

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES *D6S2874*, *D6S273*, *D6S2792*, *STR_MICA* E
HLABC-2CA DA REGIÃO MHC EM UMA AMOSTRA DE AFRO-
DESCENDENTES DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de concentração de Genética do Programa de Pós-Graduação em Genética, do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo.

Mestrando: Ivan Luiz dos Santos

**Curitiba
2009**

IVAN LUIZ DOS SANTOS

**ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES *D6S2874, D6S273, D6S2792, STR_MICA* E
HLABC-2CA DA REGIÃO MHC EM UMA AMOSTRA DE AFRO-
DESCENDENTES DOADORES VOLUNTÁRIOS DE MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de concentração de Genética do Programa de Pós-Graduação em Genética, do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo.

**Curitiba
2009**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Santos, Ivan Luiz dos

Análise dos microssatélites D6S2874, D6S273, D6S2792, STR_MICA e HLABC-2CA da região MHC em uma amostra de afro-descendentes doadores voluntários de medula óssea. / Ivan Luiz dos Santos. – Curitiba, 2009.

80 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética de populações 2. Medula ossea I. Título II. Roxo, Valéria Maria Munhoz Sperandio III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **IVAN LUIZ SANTOS** para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito “B”.

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de Maio de 2009.

Professor Doutor Valéria M. M. Sperandio Roxo - UFPR
Orientadora e Presidente da Banca

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza - UFPR
Membro Titular

Professor Doutor Fabiana Poerner – LIGH – FUNPAR - UFPR
Membro Titular

Professora Doutora Lupe Furtado Alle - UFPR
Membro Titular

Visto:

Profª Drª Maria Luiza Petzl-Erler
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

*A minha família, a minha
namorada Elenir Burtuli, e a
inesquecível Leolina de Carvalho
Nunes (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra. Valéria Sperandio Roxo, por toda atenção e dedicação, e paciência por todo o período do mestrado.

Aos professores do Departamento de Genética, que foram tão importantes em transmitir todos os ensinamentos.

Ao Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Paraná pelo suporte a todas as pesquisas desenvolvidas, a todos os funcionários pelo suporte técnico, pelos momentos de distração, por estes dois fantásticos anos.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, que conquistei e fui conquistado neste período. Em especial ao Marcio, Clineu, André Testoni, Marcos, Rodrigo, Gustavo, Rafael Vargas e Joandrei.

A todos que de certa forma contribuíram para produção deste trabalho, sugerindo, comentando, corrigindo, lendo. Em especial a Marcia Beltrame, Liana, Sarah, Giovana e ao Alessandro, que foram importantes nas sugestões e no auxílio às leituras dos resultados.

Agradecimento especial a Carolina Sens, por ter dedicado tanto tempo de seus afazeres a me ensinar, ajudar, explicar, escrever e sugerir. Este trabalho também é seu.

Ao Professor Dr. Ricardo Lethonen R. De Souza, Professora Dra. Lupe Furtado Alle e a Dra. Fabiana Poerner por terem aceitado o convite para compor a banca de avaliação

Agradecimento especial a minha namorada Elenir Burtuli, e a toda minha família, que são as pessoas mais importantes para mim. Sinto falta de todos. Obrigado por existirem...

Eu amo vocês.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	IX
Lista de Gráficos e Quadros	XI
Lista de Abreviações	XII
Resumo	XIII
Abstract	XIV
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. MHC	2
2.2. Estrutura do MHC	4
2.2.1. MHC de Classe I	5
2.2.2. MHC de Classe II	6
2.2.3. MHC de Classe III	8
2.3. Polimorfismo de MHC	9
2.4. Sistema HLA e Transplantes	11
2.5. Microssatélites	12
2.5.1. Microssatélites e Desequilíbrio de Ligação	15
2.5.2. Microssatélites para Estudo	18
3. Objetivos	20
2.1. Objetivos Gerais	20
2.2. Objetivos Específicos	20
4. Justificativas	21
5. Materiais e Métodos	22
5.1. Caracterização das Amostras	22
5.2. Extração do DNA	22
5.3. Medida de Concentração do DNA	22
5.4. Tipagem dos Lócos <i>HLA-A</i> , <i>HLA-B</i> e <i>HLA-DRB1</i>	23
5.5. Amplificação dos Microssatélites	23
5.6. Corrida Eletroforética	25
6. Análise dos Microssatélites	26
7. Análise Estatística	27
7.1. Cálculo das Frequências Alélicas e Genotípicas	27
7.2. Cálculo das Frequências Haplotípicas	27
7.3. Cálculo do Desequilíbrio de Ligação	27
7.4. Comparação entre populações	27

8. Resultados	28
8.1. Frequências Alélicas e Genotípicas	28
8.1.1. Microssatélites da Região MHC de Classe II	28
8.1.2. Microssatélites da Região MHC de Classe III	29
8.1.3. Microssatélites da Região MHC de Classe I	31
8.2. Frequências Haplotípicas entre Microssatélites Combinados	33
8.3. Frequências Haplotípicas entre Microssatélites e genes HLA	34
8.4. Microssatélites e Desequilíbrio de Ligação com genes HLA	38
9. Discussão	46
9.1. Frequências Alélicas e Genotípicas	46
9.2. Frequências Haplotípicas	53
9.3. Desequilíbrio de Ligação	56
10. Conclusão	59
11. Referências Bibliográficas	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Localização do MHC humano no cromossomo 6 [6p 21.31].....	02
Figura 02. Esquematização dos complexos gênicos H-2 e MHC.....	03
Figura 03. Estrutura linear e tridimensional da molécula HLA de Classe I.....	05
Figura 04. Estrutura linear e tridimensional da molécula HLA de Classe II.....	06
Figura 05. Visualização de “cima” das moléculas HLA de Classe I e II com peptídeo acoplado junto à fenda.....	07
Figura 06. Mapa genético da região III do MHC Humano.....	08
Figura 07. Exemplo de uma STR hipotética localizada no genoma.....	12
Figura 08. Mecanismo de “escorregamento” da DNA polimerase na STR.....	14
Figura 09. Localização dos microssatélites para estudo na região MHC.....	19
Figura 10. Picos do marcador ET-ROX 400 (GE Healthcare) para identificação dos fