagem segundo a fase em que se encontra o paciente (Jonsson e Kamen 1991). Apesar da sua eficácia, este medicamento pode estar associado a algumas reações adversas a medicamentos como ataques epiléticos (Allen e cols. 1980; Winick e cols. 1992). Sua estrutura é semelhante ao ácido fólico, sendo um inibidor competitivo do mesmo, e o ácido fólico é necessário para a síntese de purinas e pirimidinas. Polimorfismos do *SLC19A1* foram associados a níveis alterados de ácido fólico, em pacientes com LLA submetidos a baixas doses de metotrexato, mostrando menor toxicidade e índice de recaída em indivíduos quanto maior a expressão do *SLC19A1* (Cheok e Evans 2006). Outro polimorfismo relacionado ao metotrexato é uma substituição de um C por um T no nucleotídeo 677 do gene que codifica a *MTHFR*, uma enzima catalisadora, crucial no metabolismo do ácido fólico (Kishi e cols. 2003). Aproximadamente 10% dos americanos

brancos, 20% de algumas populações italianas, e 1% de americanos com ascendência africana, são homozigotos para o alelo T (Botto e Yang 2000). Diversos estudos relacionaram o aumento tanto de problemas gastrointestinais como hepáticos após a utilização de metotrexato em pacientes que possuíam o alelo T (Ulrich e cols. 2001; van Ede e cols. 2001).

Para uma melhor estratificação dos pacientes com LLA em grupos de risco e melhora do tratamento, podem ser utilizados polimorfismos farmacogenéticos. A identificação e incorporação desses polimorfismos no protocolo de tratamento permitirá uma melhor dosagem de drogas utilizadas no tratamento evitando efeitos colaterais e toxicidade, e melhorando o tratamento dos pacientes (Davidsen e cols. 2008).

Com o conhecimento de polimorfismos farmacogenéticos que alteram a resposta a drogas, utilizando os mesmos é possível construir um perfil individualizado de resposta a droga utilizada e fazer um tratamento guiado da dose certa da droga a ser utilizada. Com isso espera-se que os índices de falha dos tratamentos e efeitos colaterais sejam diminuídos (Evans e Johnson 2001). O estudo de polimorfismos farmacogenéticos relacionados a resposta a drogas utilizadas no tratamento da LLA, como o metotrexato, poderá permitir a utilização desses polimorfismos no tratamento, melhorando a estratificação dos pacientes e melhor dosagem das drogas, com menos efeitos colaterais, melhorando o tratamento das crianças.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de a taxa de sobrevida da LLA ser de 80% nos dias atuais, os outros 20% não respondem ao tratamento ou apresentam recidiva. Além disso, muitas crianças sofrem efeitos adversos durante o tratamento. O entendimento dos fatores que causam essa diferença de resposta do tratamento é muito importante no desenvolvimento de novas terapias e drogas para melhorar a taxa de sobrevida e diminuir o sofrimento das crianças durante o tratamento. Estudos em polimorfismos farmacogenéticos relacionados a resposta a drogas utilizadas no tratamento da LLA tem sido realizados em diversas populações, porém esses estudos não podem ser extrapolados para outras populações, principalmente as miscigenadas como a brasileira. Esses polimorfismos apresentam frequência diferenciada entre as populações, por isso é necessário o estudo desses polimorfismos na população brasileira, sendo necessária também a correção com a ancestralidade a fim de evitar falsas associações. Comparando as frequências desses alelos com outras populações é possível observar se há diferenciação populacional e correlação entre os alelos e ancestralidade geográfica, assim como verificar desequilíbrio de ligação. Conhecer a estruturação populacional é importante em estudos farmacogenéticos. O trabalho tem enfoque em polimorfismos relacionados a resposta ao metotrexato, que é uma das mais importantes drogas utilizadas no tratamento da LLA, mas também são utilizados polimorfismos relacionados a resposta a mercaptopurina e a glucocorticoides. Os SNPs selecionados foram estudados em amostras da população brasileira e comparados com populações do HapMap. Foram genotipados 21 AIMs e 9 locos informativos de ancestralidade nas crianças com LLA e os dados comparados com os obtidos na população brasileira.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a frequência de polimorfismos farmacogenéticos na população brasileira e se há diferenças entre a população brasileira e as do HapMap, assim como verificar correlação entre os polimorfismos e a ancestralidade. Estimar a ancestralidade biogeográfica em pacientes com LLA e verificar os polimorfismos farmacogenéticos e se existem diferenças com a população brasileira.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência de variantes alélicas de genes importantes relacionados com a resposta ao metotrexato em uma amostra da população brasileira, com ancestralidade já conhecida;
- Comparar esses polimorfismos entre a população brasileira e populações do HapMap a fim de verificar se há diferenciação populacional entre elas;
- Verificar se existe correlação entre os polimorfismos e a ancestralidade;
- Verificar a ancestralidade biogeográfica dos pacientes com LLA utilizando 21 AIMs e compará-las com as encontradas na população brasileira;
- Verificar a frequência de polimorfismos farmacogenéticos nos pacientes com LLA e comparar com as encontradas na população brasileira;

4. METODOLOGIA

4.1. AMOSTRAS POPULACIONAIS

4.1.1. Amostra da População Brasileira

A amostra da população brasileira utilizada é formada por 200 indivíduos brasileiros não relacionados que foram submetidos a exames de paternidade. São 40 indivíduos da população urbana de cada uma das 5 regiões geográficas brasileiras. O sexo dos indivíduos foi classificado como Feminino= Mãe (M) e Masculino= Suposto Pai (SP). A ancestralidade biogeográfica desses indivíduos foi estimada utilizando 28 AIMs (Lins e cols. 2010a).

Os genótipos dos SNPs estudados foram recuperados da Fase III do HapMap para 11 populações, que são: African ancestry in Southwest USA (ASW); Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection (CEU); Han Chinese in Beijing, China (CHB); Chinese in Metropolitan Denver, Colorado (CHD); Gujarati Indians in Houston, Texas (GIH); Japanese in Tokyo, Japan (JPT); Luhya in Webuye, Kenya (LWK); Mexican ancestry in Los Angeles, California (MEX); Maasai in Kinyawa, Kenya (MKK); Tuscans in Italy (TSI); Yoruba in Ibadan, Nigeria (YRI). Os nomes das populações são apresentados em inglês para que possam fazer sentido com os símbolos utilizados ao longo deste documento.

4.1.2. Amostra dos pacientes com LLA e extração do DNA

Este projeto está ligado à atividade assistencial realizada no Núcleo de Onco-Hematologia Pediátrica (NOHP) da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES/DF) onde são diagnosticados, em média 70-80 casos novos da doença por ano, sendo que o mesmo constitui o único serviço público de tratamento oncológico do DF. Além disso, são atendidos neste serviço, pacientes provenientes das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país. Assim, a casuística do NOHP, além de ser uma das maiores do país, é considerada uma única instituição, a qual representa a quase totalidade de portadores de leucemia atendidos em uma única região, o que reduz o viés de seleção de amostra e aumenta a possibilidade de obtenção de uma casuística estatisticamente relevante. Neste serviço o tratamento das LLA segue as orientações do “Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias na Infância” (GBTLI) conforme o protocolo GBTLI LLA-93.

Fizeram parte do estudo 95 pacientes com diagnóstico de LLA que concordaram ou tiveram a anuência de um responsável maior de idade após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Estes pacientes representam um amplo espectro nas fases de tratamento. Têm-se pacientes desde o recém-diagnóstico, passando por pacientes em indução, consolidação e manutenção. Há também pacientes fora de tratamento.

Os pacientes fazem exames de sangue regularmente (os fora de tratamento anualmente) e por isso tem seu sangue coletado. O sangue utilizado para a extração do DNA é obtido após terem sido feitos todos os exames de sangue do paciente, sendo utilizado o sangue que seria descartado. A extração de DNA do sangue foi feita utilizando o Kit GFX Genomic Blood DNA Purification da Amersham Biosciences.

4.2. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS

4.2.1. SNPs selecionados

Foram selecionados 20 SNPs em 13 genes descritos na literatura como associados a resposta a drogas utilizadas no tratamento da LLA. Os polimorfismos selecionados estão na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos locos selecionados e as drogas associadas aos mesmos (MTX=metotrexato, MP=mercaptopurina, GC= glucocorticóides).

Polimorfismo	dbSNP ID	Drogas Associadas	Alelos	
			1	2
MTHFR:677C>T	rs1801133	MTX	C	T
MTHFR:1298 ^a >C	rs1801131	MTX	A	C
GSTP1 313 ^a >G	rs1695	GC, MTX	A	G
RFC1 80G>A	rs1051266	MTX	G	A
GSTP1 A114V	rs1138272	GC, MTX	C	T
GGH 452C>T	rs11545078	MTX	C	T
MTHFD1 1958G>A	rs2236225	MTX	C	T
TPMT*2	rs1800462	MP	C	G
TPMT*3B	rs1800460	MP	A	G
TPMT*3C	rs1142345	MP	A	G
TPMT*4	rs1800584	MP	A	G
ABCC2	rs717620	MTX	A	G
SMARCA4	rs1122608	GC	G	T
ARID5B	rs10821936	MTX	C	T
ITPA IVS2+21 ^a >C	rs7270101	MP	A	C
XDH A(1936) >G	rs17323225	MTX	C	T
XDH A(2107) >G	rs17011368	MTX	C	T

Tabela 1 continuação

Polimorfismo	dbSNP ID	Drogas Associadas	Alelos	
			1	2
NR3C1	rs852977	GC	A	G
CYP3A	rs10264272	GC	C	T
CYP3A4	rs4986913	GC	C	T

4.2.2. Desenho dos Iniciadores

Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer 3, disponível na internet (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Foram utilizados os parâmetros: número de nucleotídeos=20, tamanho do produto=50-200 pb, temperatura de fusão=62°C. Os iniciadores para a extensão de base única (S) foram desenhados utilizando o programa Primo SNP 3.4 (<http://www.changbioscience.com/primo/primosnp.html>), que fornece iniciadores em que a sequência termina uma base antes do SNP em questão. Os iniciadores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Descrição da sequência, direção, tamanho e multiplex a que pertencem os iniciadores utilizados na genotipagem.

Iniciador	Sequência	Direção do iniciador	Tamanho do iniciador	Multiplex
rs1801133F	GCCTCTCCTGA CTGTCATCC	direto	20	1
rs1801133R	CAAAGCGGAAGAATGTGTCA	reverso	20	
rs1801133SR	(gact) ₂ AAGCTGCGTGATGATGAAATCG	reverso	30	
rs1695F	CTCTATGGGAAGGACCA GCA	direto	20	1
rs1695R	AGCCCCCTTTCTTTGTTCA GC	reverso	20	
rs1695SR	(gact) ₂ TAGTTGGTGTAGATGAGGGA GA	reverso	30	
rs1138272F	GCAAGCA GA GGA GAATCTGG	direto	20	1
rs1138272R	GACAGCA GGGTCTCAAAAGG	reverso	20	
rs1138272SF	(gact) ₆ GGTGGTGTCTGGCA GGA GG	direto	44	
rs11545078F	GCACATGCCTTGGATTTGA	direto	19	1
rs11545078R	CTGCCCCA GCAAATATTTTCA	reverso	21	
rs11545078SR	(gact) ₈ gaCAGTCAACA GTATCTGTGGCA	reverso	56	
rs2236225F	TCCCAATTCCCCTGATGTTA	direto	20	1
rs2236225R	AGGGCA CTCCA GTGTTTGTG C	reverso	20	
rs2236225SF	(gact) ₈ CCAACAAGCTTGA GTGCGATC	direto	52	

Tabela 2 continuação

Iniciador	Sequência	Direção do iniciador	Tamanho do iniciador	Multiplex
rs 1800462F	CCCTCTATTTAGTCATTTGAAAACA	direto	25	1
rs 1800462R	CAGGAATTTCCGGTGATTGGT	reverso	20	
rs 1800462SR	(gact) ₇ TACACTGTGTCCCCGGTCTG	reverso	48	
rs 1800460F	AAACGCAGACGTGAGATCCT	direto	20	1
rs 1800460R	CACCTGGATTGATGGCAACT	reverso	20	
rs 1800460SF	(gact) ₄ GGACATGATTTGGGATAGAGGA	direto	38	
rs 1800584F	CACCCAGCCAATTTTGAGTA	direto	20	1
rs 1800584R	TCCCCAACTTTTATGTCGTTT	reverso	21	
rs 1800584SR	(gact) ₈ gaGACAACGTATATTGCATATTTTAC	reverso	56	
rs 1801131F	TTTGGGGA GCTGAAGGACTA	direto	20	2
rs 1801131R	CTTTGTGACCATTCGGTTT	reverso	20	
rs 1801131SR	(gact) ₃ gaCGAAGACTTCAAAGACACTT	reverso	34	
rs 1051266F	CTGCAGACCATCTTCCAAGG	direto	20	2
rs 1051266R	GAAGCAAAGGTAGCACACGA	reverso	20	
rs 1051266SF	(gact) ₁₀ GAAGCTCCGGTCTGGCGGC	direto	60	
rs 1142345F	GGTTGATGCTTTTGAA GAACG	direto	21	2
rs 1142345R	CATCCATTACATTTTCAGGCTTT	reverso	23	
rs 1142345SF	(gact) ₅ gaGACTGTCCTTTTGAAAAGTTAT	direto	44	
rs 17323225 F	TGGCCATAATCCATGCAAAT	direto	20	2
rs 17323225 R	TTGTTTCATTTCCGCTGATG	reverso	20	
rs 17323225 SF	(gact) ₅ gaATGATGTTCTGGGAGTAAC	direto	42	
rs 717620 F	ATGATTCCTGGACTGCGTCT	direto	20	1
rs 717620 R	AAATGGTTGGGATGAAAGGTC	reverso	21	
rs 717620 SF	(gact) ₅ CTGACTCTGGA CTGCGTCTGGAAC	direto	38	
rs 1122608 F	CTGGGTGGTGCCATGTATAA	direto	20	3
rs 1122608 R	ATCTGGAGGCAAGAACCTGA	reverso	20	
rs 1122608 SF	(gact) ₈ gaTTTCGTCTGTAAAAGGCCA	direto	54	
rs 10821936 F	CTCTAGCCCCTTCTGTGTGC	direto	20	3
rs 10821936 R	GCAGATCCTGGCAATGTTTT	reverso	20	
rs 10821936 SF	(gact) ₂ GTGTGCA GTTACTATAGTTGTA	direto	30	

Tabela 2 continuação

Iniciador	Sequência	Direção do iniciador	Tamanho do iniciador	Multiplex
rs7270101 F	TTGGTGGCACA GAAAATTGA	direto	20	3
rs7270101 R	CGAACTGCCTCCTGACATTT	reverso	20	
rs7270101 SF	(gact) ₆ CCGTATGTCTCTGTTTGT	direto	46	
rs17011368 F	CATGGAACAGCTCTA CCTGACA	direto	22	3
rs17011368 R	TCCCTGCTAAAAGCCACATT	reverso	20	
rs17011368 SR	(gact) ₅ gaTTTGTGATCCTCA GGATGCT	reverso	42	
rs852977 F	ACCCTTGTGGAAGTGAAGC	direto	20	3
rs852977 R	CCCAAACACACACA CAACT	reverso	20	
rs852977 SF	(gact) ₆ gacTGTGCATTTTTTAGTTAATCTCT	direto	50	
rs10264272 F	TGGAATTGTACCTTTTAA GTGGA	direto	23	3
rs10264272 R	CCCCTTTGTGGAGAGCACTA	reverso	20	
rs10264272 SR	(gact) ₃ gaCCCTTTGTGGAGAGCACTAA	reverso	34	
rs4986913 F	TGCTCTCATGAACATGAAACTTG	direto	23	3
rs4986913 R	TTTGGCCCA GAGAACAATTA	reverso	21	
rs4986913 SF	(gact) ₃ gacCTTCAGAACTTCTCCTTCAAA	direto	34	

4.2.3. Genotipagem

A amplificação dos fragmentos de DNA (PCR) em multiplex foi feita utilizando o Qiagen Multiplex PCR Kit em volume final da reação de 5µL. Foram utilizados 2,5µL do PCR Master Mix, concentração final de cada iniciador em multiplex de 0,2µM, 0,6µL de DNA e água do kit para completar o volume final. Em uma mesma PCR eram utilizados os mix de iniciadores do multiplex 2 e 3. O ciclo utilizado foi 95°C por 15 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 1:30 minutos e 72°C por 1:30 minutos, seguido de 72°C por 10 minutos.

Após a amplificação foi realizada uma purificação para a degradação enzimática do excesso de dNTPs e iniciadores. Para a purificação foi utilizado 0,1µL de Exo1 (enzima de exonuclease 1, 10 U/µL), 0,9µL de SAP (fosfatase alcalina de camarão, 1 U/µL) e 0,5µL de tampão 10x da enzima SAP, acrescentado ao produto de PCR (5µL). O programa utilizado foi de 60 minutos a 37°C e posteriormente 15 minutos a 85°C para a desnaturação das enzimas.

Após a purificação foi realizada a genotipagem dos SNPs utilizando o sistema SNaPshot Multiplex System (Applied Biosystems), contendo 1µL amplicon purificado, 1,5µL de SNaPshot Kit Reaction Mix, 0,2µM dos iniciadores S em multiplex e H₂O Milli-Q até completar o volume de 5µL. Nessa etapa o multiplex 2 e 3 eram realizados separadamente. O programa de termociclagem utilizado foi 96°C por 2 minutos, 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 56°C por 10 segundos e 60°C por 20 segundos. Na reação de SNaPshot o iniciador é desenhado flanqueando o SNP de interesse, sendo adicionado um único ddNTP fluorescente que posteriormente é identificado no sequenciador.

Foi realizada uma nova purificação para a retirada dos grupos fosforil da extremidade 5' dos ddNTPs fluorescentes, adicionando diretamente às reações 0,5 U de SAP e 0,5µL de tampão 10x SAP, e posteriormente incubadas a 37°C por 60 minutos e 85°C por 15 minutos para desnaturar a enzima.

A genotipagem foi realizada no sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems) utilizando 1 µL do produto final, 8,85µL de formamida Hi-Di e 0,15µL de Liz120 Size Standard (Applied Biosystems). Os parâmetros de corrida foram: polímero POP6 com tensão de 15 volts por 20 segundos de injeção e 15 volts de corrida por 800 segundos. Os eletroferogramas foram analisados no programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

Esses SNPs foram genotipados em 200 amostras da população brasileira. Foram genotipados 9 SNPs do primeiro multiplex em 95 pacientes com LLA.

4.3. GENOTIPAGEM DOS MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE

4.3.1. Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs)

Para a estimativa da ancestralidade biogeográfica nos pacientes com LLA foram genotipados 21 AIMs. Esses AIMs foram divididos em 3 painéis multiplex para a genotipagem, utilizados no trabalho de Lins (2007).

4.3.2. Genotipagem dos AIMs

A PCR foi feita utilizando o Multiplex PCR Kit da Qiagen em volume final de 5µL. Foi utilizado 2,5µL do PCR Máster Mix, 0,5µL do Mix de Iniciadores (concentração final de cada é de 0,2mM), 1µL de DNA a 10ng/µL e 1µL de Q-solution. O ciclo utilizado foi de 95°C

por 15 minutos, 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 1:30 minutos e 72°C por 1:00 minutos, seguido de 72°C por 10 minutos.

A reação de purificação 1 foi realizada como descrito no item 4.2.3. A reação de SNaPshot foi feita utilizando 2 µL de amplicon purificado, 1,5 µL de SNaPshot Kit Reaction Mix, 1 µL do mix de iniciadores S em multiplex com concentração final de 0,4 µM e 0,5 µL de água de destilada até completar o volume final de 5 µL. O programa de termociclagem utilizado foi de 96°C por 2 minutos, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos.

A segunda purificação e genotipagem foram realizadas como descrito no item 4.2.3.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo da frequência genotípica, alélica, equilíbrio de Hardy-Weinberg e AMOVA (análise de variância molecular, utilizada para determinar a estrutura genética das populações) foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e cols. 2005). O teste de F_{st} , uma das estatísticas F de Wright, é uma medida de diferenciação genética entre populações, variando de 0 (nenhuma diferenciação) a 1 (maior valor de diferenciação). A análise de desequilíbrio de ligação foi feita utilizando o Haploview (Barrett e cols. 2005). Foi feita a análise de variância entre os pacientes com LLA e as amostras da população brasileira tanto para os AIMs como para os polimorfismos farmacogenéticos. A ancestralidade foi analisada com o programa Structure 2.3.3 (Pritchard e cols. 2000). O programa WHAP (Purcell e cols. 2007) foi utilizado para a correlação entre os locos e ancestralidade nas 200 amostras da população brasileira e nos pacientes com LLA.

5. RESULTADOS

5.1. VARIABILIDADE DE POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Dos 20 locos farmacogenéticos selecionados, os genótipos de 18 locos foram recuperados para 11 populações utilizando o HapMap, não sendo recuperados os genótipos para 2 locos em nenhuma das populações do HapMap, pois os mesmos não foram genotipados nas amostras do HapMap. Desses 18 locos, em apenas 11 foi possível recuperar os dados para todas as populações (Tabela 3).

Tabela 3: Genótipos recuperados em cada população do HapMap e os genotipados na população brasileira.

Loco	População											
	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI	BRA
rs1801133	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs1801131	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs1695	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs1051266	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs1138272	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
rs11545078	x			x	x	x	x		x	x	x	x
rs2236225	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs1800462												x
rs1800460												x
rs1142345	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs1800584		x								x		x
rs717620	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs1122608	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs10821936	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs7270101		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
rs17323225	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
rs17011368	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
rs852977	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rs10264272	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x
rs4986913		x	x			x		x			x	x

A genotipagem realizada com o sistema multiplex foi realizada de maneira rápida e eficiente. Foi realizada uma PCR, seguida de purificação e reação de SNaPshot para cada sistema. Os alelos apresentaram tamanho sempre maior que 200rfus (do inglês unidade relativa de fluorescência), sendo considerados os alelos com mais de 500rfus (Figura 1, Figura 2, Figura 3). A genotipagem foi feita de maneira rápida utilizando o sistema multiplex, se

obtendo ótimos resultados utilizando o Qiagen Multiplex PCR Kit em comparação com PCR feita sem o kit e utilizando Taq Platinum. Utilizando o Qiagen Multiplex PCR Kit os picos ficaram maiores e não houve problema de artefatos e ruídos. Inicialmente seriam dois multiplex, mas devido a problemas com alguns iniciadores do SNaPshot, esses foram realocados em um novo multiplex, o dois. Dos locos selecionados, 11 tem relação com a resposta ao metotrexato, 6 com a resposta a glucocorticóides e 5 com a resposta a mercaptopurina.

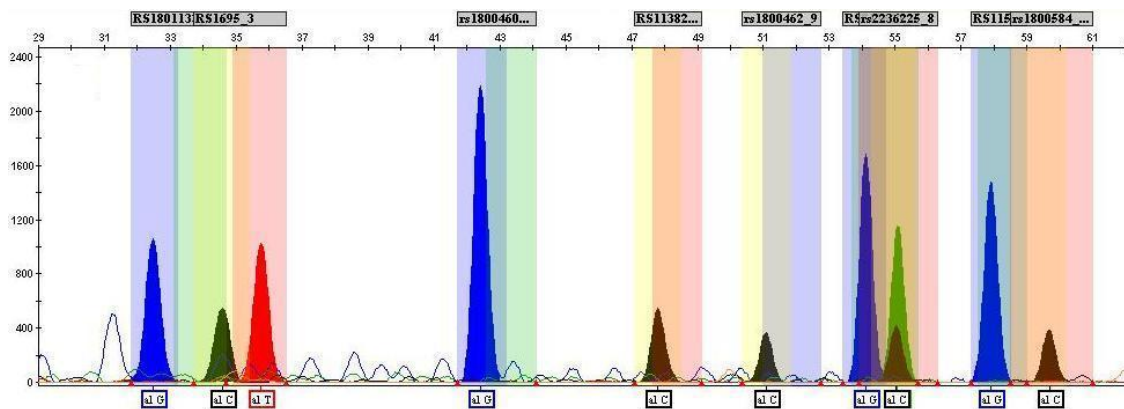


Figura 1: Eletoferograma da amplificação dos alelos por SNaPshot para o sistema multiplex 1.

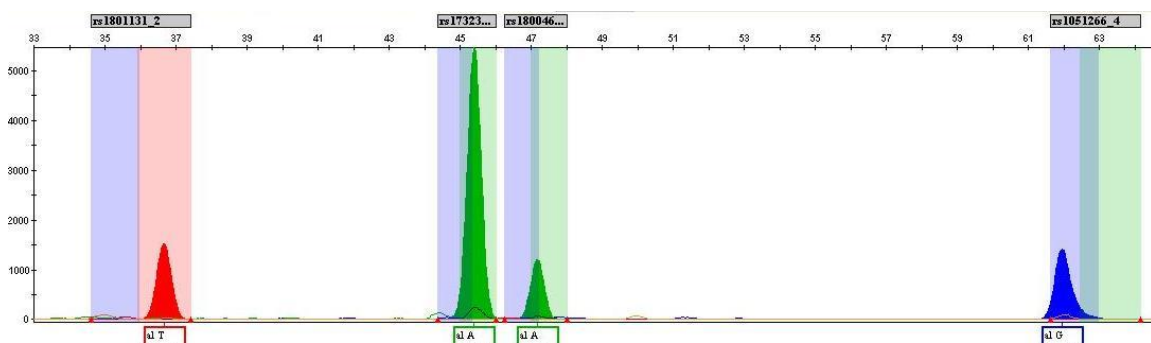


Figura 2: Eletoferograma da amplificação dos alelos por SNaPshot para o sistema multiplex 2.

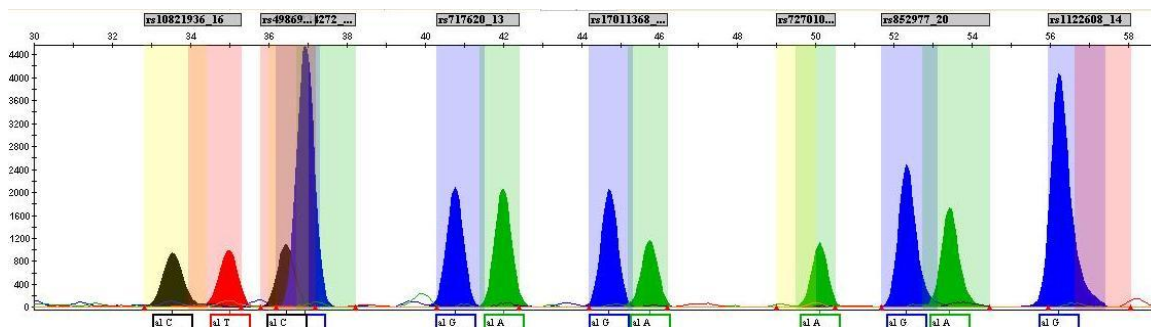


Figura 3: Eletoferograma da amplificação dos alelos por SNaPshot para o sistema multiplex 3.

Os 20 locos genotipados na população brasileira tiveram suas frequências alélicas e genótípicas comparadas com a de outras população do HapMap (Tabela 4 e Tabela 5 respectivamente).

Tabela 4: Frequências alélicas dos 20 locos farmacogenéticos na população brasileira (BRA) e populações do HapMap. n/a= genótipo não recuperado.

Loco	Alelo	População											
		ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI	BRA
rs1801133	C	0,877	0,690	0,524	0,659	0,830	0,640	0,911	0,580	0,916	0,540	0,907	0,655
	T	0,123	0,310	0,476	0,341	0,170	0,360	0,089	0,420	0,084	0,460	0,093	0,345
rs1801131	A	0,811	0,659	0,780	0,788	0,608	0,814	0,817	0,790	0,734	0,682	0,885	0,723
	C	0,189	0,341	0,220	0,212	0,392	0,186	0,183	0,210	0,266	0,318	0,115	0,277
rs1695	A	0,547	0,593	0,810	0,794	0,670	0,907	0,494	0,450	0,643	0,693	0,606	0,658
	G	0,453	0,407	0,190	0,206	0,330	0,093	0,506	0,550	0,357	0,307	0,394	0,343
rs1051266	A	0,472	0,438	0,500	0,465	0,392	0,558	0,739	0,330	0,773	0,449	0,690	0,480
	G	0,528	0,562	0,500	0,535	0,608	0,442	0,261	0,670	0,227	0,551	0,310	0,520
rs1138272	C	0,972	0,903	1	n/a	0,909	1	0,989	0,920	0,976	0,938	1	0,963
	T	0,028	0,097	0	n/a	0,091	0	0,011	0,080	0,024	0,062	0	0,038
rs11545078	C	0,953	n/a	n/a	0,933	0,824	0,861	0,931	n/a	0,941	0,918	0,920	0,930
	T	0,047	n/a	n/a	0,067	0,176	0,139	0,069	n/a	0,059	0,082	0,080	0,070
rs2236225	C	0,792	0,584	0,795	0,813	0,523	0,733	0,767	0,410	0,629	0,591	0,810	0,578
	T	0,208	0,416	0,205	0,187	0,477	0,267	0,233	0,590	0,371	0,409	0,190	0,423
rs1800462	C	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,962
	G	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,038
rs1800460	A	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,028
	G	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,973
rs1142345	A	0,915	0,973	0,994	0,971	0,977	0,983	0,882	0,920	0,979	0,994	0,956	0,952
	G	0,085	0,027	0,006	0,029	0,023	0,017	0,118	0,080	0,021	0,006	0,044	0,048
rs1800584	A	n/a	0,009	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,006	n/a	0,023
	G	n/a	0,991	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,994	n/a	0,978
rs717620	A	0,028	0,181	0,214	0,208	0,074	0,192	0,022	0,240	0,049	0,205	0,031	0,185
	G	0,972	0,819	0,786	0,792	0,926	0,808	0,978	0,760	0,951	0,795	0,969	0,815
rs1122608	G	0,981	0,743	0,911	0,929	0,761	0,907	0,972	0,840	0,948	0,750	1	0,802
	T	0,019	0,257	0,089	0,071	0,239	0,093	0,028	0,160	0,052	0,250	0	0,198
rs10821936	C	0,160	0,310	0,321	0,387	0,608	0,320	0,178	0,370	0,199	0,398	0,200	0,374
	T	0,840	0,690	0,679	0,613	0,392	0,680	0,822	0,630	0,801	0,602	0,800	0,626

Tabela 4 continuação

Loco	Alelo	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	População						
							JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI	BRA
rs7270101	A	n/a	0,872	1	n/a	0,972	1	0,878	0,940	0,843	0,898	0,894	0,851
	C	n/a	0,128	0	n/a	0,028	0	0,122	0,060	0,157	0,102	0,106	0,149
rs17323225	C	0,019	0,035	0,006	n/a	0,011	0	0,011	0,010	0,007	0,045	0,004	0,030
	T	0,981	0,965	0,994	n/a	0,989	1	0,989	0,990	0,993	0,955	0,996	0,970
rs17011368	C	0,142	0,040	0	n/a	0,011	0	0,156	0,010	0,164	0,040	0,119	0,053
	T	0,858	0,960	1	n/a	0,989	1	0,844	0,990	0,836	0,960	0,881	0,948
rs852977	A	0,642	0,668	0,899	0,865	0,812	0,919	0,622	0,810	0,689	0,648	0,673	0,720
	G	0,358	0,332	0,101	0,135	0,188	0,081	0,378	0,190	0,311	0,352	0,327	0,280
rs10264272	C	0,915	1	0,994	n/a	n/a	0,994	0,750	0,969	0,853	0,994	0,832	0,973
	T	0,085	0	0,006	n/a	n/a	0,006	0,250	0,031	0,147	0,006	0,168	0,028
rs4986913	C	n/a	1	0,994	n/a	n/a	1	n/a	0,990	n/a	n/a	1	1
	T	n/a	0	0,006	n/a	n/a	0	n/a	0,010	n/a	n/a	0	0

Tabela 5 continuação

Loco	Genótipo	População											
		ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI	BRA
rs 1142345	A/A	0,830	0,947	0,988	0,941	0,955	0,965	0,787	0,860	0,958	0,989	0,920	0,914
	A/G	0,170	0,053	0,012	0,059	0,045	0,035	0,191	0,120	0,042	0,011	0,071	0,076
	G/G	0	0	0	0	0	0	0,022	0,020	0	0	0,009	0,010
rs 1800584	A/A	n/a	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0	n/a	0
	A/G	n/a	0,018	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,011	n/a	0,045
	G/G	n/a	0,982	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,989	n/a	0,955
rs 717620	A/A	0	0,009	0,036	0,048	0	0,047	0	0,020	0,007	0,034	0	0,020
	A/G	0,057	0,345	0,357	0,321	0,148	0,291	0,044	0,440	0,084	0,341	0,062	0,330
	G/G	0,943	0,646	0,607	0,631	0,852	0,663	0,956	0,540	0,909	0,625	0,938	0,650
rs 1122608	G/G	0,962	0,566	0,833	0,871	0,557	0,814	0,944	0,760	0,895	0,568	1	0,668
	G/T	0,038	0,354	0,155	0,118	0,409	0,186	0,056	0,160	0,105	0,364	n/a	0,266
	T/T	0	0,080	0,012	0,012	0,034	0	0	0,080	0	0,068	0	0,065
rs 10821936	C/C	0,019	0,097	0,095	0,119	0,375	0,116	0,033	0,060	0,050	0,148	0,083	0,141
	C/T	0,283	0,425	0,452	0,536	0,466	0,407	0,289	0,620	0,298	0,500	0,233	0,465
	T/T	0,698	0,478	0,452	0,345	0,159	0,477	0,678	0,320	0,652	0,352	0,683	0,394
rs 7270101	A/A	n/a	0,743	1	n/a	0,955	1	0,778	0,880	0,706	0,795	0,805	0,732
	A/C	n/a	0,257	0	n/a	0,034	0	0,200	0,120	0,273	0,205	0,177	0,237
	C/C	n/a	0	0	n/a	0,011	0	0,022	0	0,021	0	0,018	0,031
rs 17323225	C/C	0	0	0	n/a	0	0	0	0	0	0,023	0	0
	C/T	0,038	0,071	0,012	n/a	0,023	0	0,022	0,020	0,014	0,045	0,009	0,060
	T/T	0,962	0,929	0,988	n/a	0,977	1	0,978	0,980	0,986	0,932	0,991	0,940
rs 17011368	C/C	0,019	0	0	n/a	0	0	0,011	0	0,035	0,011	0,009	0
	C/T	0,245	0,080	n/a	n/a	0,023	0	0,289	0,020	0,259	0,057	0,2210	0,105
	T/T	0,736	0,920	1	n/a	0,977	1	0,700	0,980	0,706	0,932	0,7700	0,895
rs 852977	A/A	0,396	0,451	0,821	0,753	0,670	0,837	0,389	0,680	0,483	0,420	0,4870	0,515
	A/G	0,491	0,434	0,155	0,224	0,284	0,163	0,467	0,260	0,413	0,455	0,3720	0,410
	G/G	0,113	0,115	0,024	0,024	0,045	0	0,144	0,060	0,105	0,125	0,1420	0,075

Tabela 5 continuação

População													
Loco	Genótipo	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI	BRA
rs10264272	C/C	0,830	1	0,988	n/a	n/a	0,988	0,567	0,939	0,727	0,989	0,6900	0,950
	C/T	0,170	0	0,012	n/a	n/a	0,012	0,367	0,061	0,252	0,011	0,2830	0,045
	T/T	0	0	0	n/a	n/a	0	0,067	0	0,021	0	0,0270	0,005
rs4986913	C/C	n/a	1	0,988	n/a	n/a	1	n/a	0,979	n/a	n/a	1	1
	C/T	n/a	0	0,012	n/a	n/a	0	n/a	0,021	n/a	n/a	0	0
	T/T	n/a	0	0	n/a	n/a	0	n/a	0	n/a	n/a	0	0

Para o loco rs4986913 foi encontrado somente o alelo C na população brasileira. Esse mesmo loco, quando comparado com as outras 11 populações, existem as frequências alélicas e genotípicas em somente 5 das populações (CEU, CHB, JPT, MEX e YRI), e dessas em somente duas (CHB e MEX) são encontrados os dois alelos, sendo o T em frequência baixa: 0,006 e 0,01 respectivamente.

Quando realizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg na população brasileira não foi encontrado nenhum valor de p significativo, indicando que os locos genotipados estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6). Foi utilizado um $p=0,002$ devido a correção de Bonferroni em análises múltiplas.

Tabela 6: Heterozigozidade observada e esperada na população brasileira para os 20 locos. Não foi encontrado valor de p significativo ($p=0,002$).

Loco	Heterozigozidade		Valor p
	Observada	Esperada	
rs1801133	0,517	0,453	0,058
rs1801131	0,338	0,401	0,032
rs1695	0,485	0,451	0,346
rs1051266	0,474	0,500	0,477
rs1138272	0,065	0,072	0,237
rs11545078	0,140	0,130	0,603
rs2236225	0,535	0,489	0,195
rs1800462	0,065	0,072	0,238
rs1800460	0,055	0,053	1,000
rs1142345	0,076	0,092	0,062
rs1800584	0,045	0,044	1,000
rs717620	0,330	0,302	0,242
rs1122608	0,266	0,318	0,024
rs10821936	0,464	0,469	1,000
rs7270101	0,237	0,254	0,389
rs17323225	0,060	0,058	1,000
rs17011368	0,105	0,099	1,000
rs852977	0,410	0,404	1,000
rs10264272	0,045	0,053	0,131
rs4986913	monomórfico		

Foi medido o índice de fixação (F_{st}) na população brasileira dividida nas cinco regiões geopolíticas brasileiras. O F_{st} encontrado entre as regiões brasileiras na análise par a par não teve nenhum valor de p significativo, indicando que não há diferenciação entre as regiões brasileiras e toda a população pode ser tratada como uma só (Tabela 7). Quando analisados os

locos separadamente foi encontrado valor de F_{st} significativo entre a população CO e N no loco rs1695 (0,036), CO e NE no loco rs1801133 (0,052), CO e S para o loco rs1142345 (0,078), N e S no loco rs1800462 (0,058) e nas populações S e SE no loco rs1800462 (0,058) (Apêndice 19,

Apêndice 20 e Apêndice 21). Apesar de encontrado valor de F_{st} significativo, a diferenciação entre as populações é pequena.

Tabela 7: F_{st} estimado na análise par a par das regiões brasileiras para os 20 SNPs farmacogenéticos.

	CO	NE	N	SE	S
CO	-	0,081+-0,028	0,306+-0,047	0,414+-0,036	0,243+-0,054
NE	0,0092	-	0,567+-0,045	0,135+-0,036	0,54+-0,042
N	0,0025	-0,0005	-	0,342+-0,055	0,288+-0,057
SE	-0,0006	0,0058	0,0026	-	0,189+-0,043
S	0,0029	-0,0021	0,0027	0,0039	-

Para verificar a diferença entre a população brasileira e as populações do HapMap em todos os locos, as populações foram divididas par a par e foi realizado o teste AMOVA (análise da variância molecular), obtendo-se F_{st} e o valor de significância de cada loco entre as populações (tabelas Apêndice 1) e o F_{st} considerando todos os locos (Tabela 8).

Tabela 8: Matriz do F_{st} e p entre as populações comparadas par a par, considerando todos os locos disponíveis entre elas. Na diagonal inferior estão os valores de F_{st} e na diagonal superior seus respectivos valores de significância (p).

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	<0,01	0,36	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,054	<0,01
ASW	0,044	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CEU	<0,001	0,043	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CHB	0,035	0,098	0,055	-	0,14	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CHD	0,029	0,065	0,044	0,002	-	<0,01	0,054	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
GIH	0,021	0,061	0,023	0,083	0,061	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
JPT	0,039	0,103	0,066	0,007	0,005	0,077	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
LWK	0,076	0,023	0,080	0,145	0,114	0,104	0,140	-	<0,01	<0,01	<0,01	0,06
MEX	0,032	0,100	0,033	0,095	0,094	0,061	0,116	0,148	-	<0,01	<0,01	<0,01
MKK	0,059	0,052	0,069	0,126	0,101	0,071	0,104	0,021	0,142	-	<0,01	<0,01
TSI	0,004	0,068	0,004	0,036	0,038	0,041	0,051	0,109	0,040	0,093	-	<0,01
YRI	0,065	0,016	0,079	0,118	0,083	0,101	0,107	0,004	0,157	0,021	0,103	-

Foi encontrado valor de F_{st} significativo para a maioria das comparações par a par entre as populações, não tendo valor de p significativo as comparações BRA-CEU, BRA-TSI, CHB-CHD, CHD-JPT, LWK-YRI. A população brasileira apresentou menor diferença genética com as populações EUR (0,0001) e TSI (0,004), não apresentando valor de F_{st} significativo com essas populações, indicando que não há diferenciação entre elas. A maior diferenciação foi com a população LWK (0,0759) seguida pela YRI (0,0655) e MKK (0,0594), que são populações africanas, e ASW (0,0437) que é formada pelos afro-americanos, por isso menos diferenciada do que as outras com a população brasileira e também as europeias e asiáticas.

As populações asiáticas apresentam baixo valor de F_{st} entre elas (CHB, CHD e JPT), assim como as europeias (CEU e TSI) e africanas (LWK, MKK e YRI) com valor de p não significativo para a maioria dos locos (Apêndice 1 a Apêndice 18). Quando considerado todos os locos possíveis na análise do F_{st} , somente a população europeia pode ser agrupada (CEU e TSI).

De acordo com o F_{st} e valor de p encontrado para cada loco as populações foram agrupadas em blocos de acordo com ancestralidade geográfica, sendo desconsideradas do agrupamento populações miscigenadas (ASW com as africanas e BRA com as europeias, MEX e GIH não sendo agrupadas com nenhuma outra). Para o loco rs1801133 (Apêndice 1) a maioria das populações apresenta valor de F_{st} significativo, podendo ser agrupadas as populações CHD e JPT, e LWK, MKK e YRI. Já nos locos rs1801131 (Apêndice 2), rs1051266 (Apêndice 4) e rs1122608 (Apêndice 11) é possível agrupar as europeias (CEU e TSI), asiáticas (CHB, CHD e JPT) e duas africanas (LWK e MKK). Só é possível agrupar a população CHB e CHD, e a MKK e YRI para o loco rs1695 (Apêndice 3). Esse polimorfismo apresenta variação de frequência entre as populações e dentro de populações com a mesma ancestralidade. No loco rs1138272 (Apêndice 5) é possível agrupar as populações CEU e TSI, CHB e JPT, e LWK e MKK. Foram agrupadas somente as populações africanas (LWK, MKK e YRI) para o loco rs11545078 (Apêndice 7). No loco rs2236225 foram agrupadas as populações CEU e TSI; CHB, CHD e JPT; LWK e YRI (Apêndice 8). Já nos locos rs7270101 (Apêndice 12), rs17323225 (Apêndice 13) e rs17011368 (Apêndice 14) foram agrupadas as populações CEU e TSI; CHB e JPT; e LWK, MKK e YRI. As populações CEU e TSI, CHB e JPT, MKK e YRI foram agrupadas no loco rs10264272 (Apêndice 17). No loco rs4986913 (Apêndice 18) foi possível agrupar apenas a população CHB e JPT, sendo que das 6 populações com genótipos disponíveis no HapMap apenas duas apresentaram o alelo C.

É possível agrupar todas as populações europeias (CEU e TSI), asiáticas (CHB, CHD e JPT) e africanas (LWK, MKK e YRI) para os locos rs717620 (Apêndice 6), rs10821936 (Apêndice 12) e rs852977 (Apêndice 16). Já no loco rs1800584 (Apêndice 10) existem dados somente para as populações europeias, que não apresentam F_{st} significativo entre elas nem com a população brasileira.

Quando comparada a população brasileira e as outras foi encontrado pelo menos um valor de F_{st} significativo entre a BRA e as do HapMap. Na população CEU foi encontrado em somente um loco ($F_{st}=0,024$, loco rs1695) (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de F_{st} da população brasileira com as populações do HapMap. Os valores em negrito indicam valor de p significativo. n/d= genótipo não disponível, *= loco monomórfico para as populações.

Loco	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
rs1801133	0,095	-0,001	0,031	-0,004	0,067	-0,004	0,151	0,013	0,175	0,024	0,154
rs1801131	0,027	0,004	0,004	0,007	0,026	0,018	0,019	0,013	-0,002	<0,001	0,077
rs1695	0,030	0,004	0,050	0,039	-0,004	0,142	0,050	0,078	-0,001	-0,001	0,005
rs1051266	-0,004	0,000	-0,003	-0,004	0,011	0,008	0,123	0,029	0,170	-0,002	0,093
rs1138272	-0,002	0,024	0,016	n/d	0,024	0,016	0,008	0,018	-0,001	0,003	0,024
rs11545078	-0,004	n/d	n/d	-0,004	0,055	0,024	-0,004	n/d	-0,002	-0,003	-0,001
rs2236225	0,093	-0,002	0,093	0,110	0,002	0,046	0,070	0,055	0,002	-0,004	0,117
rs1142345	0,007	0,001	0,022	0,000	0,004	0,008	0,033	0,004	0,006	0,022	-0,002
rs1800584	n/d	0,006	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	0,004	n/d
rs717620	0,068	-0,002	-0,001	-0,002	0,043	-0,004	0,103	0,007	0,079	-0,003	0,099
rs1122608	0,101	0,003	0,038	0,055	0,001	0,035	0,106	-0,003	0,091	0,004	0,149
rs10821936	0,068	0,004	0,002	-0,004	0,101	0,002	0,081	-0,003	0,069	-0,003	0,059
rs7270101	n/d	0,002	0,092	n/d	0,067	0,091	-0,001	0,028	-0,003	0,005	0,007
rs17323225	0,002	-0,003	0,009	n/d	0,003	0,012	0,004	0,008	0,013	-0,001	0,018
rs17011368	0,040	0,003	0,026	n/d	0,018	0,026	0,062	0,023	0,067	-0,002	0,027
rs852977	0,009	0,002	0,083	0,052	0,018	0,104	0,018	0,014	<0,001	0,008	0,001
rs10264272	0,040	0,016	0,007	n/d	n/d	0,007	0,241	-0,005	0,081	0,008	0,106
rs4986913	n/d	*	0,0050	n/d	n/d	*	n/d	0,007	n/d	n/d	*

Para saber se a ancestralidade tem relação com o os alelos dos locos escolhidos, foi feita a correlação entre a ancestralidade e os locos na população brasileira (Tabela 10). Os dados sobre a ancestralidade das amostras utilizadas estão no trabalho de Lins e cols, 2010.

Tabela 10: Coeficiente de associação entre os locos e a ancestralidade na população brasileira. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Loco	Alelo	Ancestralidade		
		EUR	AFR	AMR
rs1801133	T	0,029	-0,028	-0,002
rs1801131	C	0,013	-0,004	-0,009
rs1695	G	-0,044*	0,036*	0,009
rs1051266	A	-0,043*	0,016	0,027*
rs11545078	T	0,047	-0,024	-0,024
rs2236225	A	0,055*	-0,05**	-0,005
rs1800462	G	0,082	-0,128**	0,018
rs1800460	A	-0,009	0,025	-0,021
rs1142345	G	-0,022	0,03	-0,009
rs1800584	A	0,004	0,026	-0,055
rs717620	T	0,015	-0,006	-0,009
rs1122608	T	0,049	-0,022	-0,029
rs10821936	C	-0,013	0,012	0,001
rs7270101	C	0,032	-0,014	-0,019
rs17323225	G	0,03	0,004	-0,051
rs17011368	G	-0,03	0,026	0,005
rs852977	G	-0,004	0,013	-0,009
rs10264272	T	-0,179**	0,067	0,082**
rs4986913		monomórfico		

Foi encontrada associação significativa entre a ancestralidade e alelos em 6 dos 20 locos, para os outros locos não houve correlação significativa. Nos locos com coeficiente de associação significativo, o mesmo é baixo entre o alelo e a ancestralidade, sendo maior entre o alelo T do loco rs1138272 e a ancestralidade africana (-0,111, $p=0,01$), o alelo G do loco rs1800462 e a ancestralidade africana (-0,128, $p=0,004$), e o alelo T do loco rs10264272 e a ancestralidade europeia (-0,179, $p<0,001$).

Utilizando os dados obtidos no HapMap foi possível calcular a ancestralidade na população ASW e MEX, escolhidas por serem populações miscigenadas assim como a brasileira. Os dados de ancestralidade dessas duas populações foram retirados do trabalho de Lins e cols. 2010b. A população ASW tem maior proporção de ancestralidade africana (77,2%) e a MEX de ancestralidade ameríndia e europeia (47,2% e 45,6% respectivamente). Foi calculado o índice de associação da ancestralidade com os polimorfismos farmacogenéticos também nessas duas populações. Na população ASW foram encontrados 2 locos com correlação negativa com a ancestralidade africana e 1 com correlação positiva com ancestralidade europeia e negativa com a africana (Tabela 11). Já na MEX foram encontrados 4 locos correlacionados com a ancestralidade e 3 locos monomórficos (Tabela 12). A associação nas populações, de modo geral, ocorreu em locos e ancestralidades diferentes em cada uma delas.

Tabela 11: Coeficiente de associação entre os locos e a ancestralidade na população ASW. *p<0,05 e **p<0,01.

Loco	Alelo	Ancestralidade		
		EUR	AFR	AMR
rs1801133	A	-0,053	0,031	0,004
rs1801131	G	0,082	-0,013	-0,070
rs1695	G	0,044	-0,033	0,016
rs1051266	C	0,081**	-0,033*	-0,017
rs1138272	T	-0,175	0,017	0,049
rs11545078	A	-0,041	0,060	-0,041
rs2236225	A	-0,083	0,017	0,024
rs1142345	C	0,054	-0,058*	0,028
rs717620	T	0,005	0,000	-0,003
rs1122608	T	-0,085	-0,004	0,037
rs10821936	C	0,044	-0,049**	0,023
rs17323225	C	-0,164	-0,036	0,066
rs17011368	C	-0,060	0,029	0,003
rs852977	G	-0,040	0,022	0,003
rs10264272	T	-0,070	0,005	0,029

Tabela 12: Coeficiente de associação entre os locos e a ancestralidade na população MEX. *p<0,05 e **p<0,01.

Loco	Alelo	Ancestralidade		
		EUR	AFR	AMR
rs1801133	A	-0.093*	0.018	0.067
rs1801131	G	0.084	-0.026	-0.043
rs1695	A	0.106*	-0.009	-0.082*
rs1051266	T	-0.071	0.004	0.056
rs1138272	T	0.143	-0.023	-0.092
rs2236225	G	0.022	0.018	-0.036
rs1142345	C	-0.047	-0.009	0.050
rs717620	T	-0.011	-0.001	0.010
rs1122608	T	0.128*	-0.024	-0.083
rs10821936	C	0.002	-0.011	0.010
rs7270101	C	0.026	0.082*	-0.103
rs17323225	T	monomórfico		
rs17011368	T	monomórfico		
rs852977	G	0.012	-0.030	0.021
rs10264272	T	-0.009	-0.048	0.056
rs4986913	G	monomórfico		

Os locos presentes no mesmo gene foram analisados quanto ao desequilíbrio de ligação na população brasileira e também nas outras 11 populações (Tabela 13). Na população brasileira foi encontrado desequilíbrio de ligação entre os locos rs1800460 e rs1142345 no gene TPMT, e rs17323225 e rs17011368 no gene XDH. Apesar de estarem em desequilíbrio de ligação os 2 locos de cada gene devem ser genotipados pois não são TagSNPs, segundo a análise estatística utilizando o algoritmo Tagger do Haploview (Barrett e cols. 2005). Só não

5.2. ANCESTRALIDADE E POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS EM CRIANÇAS COM LLA

5.2.1. Ancestralidade Biogeográfica

A genotipagem foi realizada de forma rápida utilizando multiplex. Dos 28 AIMs descritos nos trabalho de Lins (2010), 7 apresentaram problemas durante a genotipagem sendo retirados dos multiplex. Foram então utilizados 21 AIMs distribuídos em 3 painéis multiplex. As frequências alélicas dos 21 locos genotipados nos pacientes com LLA e na população brasileira estão na Tabela 14.

Tabela 14: Frequências alélicas dos 21 AIMs nos pacientes com LLA e na população brasileira total e separada por região geopolítica.

Loco	Alelo	LLA	CO	NE	N	SE	S	BRA
rs1426654	A	0,658	0,675	0,716	0,736	0,795	0,855	0,755
	G	0,342	0,325	0,284	0,264	0,205	0,145	0,245
rs2065160	C	0,268	0,321	0,171	0,333	0,231	0,122	0,235
	T	0,732	0,679	0,829	0,667	0,769	0,878	0,765
rs4305737	A	0,595	0,488	0,434	0,597	0,436	0,346	0,460
	C	0,405	0,513	0,566	0,403	0,564	0,654	0,540
rs727563	C	0,505	0,423	0,527	0,347	0,462	0,353	0,422
	T	0,495	0,577	0,473	0,653	0,538	0,647	0,578
rs734780	C	0,362	0,385	0,324	0,347	0,269	0,278	0,321
	T	0,638	0,615	0,676	0,653	0,731	0,722	0,679
rs730570	A	0,647	0,600	0,605	0,625	0,564	0,658	0,610
	G	0,353	0,400	0,395	0,375	0,436	0,342	0,390
rs1129038	C	0,805	0,688	0,737	0,681	0,744	0,577	0,685
	T	0,195	0,313	0,263	0,319	0,256	0,423	0,315
rs1240709	A	0,500	0,463	0,592	0,500	0,615	0,679	0,570
	G	0,500	0,538	0,408	0,500	0,385	0,321	0,430
rs3796384	C	0,426	0,400	0,382	0,400	0,436	0,205	0,365
	G	0,574	0,600	0,618	0,600	0,564	0,795	0,635
rs2278354	A	0,592	0,713	0,645	0,694	0,731	0,859	0,728
	C	0,408	0,288	0,355	0,306	0,269	0,141	0,272
rs3176921	C	0,505	0,611	0,684	0,500	0,625	0,450	0,574
	T	0,495	0,389	0,316	0,500	0,375	0,550	0,426
rs2814778	C	0,295	0,111	0,146	0,078	0,200	0,080	0,123
	T	0,595	0,889	0,854	0,922	0,800	0,920	0,877
rs285	C	0,405	0,804	0,609	0,569	0,477	0,729	0,638
	T	0,595	0,196	0,391	0,431	0,523	0,271	0,362
rs1480642	C	0,747	0,750	0,769	0,588	0,859	0,892	0,772
	T	0,253	0,250	0,231	0,413	0,141	0,108	0,228

Tabela 14 continuação

Loco	Alelo	LLA	CO	NE	N	SE	S	BRA
rs6034866	A	0,298	0,118	0,150	0,150	0,154	0,092	0,133
	G	0,702	0,882	0,850	0,850	0,846	0,908	0,867
rs7349	C	0,495	0,722	0,913	0,813	0,910	0,905	0,853
	T	0,505	0,278	0,088	0,188	0,090	0,095	0,147
rs803733	C	0,516	0,681	0,713	0,650	0,705	0,757	0,701
	T	0,484	0,319	0,288	0,350	0,295	0,243	0,299
rs222541	C	0,554	0,757	0,795	0,625	0,688	0,973	0,767
	G	0,446	0,243	0,205	0,375	0,313	0,027	0,233
rs267071	A	0,526	0,52	0,646	0,548	0,500	0,520	0,547
	G	0,473	0,48	0,354	0,452	0,500	0,480	0,453
rs310612	A	0,585	0,359	0,368	0,339	0,419	0,352	0,367
	G	0,415	0,641	0,632	0,661	0,581	0,648	0,633
rs730086	C	0,526	0,500	0,563	0,597	0,564	0,722	0,589
	T	0,474	0,500	0,438	0,403	0,436	0,278	0,411

Quando realizado o teste do EHW nos pacientes com LLA não foi encontrado nenhum loco em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,002$) (Tabela 15).

Tabela 15: Heterozigotidade observada e esperada nos pacientes com LLA para os 21 marcadores de ancestralidade. Não foi encontrado valor de p significativo ($p=0,002$).

Loco	Heterozigotidade		
	Observada	Esperada	Valor p
rs1426654	0,400	0,444	0,717
rs2065160	0,436	0,441	1
rs4305737	0,425	0,506	0,354
rs727563	0,590	0,495	0,325
rs734780	0,359	0,48	0,173
rs730570	0,400	0,486	0,327
rs1129038	0,425	0,435	1
rs1240709	0,575	0,503	0,523
rs3796384	0,400	0,486	0,327
rs2278354	0,375	0,149	0,699
rs3176921	0,111	0,503	0,032
rs2814778	0,222	0,209	1
rs285	0,043	0,322	0,003
rs1480642	0,022	0,380	0,02
rs6034866	0,237	0,212	1
rs7349	0,444	0,407	0,693
rs803733	0,583	0,441	0,061
rs222541	0,324	0,373	0,408
rs267071	0,480	0,509	1
rs310612	0,656	0,468	0,025
rs730086	0,500	0,507	1

Utilizando o programa Structure 2.3.3 foi obtida a ancestralidade individual dos pacientes. O valor médio de ancestralidade encontrada nos pacientes com LLA foi comparado com o valor encontrado na população brasileira apresentados no trabalho de Lins (2010) (Tabela 16). A ancestralidade europeia é predominante em todas as populações consideradas, seguida pela africana e por último a ameríndia. A maior ancestralidade europeia foi encontrada na população da região Sul e a menor nos pacientes com LLA. O maior valor de ancestralidade africana foi encontrado nos pacientes com LLA e o menor na região Sul. A maior ancestralidade ameríndia foi encontrada na população Norte e o menor na população do Sul.

Tabela 16: Ancestralidade Europeia, Africana e Ameríndia nos pacientes com LLA e na população brasileira.

População	EUR	AFR	AMR
LLA	0,517	0,320	0,163
Centro-Oeste	0,591	0,247	0,162
Nordeste	0,630	0,217	0,153
Norte	0,577	0,232	0,191
Sudeste	0,655	0,208	0,137
Sul	0,777	0,124	0,099
Brasil	0,646	0,206	0,148

Para verificar se existe diferenciação entre os pacientes e população brasileira foi realizado o teste de análise de variância molecular, a AMOVA. O teste foi realizado par a par entre a população LLA e as populações brasileiras para todos os locos (Tabela 17).

Tabela 17: Valores de Fst da comparação par a par entre os pacientes com LLA e a população brasileira total e dividida por regiões geopolíticas. Valores em negrito indicam $p < 0,05$.

Loco	Fst - CO	Fst - NE	Fst - N	Fst - SE	Fst - S	Fst - BRA
rs1426654	-0,008	-0,002	0,004	0,035	0,082	0,019
rs2065160	-0,002	0,017	0,001	-0,005	0,05	-0,001
rs4305737	0,014	0,042	-0,01	0,041	0,108	0,033
rs727563	0,004	-0,009	0,04	-0,005	0,036	0,009
rs734782	-0,008	-0,006	-0,009	0,01	0,006	0
rs730570	-0,004	-0,005	-0,009	0,006	-0,009	-0,001
rs1129038	0,03	0,005	0,034	0,002	0,117	0,032
rs1240709	-0,006	0,008	-0,01	0,017	0,054	0,006
rs3796384	-0,008	-0,005	-0,009	-0,009	0,091	0,004
rs2278354	0,022	-0,004	0,012	0,031	0,14	0,038
rs3176921	-0,008	0,047	-0,012	0,01	-0,009	0,001

Tabela 17 continuação

Loco	Fst - CO	Fst - NE	Fst - N	Fst - SE	Fst - S	Fst - BRA
rs2814778	0,051	0,043	0,11	0,007	0,103	0,088
rs285	0,253	0,067	0,042	-0,003	0,174	0,098
rs1480642	-0,01	-0,008	0,05	0,027	0,052	-0,003
rs6034866	0,074	0,047	0,047	0,044	0,101	0,081
rs7349	0,09	0,299	0,179	0,295	0,287	0,278
rs803733	0,044	0,067	0,027	0,062	0,103	0,067
rs222541	0,074	0,108	0,001	0,028	0,317	0,098
rs267071	0,496	0,51	0,498	0,496	0,496	0,501
rs310612	0,087	0,081	0,102	0,045	0,092	0,085
rs730086	-0,008	-0,006	0,001	-0,006	0,066	0,004

Quando comparada a população dos pacientes com LLA e população BRA para os 21 locos informativos de ancestralidade foi encontrado valor de Fst significativo para 12 deles, sendo esse valor baixo para a maioria dos locos, mas com valor alto nos locos rs7349 (0,278, $p < 0,05$) e rs267071 (0,501, $p < 0,05$). O maior número de locos com valor de Fst significativo foi encontrado com a população Sul (18 locos) e o menor numero de locos com a população Centro-Oeste (5 locos).

Considerando todos os locos para a AMOVA se observa que a população dos pacientes com LLA se diferencia de todas as outras populações, assim como a população da região Sul (Tabela 18). A região Sudeste se diferencia das populações do Centro-Oeste e Nordeste. Não foi encontrado valor de Fst significativo entre as outras populações. O maior valor de Fst encontrado foi de 0,095 ($p < 0,01$) entre os pacientes com LLA e a população da região Sul. Essa maior diferenciação já era esperada, já que no Fst loco a loco foi encontrada um maior números de locos com diferenciação entre essas duas populações, assim como foram as populações com ancestralidade biogeográfica menos parecida. A diferenciação total encontrada no teste AMOVA entre as populações foi de 93,4% da variação dentro das populações e 6,6% entre as populações.

Tabela 18: Matriz do Fst e p entre a população brasileira e os pacientes com LLA comparadas par a par, considerando todos os locos disponíveis entre elas. Na diagonal inferior estão os valores de Fst e na diagonal superior seus respectivos valores de significância (p). Valores em negrito indicam valor significativo de Fst.

	LLA	BRA	CO	NE	N	SE	S
LLA	-	<0,01	0,009	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
BRA	0,045	-	0,342	0,775	0,063	0,586	0,009
CO	0,016	0,001	-	0,099	0,937	0,045	<0,01
NE	0,046	-0,003	0,005	-	0,072	0,865	<0,01
N	0,027	0,006	-0,008	0,011	-	0,009	<0,01
SE	0,051	-0,001	0,010	-0,006	0,017	-	<0,01
S	0,095	0,018	0,044	0,024	0,058	0,019	-

5.2.2. Polimorfismos Farmacogenéticos

Dos 20 SNPs farmacogenéticos genotipados na população brasileira, os 9 pertencentes ao multiplex 1 foram genotipados nos 95 pacientes com LLA. As frequências alélicas desses 9 locos foram comparadas com as encontradas na população BRA (Tabela 19). Nos pacientes com LLA foram encontrados 3 locos monomórficos (rs1138272, rs1800462 e rs1800584). Esses mesmos locos apresentaram baixa frequência na população brasileira dos alelos não encontrados nos pacientes com LLA.

Tabela 19: Frequências alélicas de 9 locos farmacogenéticos nos pacientes com LLA e na população brasileira.

Loco	Alelo	LLA	BRA
rs1801133	C	0,679	0,655
	T	0,321	0,345
rs1695	A	0,584	0,658
	G	0,416	0,343
rs1138272	C	1,000	0,963
	T	0,000	0,038
rs11545078	C	0,915	0,930
	T	0,085	0,070
rs2236225	C	0,589	0,578
	T	0,411	0,423
rs1800462	C	1,000	0,962
	G	0,000	0,038
rs1800460	A	0,016	0,028
	G	0,984	0,973
rs1800584	A	0,000	0,023
	G	1,000	0,978
rs717620	A	0,147	0,185
	G	0,853	0,815

Nenhum dos 9 locos está em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes no LLA (Tabela 20), assim como na população BRA (Tabela 6).

Tabela 20: Heterozigotidade observada e esperada nos pacientes com LLA para os 9 locos. Não foi encontrado valor de p significativo ($p < 0,05$).

Loco	Heterozigotidade		Valor p
	Observada	Esperada	
rs1801133	0,432	0,438	1
rs1695	0,474	0,488	0,834
rs1138272	Loco Monomórfico		-

Tabela 20 continuação

Loco	Heterozigozidade		Valor p
	Observada	Esperada	
rs11545078	0,128	0,157	0,124
rs2236225	0,484	0,487	1
rs1800462	Loco Monomórfico		-
rs1800460	0,032	0,031	1
rs1800584	Loco Monomórfico		-
rs717620	0,274	0,253	0,684

A fim de verificar diferenciação entre os pacientes com LLA e a população brasileira para os locos farmacogenéticos foi realizada a AMOVA. O valor de Fst e para cada loco entre as duas populações estão na Tabela 21. Foi encontrado valor de Fst significativo em dois locos, porém o valor é pequeno (0,024 para os locos rs1138272 e rs1800462), sendo esses dois locos monomórficos nos pacientes com LLA. Quando considerados todos os locos na análise não foi encontrado valor de Fst significativo (Fst= 0,001, p=0,108) indicando não diferenciação entre as duas amostras.

Tabela 21: Valores de Fst e p entre as populações BRA e LLA para nove locos farmacogenéticos. Em negrito valores de Fst com valor de p significativo (p<0,05).

Loco	Fst	Valor p
rs1801133	-0,003	0,550
rs1695	0,008	0,094
rs1138272	0,024	0,013
rs717620	0,001	0,298
rs11545078	-0,002	0,628
rs2236225	-0,004	0,780
rs1800462	0,024	0,013
rs1800460	-0,001	0,401
rs1800584	0,013	0,068

Para saber se a ancestralidade tem relação com o os alelos dos locos escolhidos, foi feita a correlação entre a ancestralidade e os locos nos pacientes com LLA (Tabela 22).

Tabela 22: Coeficiente de associação entre os locos e a ancestralidade nos pacientes com LLA. Valores em negrito apresentam $p < 0,01$.

Loco	Alelo	Ancestralidade		
		EUR	AFR	AMR
rs1801133	T	0,001	-0,106	-0,009
rs1695	G	-0,054	0,05	0,004
rs1138272	T	Monomórfico		
rs717620	A	0,01	0,005	-0,015
rs11545078	T	0,013	-0,023	0,009
rs2236225	A	-0,023	-0,016	0,009
rs1800462	G	Monomórfico		
rs1800460	A	0,128	0,021	0,003
rs1800584	A	Monomórfico		

Foi encontrada associação entre 3 locos e a ancestralidade. O loco rs1695 apresentou correlação com a ancestralidade europeia (-0,054) e africana (0,050), e os locos rs717620 e rs1800460 com a ancestralidade europeia. Não foi encontrada nenhuma associação entre os alelos e a ancestralidade ameríndia. O maior valor do coeficiente de associação foi encontrado entre o loco rs1800460 e a ancestralidade europeia (0,128), sendo esse valor de correlação baixo. Não foi encontrada correlação alta em nenhum dos locos com correlação significativa.

6. DISCUSSÃO

6.1. VARIABILIDADE DE POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS EM UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA

A farmacogenética supõe a utilização de polimorfismos em genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica de medicamentos como ferramenta para uma melhor prescrição de doses e mesmo drogas, melhorando o tratamento e minimizando efeitos colaterais (Gardiner e Begg 2006; Kalow 2002). As drogas utilizadas no tratamento de cânceres apresentam grande variabilidade em sua efetividade e em seus efeitos colaterais, sendo parte desta variabilidade creditada a variabilidade genética em genes farmacogenéticos (Meyer 2004). Essa diferença da resposta a drogas acontece entre indivíduos de uma mesma população e também entre diferentes populações (Kishi e cols. 2007; Ma e cols. 2010; Suarez-Kurtz 2005).

No presente estudo foram genotipados 20 SNPs em genes relacionados à resposta a drogas utilizadas no tratamento da LLA, com enfoque ao metotrexato, em 200 amostras da população brasileira com ancestralidade genômica conhecida.

Foram encontrados os dois alelos de cada loco em pelo menos uma amostra para 19 dos 20 locos, sendo monomórfico o loco rs4986913, na população brasileira assim como em outras populações. Esse polimorfismo no citocromo P450 (CYP3A4*19) resulta em uma alteração Pro467Ser e foi observado o alelo T (Ser) somente em asiáticos com uma frequência de 0,02 em um estudo utilizando 72 indivíduos de diferentes etnias (Dai e cols. 2001). Esse é um polimorfismo raro, aparecendo nos dados recuperados do HapMap com frequência de 0,006 nos asiáticos (CHB) em 84 amostras e 0,01 nos mexicanos (MEX) em 75 amostras, não sendo encontrado na outra população asiática, o JPT. Sendo monomórfico nas demais populações do HapMap.

Existem poucos estudos onde os polimorfismos estudados neste trabalho tenham sido genotipados em outras amostras da população brasileira. Para 13 deles a frequência na população brasileira era desconhecida. Um estudo caso-controle do gene *MTHFR* (metiltetraidrofolato redutase) nos dois polimorfismos utilizados no presente estudo (677C>T e 1298A>C) em crianças com LLA encontrou correlação entre o SNP 677C>T e

aumento no risco de desenvolvimento da LLA, enquanto não foi encontrada correlação com o outro SNP (Franco e cols. 2001). Foram utilizados 71 pacientes com LLA e 71 sem LLA, e apresentaram frequência de 677C>T do genótipo CT= 48% nos pacientes e 69% no controle, e no 1298A>C do genótipo AC de 49% nos pacientes e 42% no controle (Franco e cols. 2001). Em outro estudo utilizando os mesmo polimorfismos também em pacientes com LLA e controles não foi encontrada associação entre os polimorfismos e a LLA na população total, mas foi encontrado aumento de risco de desenvolver LLA em pacientes não brancos no SNP 1298A>C, e menor risco no SNP 677C>T também em pacientes não brancos (Zanrosso e cols. 2006). Nesse estudo foram utilizadas amostras de 176 crianças com LLA e 199 pessoas sem a doença de três regiões geopolíticas brasileiras (Sul, Sudeste e Nordeste). As frequências encontradas no polimorfismo 677C>T do genótipo heterozigoto foram de 33,9% nos pacientes e 41,4% no controle, e no polimorfismo 1298A>C de 44,1% nos pacientes e 38,2% no controle (Zanrosso e cols. 2006). Na amostra da população brasileira utilizada a frequência difere dos dois estudos, com frequência de 51% para o genótipo heterozigoto do polimorfismo 677C>T e de 33% no 1298A>C. Essa diferença nas frequências pode ocorrer devido ao número de amostras utilizadas e muitas vezes restritas quanto a sua região de origem.

A frequência do alelo G do gene *RFC1* 80A>G em uma amostra de 172 pessoas foi de 50% (Biselli e cols. 2008) e no presente estudo foi encontrada frequência de 52%, valores próximos. Outro polimorfismo onde existe estudo na população brasileira é o rs1695 no gene *GSTP1*. Foi encontrada em 591 voluntários a frequência de 0,687 do alelo A (Rossini e cols. 2002). Nesse estudo a população foi dividida por autodeclaração de cor de pele em brancos, mulatos e negros. Foi encontrada maior frequência de homozigotos nos brancos do que nos negros e mulatos (Rossini e cols. 2002). Em 113 pacientes com LLA a frequência foi de 0,677 do alelo A, e em 221 controles foi de 0,686 do mesmo alelo, sendo encontrada associação entre o alelo G juntamente com outros genes de maior risco de desenvolver LLA (Canalle e cols. 2004). Nas 200 amostras foi encontrada frequência do alelo A de 0,658. Frequências muito próximas entre nosso estudo e o trabalho de Rossini, 2002.

No gene *TPMT* existem estudos nos polimorfismos *2, *3B e *3C. Em 202 indivíduos a frequência encontrada foi no *2 de 2,2% do alelo G, no *3B de 0,2% do alelo G e no *3C de 1% no alelo G (Boson e cols. 2003). Em 116 pacientes com LLA a frequência foi no *2 de 0,4% do alelo G, no *3B não foi encontrado o alelo G, e no *3C de 0,9% no alelo G (Silva e cols. 2008). No presente estudo a frequência encontrada foi de 3,8% do alelo G no *2, no *3B de 2,8% do alelo G e no *3C de 4,8% no alelo G. As frequências encontradas foram maiores

que nos dois estudos. O alelo G do polimorfismo *TPMT**3C é mais frequente nas populações africanas do que nas outras (Tabela 4), se aproximando mais a frequência encontrada na população brasileira com a da população YRI. Para os outros dois polimorfismos do gene *TPMT* não é possível comparar com dados do HapMap.

Um problema desses estudos é um número muitas vezes pequeno de amostras utilizadas, que podem não representar bem a população brasileira. Em se tratando de estudos de associação genética na população brasileira a autodenominação de cor de pele não é um preditor adequado se utilizado no sentido de ter grupos mais homogêneos. Não é incomum encontrar em estudos de variabilidade genética ou mesmo em estudos de associação na população brasileira a utilização da autodenominação de cor de pele como um critério para formação de grupos supostamente menos heterogêneos, como no estudo de Zanrosso, 2006 em que a população foi dividida em brancos e não brancos. A consequência de se utilizar critérios como a autodenominação de cor de pele e de origem étnica em populações miscigenadas não é garantia de grupos homogêneos o que pode levar a obtenção de resultados espúrios (Tang e cols. 2005).

Um dos critérios utilizados para a estratificação em estudos de associação é a autodeclaração de cor de pele. Porém na população brasileira não existe correlação a nível individual entre a cor de pele e a ancestralidade geográfica. Um estudo realizado utilizando 176 AIMs em 595 voluntários da população brasileira que autodeclaravam sua cor de pele e com índice de pigmentação mensurado, não encontrou correlação entre a ancestralidade biogeográfica e o índice de pigmentação a nível individual na população brasileira, indicando que a autodenominação não representa bem a ancestralidade do indivíduo na maioria dos casos (Chiabai 2008). Para isso é necessária a utilização de marcadores informativos de ancestralidade para uma correta estratificação populacional, se mostrando a melhor ferramenta de estratificação populacional (Barnholtz-Sloan e cols. 2005).

Quando a população brasileira foi dividida por região geopolítica, não foi encontrada diferenciação entre as regiões, não sendo encontrado nenhum valor de *Fst* significativo quando analisadas todos os locos farmacogenéticos simultaneamente. Esse resultado indica uma homogeneidade na frequência alélica dos polimorfismos estudados entre as regiões brasileiras. Quando analisados separadamente foi encontrado *Fst* significativo entre algumas populações, porém esse valor não é alto, sendo o maior valor encontrado no SNP rs1142345 entre as populações CO e S (*Fst*=0,078). Esse valor encontrado indicando a diferenciação populacional pode ser explicado pela história de formação da população brasileira. O SNP

rs1142345, por exemplo, tem frequência diferenciada entre as populações europeia e africana. Na região sul do Brasil predomina a ancestralidade europeia devido à intensa imigração de italianos e alemães para a região durante o século XIX e XX, enquanto a região Centro-Oeste é mais homogênea e foi formada por populações das outras regiões brasileiras. Nas amostras utilizadas foi encontrada diferenciação com relação a ancestralidade entre as amostras da região Sul e as outras regiões (Lins e cols. 2010a).

A população brasileira não apresentou diferenciação entre as regiões, podendo a nível populacional ser considerada homogênea. É importante em estudos de associação que a população seja homogênea, devendo ser estratificada no caso de populações miscigenadas. Entender a diversidade genética das populações é importante em estudos farmacogenéticos (Suarez-Kurtz 2005). Entendendo essa diversidade é possível identificar grupos que podem se beneficiar mais de uma droga, ou identificar efeitos colaterais que não foram vistos em outras populações. Esses estudos em populações miscigenadas são importantes para diferentes populações, já que a maioria dos estudos é feito em populações europeias (Suarez-Kurtz 2005). A partir de estudos utilizando AIMs para inferir a estrutura populacional, se sugere que em populações latinas seja realizada a correção com a ancestralidade genômica em estudos de associação com doenças e resposta a drogas (Bryc e cols. 2010).

A população brasileira apresenta maior similaridade com as frequências alélicas das populações europeias (CEU e TSI), principalmente com a CEU. Essa tendência é confirmada pela análise de variância entre as populações, onde a população BRA não teve diferenciação significativa com a CEU e TSI quando considerados todos os locos possíveis. A diferenciação entre a população BRA e as africanas (LWK, MKK e YRI) também foi menor do que a diferenciação entre essas populações e as europeias (Tabela 8), mostrando contribuição da ancestralidade africana na miscigenação. Isso mostra que a população BRA se assemelha mais à população europeia, e mais às populações africanas do que as populações europeias, assim como os resultados obtidos utilizando 28 AIMs nas 200 amostras utilizadas. Utilizando 28 marcadores informativos de ancestralidade, os AIMs, foram encontrados uma ancestralidade média na população brasileira de 77,1% europeia, 14,3% africana e 0,85% de ameríndia (Lins e cols. 2010a). A maior diferenciação da população BRA foi com as africanas, seguida das asiáticas e por último as europeias. Estudos em genética de populações tem mostrado variações entre populações, principalmente entre cinco principais grupos, que são baseados na ancestralidade biogeográfica. A população BRA apresentou diferenciação com a CEU em somente um loco (rs1138272) do gene *GSTP1* (glutathione s-transferase), que tem frequência

alélica do T de 0,09 em americanos com ascendência europeia (Watson e cols. 1998) e 0,097 na população CEU, contra 0,038 da população BRA. Nesse loco a população brasileira não apresentou diferenciação com a outra população europeia, a TSI. Para este mesmo loco foi encontrada correlação negativa com a ancestralidade africana (Tabela 10), não havendo correlação com a ancestralidade europeia.

Em alguns locos não foi possível agrupar as populações de acordo com a região geográfica, pois as populações apresentaram valor de F_{st} significativo entre elas. Esse resultado mostra que populações pertencentes à mesma região geográfica não podem ser sempre agrupadas pois podem apresentar diferenças entre elas. Utilizando os dados da ancestralidade foi feita a correlação entre a ancestralidade e os SNPs farmacogenéticos. Foram encontrados seis locos correlacionados com a ancestralidade, não tendo nenhum dos locos valor de correlação alto.

O loco rs1695 do gene *GSTP1* varia entre e dentro das populações, sendo a população africana com menor frequência e a europeia com maior frequência do alelo G (Garte e cols. 2001), assim como nos dados do HapMap. Para o loco rs1051266 do gene *RFC1* e o loco rs10264272 do gene *CYP3A5* não existem estudos com frequência em populações ameríndias, sendo o *CYP3A5* raro em europeus (Kuehl e cols. 2001), não sendo encontrado o alelo T na população do HapMap. O loco rs2236225 do gene *MTHFD1* apresentou correlação positiva com a ancestralidade europeia e negativa com a africana. E para o loco rs1800462 do gene *TPMT* não existem informações genotípicas nas populações do HapMap, e apresentou correlação negativa baixa com a ancestralidade europeia. A baixa correlação encontrada com a ancestralidade indica que na população brasileira, mesmo em locos com diferentes frequências entre as populações, a ancestralidade geográfica não tem grande influência na frequência dos mesmos devido à intensa miscigenação da população. Nas populações MEX e ASW, miscigenadas assim como a população brasileira, também não foi encontrada correlação alta entre os locos e a ancestralidade. Os locos e ancestralidade em que foi encontrada correlação também variam entre as populações. Não é possível inferir os alelos nesses locos farmacogenéticos a partir da ancestralidade em nenhuma das populações estudadas.

Um exemplo de que alelos exclusivos de algumas populações podem ser encontrados em populações miscigenadas com predominância de outras populações é o estudo realizado por Suarez-Kurtz, 2005 com o gene *CYP2C9*. Esse gene é importante em estudos farmacogenéticos, sendo responsável pela inativação de drogas clinicamente importantes,

sendo um de seus polimorfismos, o *CYP2C9*5*, relatado como sendo encontrado somente em populações de origem africana (Kirchheiner e Brockmoller 2005; Suarez-Kurtz e cols. 2005). Mas nesse estudo esse polimorfismo foi encontrado em um indivíduo brasileiro que se autodenominou branco. A ancestralidade genômica dele revelou de 92% de contribuição europeia, 7,5% africana e 0,5% ameríndia. A análise dos irmãos e pais desse indivíduo revelaram que a contribuição africana nesse caso tem origem materna, e consequentemente o alelo *CYP2C9*5* também (Suarez-Kurtz e cols. 2005).

Nos locos onde foi possível ser feita a análise de DL foi encontrado DL somente em dois locos no gene *TPMT* e dois locos no gene *XDH* na população BRA, não sendo formados TagSNPs. Já na população europeia (CEU e TSI) foi encontrado DL em todos os genes em que foi possível ser feita a análise, e em nenhum gene nas populações africanas. O desequilíbrio de ligação deveria ser maior conforme a miscigenação entre as populações parentais, sendo mais comum em populações miscigenadas, assim como a brasileira. A miscigenação pode criar ou modificar correlações entre locos se as frequências alélicas diferem muito entre as populações que deram origem à miscigenada (Chakraborty e Weiss 1988). O padrão de DL varia em diferentes populações de diferentes regiões geográficas, mas mesmo entre populações pertencentes a uma mesma região geográfica existe diferença no padrão de DL, sendo bastante variável (Gu e cols. 2007; Liu e cols. 2004; Sawyer e cols. 2005). O DL médio nos locos estudados foi menor na população brasileira do que nas outras populações, exceto nas africanas. O DL da população brasileira pode ser um artifício da combinação de forças evolutivas e fatores demográficos. Na população latina foi encontrado menor desequilíbrio de ligação em populações com maior proporção de ancestralidade africana, enquanto populações com maior ancestralidade ameríndia apresentaram maior DL, e as populações com maior ancestralidade europeia um valor intermediário de DL, ficando entre as ameríndias e africanas (Bryc e cols. 2010). Na população do HapMap, as populações MEX e GIH que tem ancestralidade ameríndia apresentaram menor DL que as populações europeias. Nos locos estudados o maior DL foi encontrado na população europeia, seguido da MEX, GIH e asiáticas, a brasileira e por último as africanas, sem DL.

No presente trabalho foi abordado um estudo populacional de polimorfismos farmacogenéticos relacionados a resposta a drogas utilizadas no tratamento da LLA na população brasileira. A correlação entre os locos e ancestralidade é baixa, com suas frequências diferindo entre as populações, mesmo de uma mesma região geográfica. Os

resultados desse trabalho indicam que na população brasileira para se obter dados sobre esses polimorfismos farmacogenéticos os mesmos devem ser genotipados, não podendo ser inferidos a partir de outros dados como cor de pele e ancestralidade biogeográfica.

6.2. ANCESTRALIDADE E POLIMORFISMOS FARMACOGENÉTICOS EM CRIANÇAS COM LLA

Os marcadores informativos de ancestralidade retirados do trabalho de Lins (2010) permitem a determinação da ancestralidade individual dentre três populações: europeia, africana e ameríndia. No presente estudo a ancestralidade de 95 pacientes com LLA foi obtida utilizando 21 AIMs. Nos pacientes com LLA não foi encontrado nenhum loco em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. No trabalho de Lins (2007), utilizando 28 AIMs nas 200 amostras da população brasileira foram encontrados 16 locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Porém nesse estudo o valor significativo foi de $p > 0,05$, não sendo utilizada a correção de Bonferroni. Utilizando a correção o valor de p significativo seria de $p = 0,001$. Com esse valor de p seriam encontrados 5 locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste de Bonferroni deve ser aplicado quando são realizadas análises múltiplas. A cada 20 testes é esperado que um seja significativo com $p < 0,05$, como resultado a hipótese nula é rejeitada de forma inadequada (Hendrick 2005).

A ancestralidade encontrada em pacientes com LLA teve maior percentual de contribuição europeia, com 51,7%, seguido da africana com 32% e por último a ameríndia com 16,3%. A ancestralidade encontrada na população brasileira condiz com a encontrada em pacientes com LLA, com maior proporção de contribuição europeia e de acordo com a história da formação da população brasileira conforme discutido no item 6.1. Ao analisar cada região com os pacientes com LLA, observa-se que os mesmos tem frequência da ancestralidade africana e ameríndia mais próxima com a região Centro-Oeste, e ancestralidade europeia mais próxima com a da região Norte (Tabela 16). O Hospital de Apoio atende pacientes com LLA das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste, estando esse resultado de acordo com o esperado devido à origem dos pacientes.

A comparação loco a loco entre as populações mostrou maior diferenciação entre a população Sul e pacientes com LLA (18 locos) e menor diferenciação com a região Centro-Oeste (5 locos), isso devido ao fato das amostras serem provenientes principalmente da região Centro-Oeste. Considerando todos os locos os pacientes com LLA se diferenciam de todas as outras populações. A região Sul também se diferencia de todas as outras, conforme discutido no trabalho de Lins (2010). A diferenciação entre as populações encontrada considerando os pacientes com LLA foi maior (6,6%) do que a encontrada por Lins (2010) (4%). A amostra de pacientes tem tamanho menor (95 amostras) do que a da população brasileira (200 amostras).

A amostra de pacientes com LLA se diferencia em relação a ancestralidade da amostra da população brasileira. Essa amostra de pacientes é restrita quanto a sua origem, não representando todas as populações devido ao fato de serem atendidos no Hospital de Apoio de Brasília somente pacientes das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste.

Nos locos farmacogenéticos foram encontrados três locos monomórficos (rs1138272, rs1800462 e rs1800584) nos pacientes com LLA, porém sendo encontrados os dois alelos na amostra da população brasileira. Esses locos apresentaram frequência baixa na população brasileira dos alelos não encontrados nos pacientes com LLA, sendo a frequência para o loco rs1138272 o alelo T de 0,038, no loco rs1800462 o alelo G tem frequência de 0,038 e por fim o rs1800584 tem o alelo A com frequência de 0,023. Quando comparados os locos com as populações do HapMap o loco rs1138272 tem frequência baixa, não sendo encontrado o alelo T nas populações CHB e JPT (asiáticas) e nem na YRI (africana). Não existem dados disponíveis nas populações do HapMap para o loco rs1800462, e somente nas populações europeias para o loco rs1138272, tendo frequência baixa do alelo A nessas populações. Na população brasileira dois desses locos apresentaram correlação negativa baixa com a ancestralidade africana (locos rs1138272 e rs1800462, Tabela 10). O fato de um dos alelos não ter sido encontrado nesses locos pode ser devido ao tamanho amostral e maior ancestralidade africana nos pacientes com LLA em relação a população brasileira, apesar de pequena a correlação

A análise de variância considerando todos os locos entre a população LLA e BRA indicou que não há diferenciação entre as duas populações nos locos farmacogenéticos, com valor de $F_{st}=0,001$ e $p=0,108$. Quando feita a análise loco a loco, 2 dos locos monomórficos nos pacientes com LLA (rs1138272 e rs1800462) apresentaram valor de F_{st} significativo ($F_{st}=0,024$ e $p=0,013$ para ambos), sendo que os dois apresentaram a mesma frequência do alelo não encontrado na amostra de LLA (0,038), sendo a diferença encontrada entre as duas amostras baixa. Isso indica que em relação aos locos farmacogenéticos não há diferenciação entre os pacientes com LLA e a população brasileira, sendo os dados desses polimorfismos farmacogenéticos na população brasileira válidos para os pacientes com LLA, e possivelmente nenhum dos locos está ligado ao desenvolvimento da doença.

Os dados da correlação desses nove locos com a ancestralidade nos pacientes com LLA estão de acordo com os encontrados na população brasileira, com correlação baixa entre os locos e ancestralidade. Nos locos rs717620 e rs1800460 foi encontrada correlação positiva com a ancestralidade europeia nos pacientes com LLA e não foi encontrada na amostra BRA

(Tabela 22 e Tabela 10 respectivamente). Foi encontrada correlação negativa com a ancestralidade europeia e positiva com a ancestralidade africana no loco rs1695 em ambas as populações, porém a correlação é baixa. No loco rs2236225 não foi encontrada correlação nos pacientes, mas foi encontrada na amostra da população brasileira correlação muito baixa com a ancestralidade africana.

A comparação entre os dados da população brasileira e nos pacientes com LLA reforçam a ideia de que na população brasileira os alelos não podem ser inferidos a partir da ancestralidade. As duas populações diferem quanto aos locos dos AIMs, possuindo ancestralidade significativamente diferente. Porém ao analisar os dados dos locos farmacogenéticos não há diferença entre as populações, reforçando o discutido no item 6.1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen JC, Rosen G, Mehta BM, Horten B (1980) Leukoencephalopathy following high-dose iv methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue. *Cancer Treat Rep* 64: 1261-73
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67: 444-61
- Balaresque PL, Ballereau SJ, Jobling MA (2007) Challenges in human genetic diversity: demographic history and adaptation. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2: R134-9
- 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: 1545-51
- Barnholtz-Sloan JS, McEvoy B, Shriver MD, Rebbeck TR (2008) Ancestry estimation and correction for population stratification in molecular epidemiologic association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 471-7
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-5
- Bhatia S, Sather HN, Heerema NA, Trigg ME, Gaynon PS, Robison LL (2002) Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100: 1957-64
- Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC (2008) Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genet Mol Res* 7: 33-42
- Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H, Falcao RP, Teixeira-Vidigal PV, De Marco L (2003) Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *Pharmacogenomics* J 3: 178-82

- Botto LD, Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 151: 862-77
- Brettell TA, Butler JM, Almirall JR (2007) Forensic science. *Anal Chem* 79: 4365-84
- Bryc K, Auton A, Nelson MR, Oksenberg JR, Hauser SL, Williams S, Froment A, Bodo JM, Wambebe C, Tishkoff SA, Bustamante CD (2010) Genome-wide patterns of population structure and admixture in West Africans and African Americans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 786-91
- Canalle R, Burim RV, Tone LG, Takahashi CS (2004) Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environ Mol Mutagen* 43: 100-9
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 68: 281-6
- Chakraborty R, Weiss KM (1988) Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9119-23
- Cheok MH, Evans WE (2006) Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6: 117-29
- Cheok MH, Lugthart S, Evans WE (2006) Pharmacogenomics of acute leukemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 317-53
- Cheok MH, Pottier N, Kager L, Evans WE (2009) Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 46: 39-51
- Chiabai MA (2008) Genética da Pigmentação da pele em uma amostra da População Brasileira, Universidade Católica de Brasília
- Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA (2001) Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 825-31

- Davidson ML, Dalhoff K, Schmiegelow K (2008) Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 30: 831-49
- de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJ, Lindemans J, Peters GJ, Pieters R (2009) Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 113: 2284-9
- Drakaki A, Iliopoulos D (2009) MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis. *Curr Genomics* 10: 35-41
- Evans WE, Johnson JA (2001) Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 9-39
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47-50
- Franco RF, Simoes BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcao RP (2001) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 115: 616-8
- Frudakis T (2007) *Molecular Photofitting: Predicting Ancestry and Phenotype Using DNA* Elsevier Academy Press
- Frueh FW, Gurwitz D (2004) From pharmacogenetics to personalized medicine: a vital need for educating health professionals and the community. *Pharmacogenomics* 5: 571-9
- Gardiner SJ, Begg EJ (2006) Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev* 58: 521-90
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters

- WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoke B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 1239-48
- Gu S, Pakstis AJ, Li H, Speed WC, Kidd JR, Kidd KK (2007) Significant variation in haplotype block structure but conservation in tagSNP patterns among global populations. *Eur J Hum Genet* 15: 302-12
- Halder I, Shriver M, Thomas M, Fernandez JR, Frudakis T (2008) A panel of ancestry informative markers for estimating individual biogeographical ancestry and admixture from four continents: utility and applications. *Hum Mutat* 29: 648-58
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999) World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17: 3835-49
- Hendrick PW (2005) *Genetics of Populations*, 3rd ed. edn. Jones and Bartlett Publishers
- Henze G (2008) Early postinduction intensification therapy is essential in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Clin Pract Oncol* 5: 502-3
- Hutchinson RJ, Gaynon PS, Sather H, Bertolone SJ, Cooper HA, Tannous R, Wells LM, Heerema NA, Sailer S, Trigg ME (2003) Intensification of therapy for children with lower-risk acute lymphoblastic leukemia: long-term follow-up of patients treated on Children's Cancer Group Trial 1881. *J Clin Oncol* 21: 1790-7
- Jamroziak K, Robak T (2009) Inheritance and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 33: 889-90
- Jeha S, Pui CH (2009) Risk-adapted treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 23: 973-90, v
- Jobling MH, Mathew; Tyler-Smith, Chris (2004) *Human Evolutionary Genetics: Origins, Peoples e Disease*. Garland Science

- Jonsson OG, Kamen BA (1991) Methotrexate and childhood leukemia. *Cancer Invest* 9: 53-60
- Kalow W (2002) Pharmacogenetics and personalised medicine. *Fundam Clin Pharmacol* 16: 337-42
- Kirchheiner J, Brockmoller J (2005) Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 77: 1-16
- Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, Hijiya N, Rizzari C, Rosner GL, Frudakis T, Pui CH, Evans WE, Relling MV (2007) Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood* 109: 4151-7
- Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, Hudson M, Rubnitz J, Sandlund JT, Pui CH, Relling MV (2003) Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *J Clin Oncol* 21: 3084-91
- Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA (2009) Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 360: 753-64
- Kremer JM (2004) Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum* 50: 1370-82
- Kremer JM (2006) Methotrexate pharmacogenomics. *Ann Rheum Dis* 65: 1121-3
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 27: 383-91
- Lange BJ, Bostrom BC, Cherlow JM, Sensel MG, La MK, Rackoff W, Heerema NA, Wimmer RS, Trigg ME, Sather HN (2002) Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 99: 825-33

- Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, Ramachandran S, Cann HM, Barsh GS, Feldman M, Cavalli-Sforza LL, Myers RM (2008) Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science* 319: 1100-4
- Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW (2010a) Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* 22: 187-92
- Lins TC, Vieira RG, Grattapaglia D, Pereira RW (2010b) Allele and haplotype frequency distribution in PTPN22 gene across variable ethnic groups: Implications for genetic association studies for autoimmune diseases. *Autoimmunity* 43: 308-16
- Lins TCdL (2007) Impacto da miscigenação na aplicação do HapMap para a população brasileira avaliados nos genes PTPN22 e VDR . Universidade Catolica de Brasília
- Liu N, Sawyer SL, Mukherjee N, Pakstis AJ, Kidd JR, Kidd KK, Brookes AJ, Zhao H (2004) Haplotype block structures show significant variation among populations. *Genet Epidemiol* 27: 385-400
- Ma BB, Hui EP, Mok TS (2010) Population-based differences in treatment outcome following anticancer drug therapies. *Lancet Oncol* 11: 75-84
- Mao X, Bigham AW, Mei R, Gutierrez G, Weiss KM, Brutsaert TD, Leon-Velarde F, Moore LG, Vargas E, McKeigue PM, Shriver MD, Parra EJ (2007) A genomewide admixture mapping panel for Hispanic/Latino populations. *Am J Hum Genet* 80: 1171-8
- Meyer UA (2004) Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* 5: 669-76
- Mullighan CG (2009) Genomic analysis of acute leukemia. *Int J Lab Hematol* 31: 384-97
- Onciu M (2009) Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 23: 655-74
- Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, Forrester T, Allison DB, Deka R, Ferrell RE, Shriver MD (1998) Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet* 63: 1839-51

- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 177-82
- 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 (2007) A genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet* 80: 1024-36
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-59
- Pui CH, Evans WE (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354: 166-78
- Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350: 1535-48
- Pui CH, Robison LL, Look AT (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371: 1030-43
- Purcell S, Daly MJ, Sham PC (2007) WHAP: haplotype-based association analysis. *Bioinformatics* 23: 255-6
- Relethford JH (2008) Genetic evidence and the modern human origins debate. *Heredity* 100: 555-63
- Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH, Evans WE (1999) Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 91: 2001-8
- Ribeiro D (1995) *O Povo Brasileiro: Formação e Sentido do Brasil*. Companhia das Letras, São Paulo
- Rocha JC, Cheng C, Liu W, Kishi S, Das S, Cook EH, Sandlund JT, Rubnitz J, Ribeiro R, Campana D, Pui CH, Evans WE, Relling MV (2005) Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105: 4752-8

- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW (2002) Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381-5
- Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, Gallo CV, Pinto LF (2002) Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 1: 233-40
- Sadee W, Dai Z (2005) Pharmacogenetics/genomics and personalized medicine. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2: R207-14
- Sawyer SL, Mukherjee N, Pakstis AJ, Feuk L, Kidd JR, Brookes AJ, Kidd KK (2005) Linkage disequilibrium patterns vary substantially among populations. *Eur J Hum Genet* 13: 677-86
- Scotch C, Haferlach T, Haase D, et al (2001) Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Cancer* 112: 118
- Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, Pfaff C, Jones C, Massac A, Cameron N, Baron A, Jackson T, Argyropoulos G, Jin L, Hoggart CJ, McKeigue PM, Kittles RA (2003) Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet* 112: 387-99
- Silva MR, de Oliveira BM, Viana MB, Murao M, Romanha AJ (2008) Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) gene polymorphism in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: association with clinical and laboratory data. *Ther Drug Monit* 30: 700-4
- Smith MW, Lautenberger JA, Shin HD, Chretien JP, Shrestha S, Gilbert DA, O'Brien SJ (2001) Markers for mapping by admixture linkage disequilibrium in African American and Hispanic populations. *Am J Hum Genet* 69: 1080-94
- Sobrinho B, Brion M, Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 154: 181-94
- Stringer C (2002) Modern human origins: progress and prospects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357: 563-79

- Suarez-Kurtz G (2005) Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci* 26: 196-201
- Suarez-Kurtz G, Vianna-Jorge R, Perini JA, Pena SD (2005) Detection of CYP2C9*5 in a white Brazilian subject. *Clin Pharmacol Ther* 77: 587-8
- Tang H, Quertermous T, Rodriguez B, Kardia SL, Zhu X, Brown A, Pankow JS, Province MA, Hunt SC, Boerwinkle E, Schork NJ, Risch NJ (2005) Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. *Am J Hum Genet* 76: 268-75
- Tian H, Cronstein BN (2007) Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65: 168-73
- Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM, Potter JD (2001) Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood* 98: 231-4
- van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, de Boo TM, van de Putte LB (2001) The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 44: 2525-30
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19: 275-80
- Winick NJ, Bowman WP, Kamen BA, Roach ES, Rollins N, Jacaruso D, Buchanan GR (1992) Unexpected acute neurologic toxicity in the treatment of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 84: 252-6
- Zanrosso CW, Hatagima A, Emerenciano M, Ramos F, Figueiredo A, Felix TM, Segal SL, Giuliani R, Muniz MT, Pombo-de-Oliveira MS (2006) The role of

methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. *Leuk Res* 30: 477-81

APÊNDICE

Apêndice 1: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1801133.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	<0,01	0,471	0,006	1	<0,01	0,755	<0,01	0,050	<0,01	0,009	<0,01
ASW	0,095	-	<0,01	<0,01	<0,01	0,482	<0,01	0,195	<0,01	0,083	<0,01	0,246
CEU	-0,001	0,078	-	<0,01	0,679	<0,01	0,362	<0,01	0,020	<0,01	0,001	<0,01
CHB	0,031	0,231	0,046	-	0,013	<0,01	0,033	<0,01	0,513	<0,01	0,849	<0,01
CHD	-0,004	0,101	-0,003	0,031	-	<0,01	0,744	<0,01	0,093	<0,01	0,039	<0,01
GIH	0,067	-0,002	0,051	0,189	0,069	-	<0,01	0,019	<0,01	0,005	<0,01	0,022
JPT	-0,004	0,118	-0,001	0,021	-0,005	0,083	-	<0,01	0,155	<0,01	0,066	<0,01
LWK	0,151	0,007	0,133	0,312	0,169	0,024	0,189	-	<0,01	1	<0,01	0,718
MEX	0,013	0,191	0,024	-0,003	0,012	0,150	0,005	0,272	-	<0,01	0,668	<0,01
MKK	0,175	0,011	0,157	0,361	0,203	0,031	0,225	-0,004	0,318	-	<0,01	0,618
TSI	0,024	0,213	0,037	-0,005	0,023	0,173	0,015	0,292	-0,005	0,339	-	<0,01
YRI	0,154	0,003	0,136	0,367	0,175	0,019	0,196	-0,004	0,287	-0,002	0,309	-

Apêndice 2: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1801131.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,010	0,152	0,212	0,152	0,009	0,040	0,019	0,067	0,684	0,326	<0,01
ASW	0,027	-	<0,01	0,251	0,375	<0,01	0,790	0,787	0,545	0,030	0,001	0,092
CEU	0,004	0,059	-	0,006	0,006	0,180	0,002	<0,01	0,004	0,069	0,838	<0,01
CHB	0,004	0,002	0,024	-	0,892	<0,01	0,481	0,446	0,578	0,329	0,065	0,043
CHD	0,007	<0,001	0,029	-0,006	-	0,001	0,584	0,611	0,791	0,289	0,042	0,005
GIH	0,026	0,110	0,004	0,061	0,069	-	<0,01	<0,01	<0,01	0,005	0,206	<0,01
JPT	0,018	-0,005	0,046	-0,002	-0,004	0,093	-	1	0,867	0,083	0,009	0,036
LWK	0,019	-0,005	0,048	-0,002	-0,003	0,096	-0,006	-	0,898	0,057	0,004	0,055
MEX	0,013	-0,004	0,039	-0,004	-0,005	0,083	-0,006	-0,006	-	0,125	0,020	0,019
MKK	-0,002	0,020	0,008	<0,001	0,003	0,034	0,012	0,013	0,008	-	0,255	<0,01
TSI	<0,001	0,053	-0,004	0,018	0,023	0,006	0,040	0,042	0,033	0,003	-	<0,01
YRI	0,077	0,009	0,125	0,043	0,033	0,204	0,017	0,016	0,022	0,067	0,125	-

Apêndice 3: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1695.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,005	0,131	<0,01	<0,01	0,771	<0,01	<0,01	<0,01	0,470	0,409	0,089
ASW	0,030	-	0,095	<0,01	<0,01	0,012	<0,01	0,485	0,160	0,036	0,001	0,160
CEU	0,004	0,006	-	<0,01	<0,01	0,145	<0,01	0,015	0,006	0,453	0,036	0,842
CHB	0,050	0,157	0,088	-	0,763	0,002	0,009	<0,01	<0,01	<0,01	0,018	<0,01
CHD	0,039	0,140	0,075	-0,005	-	0,006	0,002	<0,01	<0,01	0,001	0,031	<0,01
GIH	-0,004	0,035	0,005	0,043	0,033	-	<0,01	0,001	<0,01	0,388	0,729	0,107
JPT	0,142	0,296	0,195	0,033	0,043	0,149	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
LWK	0,050	-0,003	0,019	0,191	0,173	0,056	0,331	-	0,501	0,002	<0,01	0,027
MEX	0,078	0,005	0,039	0,236	0,216	0,085	0,384	-0,003	-	0,001	0,001	0,009
MKK	-0,001	0,017	-0,001	0,067	0,055	-0,001	0,168	0,034	0,058	-	0,179	0,353
TSI	-0,001	0,049	0,013	0,030	0,021	-0,005	0,128	0,073	0,105	0,004	-	0,030
YRI	0,005	0,004	-0,003	0,088	0,080	0,007	0,202	0,016	0,035	<0,001	0,016	-

Apêndice 4: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1051266.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	1	0,325	0,703	0,791	0,061	0,136	<0,01	0,008	<0,01	0,541	<0,01
ASW	-0,004	-	0,424	0,747	0,828	0,076	0,164	<0,01	0,022	<0,01	0,587	<0,01
CEU	0,000	-0,001	-	0,220	0,624	0,268	0,013	<0,01	0,061	<0,01	0,918	<0,01
CHB	-0,003	-0,005	0,002	-	0,544	0,039	0,347	<0,01	0,014	<0,01	0,417	<0,01
CHD	-0,004	-0,005	-0,003	-0,003	-	0,163	0,093	<0,01	0,033	<0,01	0,840	<0,01
GIH	0,011	0,011	0,001	0,018	0,005	-	0,003	<0,01	0,487	<0,01	0,327	<0,01
JPT	0,008	0,006	0,022	0,001	0,012	0,048	-	<0,01	0,001	<0,01	0,035	0,002
LWK	0,123	0,125	0,159	0,109	0,141	0,214	0,064	-	<0,01	0,331	<0,01	0,429
MEX	0,029	0,029	0,012	0,039	0,020	-0,002	0,077	0,261	-	<0,01	0,097	<0,01
MKK	0,170	0,177	0,210	0,159	0,195	0,273	0,105	0,000	0,321	-	<0,01	0,031
TSI	-0,002	-0,004	-0,004	-0,001	-0,005	0,001	0,018	0,156	0,014	0,211	-	<0,01
YRI	0,093	0,093	0,125	0,082	0,107	0,175	0,039	-0,001	0,218	0,012	0,121	-

Apêndice 5: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1138272. *= loco monomórfico para as populações

	BRA	ASW	CEU	CHB	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,495	0,001	0,087	0,012	0,097	0,140	0,044	0,430	0,186	0,008
ASW	-0,002	-	0,005	0,302	0,009	0,321	0,439	0,041	1	0,097	0,055
CEU	0,024	0,032	-	0,003	1	0,005	<0,01	0,873	<0,01	0,235	<0,01
CHB	0,016	0,009	0,0542	-	0,002	*	0,532	0,006	0,2209	0,012	mono
GIH	0,024	0,034	-0,004	0,061	-	0,002	0,001	0,842	0,001	0,405	<0,01
JPT	0,016	0,010	0,055	*	0,061	-	0,556	0,009	0,222	0,019	mono
LWK	0,008	-0,001	0,051	-0,001	0,059	<0,001	-	0,005	0,332	0,004	0,505
MEX	0,018	0,029	-0,004	0,058	-0,006	0,059	0,055	-	0,006	0,547	<0,01
MKK	-0,001	-0,004	0,037	0,009	0,040	0,009	0,001	0,034	-	0,041	0,031
TSI	0,003	0,012	0,002	0,039	<0,001	0,039	0,031	-0,003	0,013	-	<0,01
YRI	0,024	0,019	0,070	*	0,087	*	0,006	0,085	0,016	0,058	-

Apêndice 6: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs717620.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	<0,01	0,685	0,457	0,531	0,001	0,917	<0,01	0,105	<0,01	0,600	<0,01
ASW	0,068	-	<0,01	<0,01	0,001	0,347	0,001	0,225	<0,01	1	<0,01	0,634
CEU	-0,002	0,080	-	0,728	0,832	<0,01	0,913	<0,01	0,214	<0,01	0,916	<0,01
CHB	-0,001	0,108	-0,004	-	1	<0,01	0,711	<0,01	0,485	<0,01	0,892	<0,01
CHD	-0,002	0,103	-0,004	-0,006	-	<0,01	0,804	<0,01	0,427	<0,01	1	<0,01
GIH	0,043	<0,001	0,052	0,072	0,067	-	0,006	0,025	<0,01	0,319	0,001	0,069
JPT	-0,004	0,087	-0,004	-0,004	-0,005	0,053	-	<0,01	0,283	<0,01	0,766	<0,01
LWK	0,103	0,004	0,118	0,161	0,155	0,023	0,137	-	<0,01	0,183	<0,01	0,430
MEX	0,007	0,143	0,003	-0,003	-0,002	0,103	0,003	0,201	-	<0,01	0,418	<0,01
MKK	0,079	-0,004	0,094	0,131	0,124	0,001	0,104	0,006	0,173	-	<0,01	0,438
TSI	-0,003	0,098	-0,004	-0,006	-0,006	0,063	-0,005	0,149	-0,001	0,118	-	<0,01
YRI	0,099	-0,003	0,116	0,202	0,156	0,011	0,135	-0,001	0,209	-0,001	0,149	-

Apêndice 7: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs11545078.

	BRA	ASW	CHD	GIH	JPT	LWK	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,867	1	<0,01	0,005	1	0,659	0,731	0,411
ASW	-0,004	-	1	0,002	0,020	0,824	1	0,519	0,380
CHD	-0,004	-0,006	-	0,007	0,044	1	0,843	0,658	0,494
GIH	0,055	0,054	0,048	-	0,419	0,003	<0,01	0,019	0,005
JPT	0,024	0,026	0,021	-0,001	-	0,049	0,003	0,112	0,077
LWK	-0,004	-0,006	-0,006	0,046	0,020	-	0,828	0,676	0,499
MKK	-0,002	-0,005	-0,004	0,066	0,033	-0,004	-	0,446	0,214
TSI	-0,003	-0,003	-0,004	0,033	0,010	-0,005	-0,001	-	0,858
YRI	-0,001	0,000	-0,002	0,032	0,009	-0,002	0,002	-0,004	-

Apêndice 8: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs2236225.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	<0,01	0,624	<0,01	<0,01	0,197	<0,01	<0,01	<0,01	0,192	0,799	<0,01
ASW	0,093	-	<0,01	1	0,743	<0,01	0,179	0,585	<0,01	<0,01	<0,01	0,681
CEU	-0,002	0,080	-	<0,01	<0,01	0,111	0,005	0,002	<0,01	0,500	0,928	<0,01
CHB	0,093	-0,006	0,080	-	0,755	<0,01	0,181	0,584	<0,01	<0,01	<0,01	0,622
CHD	0,110	-0,005	0,096	-0,005	-	<0,01	0,084	0,257	<0,01	<0,01	<0,01	1
GIH	0,002	0,147	0,007	0,147	0,168	-	<0,01	<0,01	0,027	0,020	0,269	<0,01
JPT	0,046	0,005	0,035	0,005	0,012	0,084	-	0,564	<0,01	0,009	0,006	0,046
LWK	0,070	-0,003	0,058	-0,003	0,001	0,117	-0,003	-	<0,01	0,001	<0,01	0,234
MEX	0,055	0,273	0,068	0,273	0,298	0,023	0,196	0,238	-	<0,01	0,002	<0,01
MKK	0,002	0,062	-0,002	0,062	0,076	0,016	0,022	0,042	0,089	-	0,484	<0,01
TSI	-0,004	0,088	-0,004	0,088	0,106	0,004	0,038	0,063	0,063	-0,002	-	<0,01
YRI	0,117	-0,004	0,102	-0,003	-0,005	0,179	0,014	0,002	0,313	0,081	0,113	-

Apêndice 9: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1142345.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,146	0,270	0,042	0,403	0,235	0,124	0,003	0,240	0,096	0,027	0,757
ASW	0,007	-	0,016	<0,01	0,035	0,019	0,007	0,398	0,847	0,001	<0,01	0,093
CEU	0,001	0,027	-	0,098	1	0,763	0,573	0,001	0,036	0,631	0,099	0,569
CHB	0,022	0,064	0,009	-	0,193	0,365	0,637	<0,01	0,002	0,290	1	0,044
CHD	0,000	0,022	-0,004	0,010	-	0,762	0,520	0,003	0,106	0,763	0,093	0,628
GIH	0,004	0,032	-0,003	0,004	-0,005	-	1	<0,01	0,039	1	0,355	0,389
JPT	0,008	0,040	-0,001	0,000	-0,003	-0,005	-	<0,01	0,017	0,761	0,348	0,246
LWK	0,033	<0,001	0,061	0,095	0,050	0,062	0,071	-	0,288	<0,01	<0,01	0,004
MEX	0,004	-0,006	0,021	0,059	0,017	0,027	0,035	0,003	-	0,0108	<0,01	0,159
MKK	0,006	0,039	-0,002	0,004	-0,004	-0,004	-0,004	0,077	0,033	-	0,181	0,239
TSI	0,022	0,066	0,010	-0,006	0,011	0,005	<0,001	0,098	0,061	0,005	-	0,045
YRI	-0,002	0,012	-0,001	0,016	-0,002	0,001	0,005	0,040	0,008	0,002	0,018	-

Apêndice 10: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1800584.

	BRA	CEU	TSI
BRA	-	0,147	0,195
CEU	0,006	-	1
TSI	0,004	-0,004	-

Apêndice 11: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs1122608.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	<0,01	0,208	0,001	<0,01	0,341	0,004	<0,01	0,561	<0,01	0,199	<0,01
ASW	0,101	-	<0,01	0,061	0,155	<0,01	0,017	1	<0,01	0,359	<0,01	0,026
CEU	0,003	0,139	-	<0,01	<0,01	1	<0,01	<0,01	0,151	<0,01	0,830	<0,01
CHB	0,038	0,025	0,067	-	0,548	0,001	1	0,022	0,050	0,128	<0,01	<0,01
CHD	0,055	0,011	0,087	-0,004	-	<0,01	0,546	0,097	0,009	0,438	<0,01	0,001
GIH	0,001	0,163	-0,004	0,072	0,097	-	0,001	<0,01	0,202	<0,01	0,896	<0,01
JPT	0,035	0,028	0,063	-0,006	-0,003	0,068	-	0,011	0,056	0,084	<0,01	<0,01
LWK	0,106	-0,006	0,146	0,029	0,014	0,172	0,032	-	<0,01	0,240	<0,01	0,060
MEX	-0,003	0,105	0,007	0,026	0,045	0,006	0,023	0,113	-	<0,01	0,121	<0,01
MKK	0,091	<0,001	0,134	0,009	<0,001	0,158	0,011	0,002	0,088	-	<0,01	0,002
TSI	0,004	0,174	-0,004	0,082	0,107	-0,005	0,077	0,184	0,010	0,171	-	<0,01
YRI	0,149	0,026	0,192	0,130	0,067	0,236	0,090	0,022	0,182	0,034	0,248	-

Apêndice 12: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs10821936.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	<0,01	0,129	0,262	0,780	<0,01	0,254	<0,01	0,515	<0,01	0,640	<0,01
ASW	0,068	-	0,003	0,010	<0,01	<0,01	0,008	0,787	<0,01	0,916	<0,01	0,826
CEU	0,004	0,034	-	1	0,123	<0,01	1	0,002	0,616	0,001	0,063	0,008
CHB	0,002	0,037	-0,004	-	0,247	<0,01	1	0,001	0,726	0,006	0,150	0,010
CHD	-0,004	0,082	0,006	0,003	-	<0,01	0,222	<0,01	0,474	<0,01	0,917	<0,01
GIH	0,101	0,299	0,154	0,147	0,088	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
JPT	0,002	0,036	-0,004	-0,006	0,004	0,149	-	0,001	0,704	0,008	0,161	0,024
LWK	0,081	-0,005	0,045	0,048	0,098	0,322	0,047	-	<0,01	0,642	<0,01	0,627
MEX	-0,003	0,051	-0,003	-0,005	-0,002	0,125	-0,005	0,065	-	0,004	0,338	0,010
MKK	0,069	-0,004	0,034	0,036	0,084	0,308	0,035	-0,003	0,051	-	<0,01	0,900
TSI	-0,003	0,090	0,010	0,007	-0,006	0,079	0,007	0,107	0,000	0,093	-	<0,01
YRI	0,059	-0,005	0,027	0,032	0,071	0,284	0,028	-0,003	0,042	-0,004	0,079	-

Apêndice 13: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs7270101. *= loco monomórfico para as populações

	BRA	CEU	CHB	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,187	<0,01	<0,01	0,001	0,459	0,014	1	0,163	0,065
CEU	0,002	-	0,001	<0,01	0,001	0,894	0,090	0,156	0,737	0,611
CHB	0,092	0,070	-	0,271	*	0,002	0,015	<0,01	<0,01	<0,01
GIH	0,067	0,043	0,013	-	0,286	0,003	0,231	<0,01	0,007	0,006
JPT	0,091	0,070	*	0,013	-	<0,01	0,014	0,001	0,002	<0,01
LWK	-0,001	-0,004	0,087	0,056	0,086	-	0,112	0,329	0,622	0,557
MEX	0,028	0,009	0,044	0,009	0,043	0,013	-	0,003	0,213	0,211
MKK	-0,003	0,003	0,096	0,071	0,095	-0,001	0,029	-	0,130	0,072
TSI	0,005	-0,004	0,072	0,038	0,071	-0,004	0,003	0,006	-	1
YRI	0,007	-0,002	0,055	0,033	0,060	-0,002	0,004	0,008	-0,004	-

Apêndice 14: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs17323225.

	BRA	ASW	CEU	CHB	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,271	0,837	0,121	0,263	0,125	0,228	0,109	0,026	0,503	0,007
ASW	0,002	-	0,332	0,635	1	0,543	1	1	0,619	0,168	0,239
CEU	-0,003	0,001	-	0,173	0,359	0,199	0,337	0,177	0,040	0,366	0,011
CHB	0,009	-0,004	0,007	-	1	1	1	1	1	0,104	1
GIH	0,003	-0,006	0,002	-0,004	-	0,565	1	1	0,608	0,177	0,533
JPT	0,012	<0,001	0,010	-0,004	<0,001	-	0,552	1	1	0,127	1
LWK	0,004	-0,006	0,002	-0,004	-0,006	<0,001	-	1	0,632	0,113	0,553
MEX	0,008	-0,005	0,006	-0,006	-0,005	-0,004	-0,005	-	1	0,104	1
MKK	0,013	-0,002	0,011	-0,004	-0,002	-0,004	-0,002	-0,005	-	0,011	1
TSI	-0,001	0,014	0,001	0,024	0,015	0,026	0,016	0,022	0,036	-	0,007
YRI	0,018	0,002	0,017	-0,003	0,002	-0,005	0,001	-0,003	-0,002	0,046	-

Apêndice 15: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs17011368. *= loco monomórfico para as populações

	BRA	ASW	CEU	CHB	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,001	0,137	0,025	0,017	0,039	< 0,01	0,010	< 0,01	0,557	0,001
ASW	0,040	-	< 0,01	0,001	< 0,01	< 0,01	0,633	< 0,01	0,283	0,005	0,761
CEU	0,003	0,078	-	0,123	0,243	0,110	< 0,01	0,179	< 0,01	0,626	< 0,01
CHB	0,026	0,098	0,013	-	0,557	*	< 0,01	1	< 0,01	0,154	< 0,01
GIH	0,018	0,101	0,003	<0,001	-	0,559	< 0,01	1	< 0,01	0,201	0,001
JPT	0,026	0,098	0,013	*	<0,001	-	< 0,01	1	< 0,01	0,148	0,002
LWK	0,062	-0,004	0,103	0,114	0,121	0,114	-	< 0,01	0,704	< 0,01	0,274
MEX	0,023	0,107	0,008	-0,004	-0,005	-0,004	0,126	-	< 0,01	0,117	< 0,01
MKK	0,067	0,001	0,099	0,108	0,111	0,108	-0,004	0,114	-	< 0,01	0,096
TSI	-0,002	0,048	-0,003	0,022	0,010	0,022	0,068	0,017	0,070	-	0,005
YRI	0,027	-0,004	0,053	0,066	0,071	0,073	0,001	0,075	0,007	0,033	-

Apêndice 16: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs852977.

	BRA	ASW	CEU	CHB	CHD	GIH	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,089	0,190	< 0,01	< 0,01	0,030	< 0,01	0,022	0,055	0,279	0,096	0,302
ASW	0,009	-	0,567	< 0,01	< 0,01	0,003	< 0,01	0,770	0,002	0,457	1	0,437
CEU	0,002	-0,003	-	< 0,01	< 0,01	0,002	< 0,01	0,310	0,002	0,797	0,621	0,820
CHB	0,083	0,163	0,123	-	0,431	0,032	0,572	< 0,01	0,023	< 0,01	< 0,01	< 0,01
CHD	0,052	0,118	0,087	<0,001	-	0,185	0,136	< 0,01	0,198	< 0,01	< 0,01	< 0,01
GIH	0,018	0,064	0,043	0,024	0,004	-	0,008	< 0,01	0,886	0,006	< 0,01	0,007
JPT	0,104	0,195	0,147	-0,004	0,009	0,042	-	< 0,01	0,001	< 0,01	< 0,01	< 0,01
LWK	0,018	-0,005	0,001	0,183	0,137	0,080	0,214	-	0,003	0,184	0,640	0,171
MEX	0,014	0,056	0,037	0,029	0,007	-0,006	0,048	0,072	-	0,009	0,003	0,008
MKK	<0,001	-0,001	-0,003	0,112	0,078	0,036	0,136	0,004	0,031	-	0,437	1
TSI	0,008	-0,006	-0,003	0,159	0,114	0,061	0,189	-0,004	0,054	-0,001	-	0,446
YRI	0,001	-0,001	-0,003	0,105	0,079	0,037	0,138	0,004	0,032	-0,003	-0,002	-

Apêndice 17: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs10264272.

	BRA	ASW	CEU	CHB	JPT	LWK	MEX	MKK	TSI	YRI
BRA	-	0,002	0,064	0,160	0,141	<0,01	1	<0,01	0,149	<0,01
ASW	0,040	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,016	0,123	<0,01	0,037
CEU	0,016	0,088	-	0,497	0,482	<0,01	0,042	<0,01	0,502	<0,01
CHB	0,007	0,070	<0,001	-	1	<0,01	0,199	<0,01	1,000	<0,01
JPT	0,007	0,070	<0,001	-0,006	-	<0,01	0,191	<0,01	1,000	<0,01
LWK	0,241	0,080	0,245	0,225	0,226	-	<0,01	0,002	<0,01	0,025
MEX	-0,005	0,030	0,023	0,007	0,007	0,176	-	0,001	0,208	<0,01
MKK	0,081	0,007	0,107	0,094	0,095	0,036	0,062	-	<0,01	0,408
TSI	0,008	0,072	<0,001	-0,006	-0,006	0,230	0,008	0,096	-	<0,01
YRI	0,106	0,018	0,128	0,099	0,115	0,019	0,081	-0,001	0,117	-

Apêndice 18: Matriz do Fst e p entre as populações comparadas par a par para o loco rs4986913. *= loco monomórfico para as populações

	BRA	CEU	CHB	JPT	MEX	YRI
BRA	-	*	0,314	*	0,295	*
CEU	*	-	0,454	*	0,433	*
CHB	0,005	<0,001	-	1	1	0,330
JPT	*	*	-0,004	-	1	*
MEX	0,007	0,001	-0,006	-0,004	-	0,479
YRI	*	*	0,005	*	0,001	-

Apêndice 19: Valores de Fst e p entre as populações das regiões geopolíticas brasileiras, CO e as outras populações.

Loco	N		NE		S		SE	
	Fst	p	Fst	p	Fst	p	Fst	p
rs1801133	0,010	0,234	0,052	0,021	-0,003	0,474	-0,013	1,000
rs1801131	0,004	0,312	0,012	0,259	-0,001	0,435	0,040	0,062
rs1695	0,036	0,048	0,028	0,053	0,009	0,204	-0,011	0,858
rs1051266	-0,010	0,646	0,003	0,370	-0,013	1,000	-0,010	0,606
rs1138272	0,000	0,619	0,000	0,602	0,009	0,352	-0,013	1,000
rs717620	0,002	0,363	-0,005	0,551	-0,012	1,000	-0,012	1,000
rs11545078	-0,013	1,000	0,038	0,065	0,009	0,342	-0,006	0,708
rs2236225	-0,011	0,847	0,003	0,298	0,026	0,056	-0,007	0,585
rs1800462	-0,013	1,000	0,012	0,196	0,058	0,051	-0,013	1,000
rs1800460	0,022	0,194	-0,013	1,000	0,000	1,000	0,011	0,348
rs1142345	-0,011	0,830	0,010	0,223	0,078	0,020	0,009	0,348
rs1800584	0,013	0,505	0,013	0,496	0,004	0,461	-0,013	1,000
rs1122608	-0,011	0,867	-0,008	0,711	-0,013	1,000	-0,001	0,523
rs10821936	0,003	0,344	-0,010	0,728	-0,008	0,601	-0,007	0,611
rs7270101	-0,013	1,000	-0,011	0,802	-0,013	1,000	0,025	0,130
rs17323225	-0,003	0,423	-0,011	0,725	0,040	0,044	-0,011	0,720
rs17011368	0,001	0,485	0,001	0,492	0,034	0,098	-0,009	0,786
rs852977	0,005	0,323	-0,013	1,000	-0,009	0,729	-0,009	0,675
rs10264272	-0,010	1,000	0,013	0,489	-0,013	1,000	-0,004	0,752

Apêndice 20: Valores de Fst e p entre as populações das regiões geopolíticas brasileiras, N e as outras populações. *=loco monomórfico para as populações.

Loco	NE		S		SE	
	Fst	p	Fst	p	Fst	p
rs1801133	-0,001	0,366	-0,010	0,712	0,006	0,194
rs1801131	-0,012	0,854	-0,012	1,000	-0,002	0,521
rs1695	-0,012	1,000	-0,007	0,604	0,022	0,152
rs1051266	-0,008	0,587	-0,008	0,640	-0,013	1,000
rs1138272	-0,013	1,000	0,046	0,103	0,000	0,623
rs717620	0,030	0,125	0,008	0,242	-0,003	0,461
rs11545078	0,038	0,053	0,009	0,322	-0,006	0,694
rs2236225	-0,005	0,517	0,013	0,191	-0,011	0,884
rs1800462	0,012	0,196	0,058	0,044	-0,013	1,000
rs1800460	0,022	0,205	0,051	0,059	-0,011	1,000
rs1142345	0,001	0,550	0,062	0,067	0,000	0,516
rs1800584	*		0,051	0,055	0,013	0,476
rs1122608	0,001	0,412	-0,012	0,856	-0,009	0,737
rs10821936	-0,007	0,551	-0,009	0,667	0,028	0,149
rs7270101	-0,011	0,812	-0,013	1,000	0,025	0,129
rs17323225	-0,010	1,000	0,013	0,516	-0,010	1,000
rs17011368	-0,013	1,000	0,000	0,600	0,018	0,186
rs852977	0,005	0,339	0,025	0,129	-0,007	0,640
rs10264272	0,025	0,249	-0,010	1,000	-0,011	1,000

Apêndice 21: Valores de Fst e p entre as populações das regiões geopolíticas brasileiras.

Loco	NE e S		NE e SE		S e SE	
	Fst	p	Fst	p	Fst	p
rs1801133	0,014	0,124	0,045	0,017	-0,006	0,448
rs1801131	-0,010	0,737	-0,007	0,630	0,002	0,365
rs1695	-0,009	0,717	0,015	0,183	0,000	0,426
rs1051266	0,008	0,343	-0,008	0,517	-0,008	0,612
rs1138272	0,046	0,091	0,000	0,627	0,009	0,382
rs717620	-0,009	0,718	-0,001	0,455	-0,011	0,839
rs11545078	-0,005	0,558	0,010	0,243	-0,008	0,751
rs2236225	-0,008	0,652	-0,010	0,747	0,003	0,340
rs1800462	0,004	0,390	0,012	0,219	0,058	0,050
rs1800460	0,000	1,000	0,011	0,373	0,038	0,105
rs1142345	0,025	0,261	-0,013	1,000	0,026	0,230
rs1800584	0,051	0,054	0,013	0,524	0,004	0,401
rs1122608	-0,006	0,566	0,019	0,200	-0,003	0,479
rs10821936	-0,013	1,000	0,003	0,331	0,008	0,253
rs7270101	-0,012	0,805	0,010	0,229	0,022	0,172
rs17323225	0,025	0,246	-0,013	1,000	0,025	0,244
rs17011368	0,000	0,603	0,018	0,196	0,058	0,030
rs852977	-0,009	0,715	-0,009	0,686	0,002	0,315
rs10264272	0,013	0,486	0,038	0,244	-0,004	0,752

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)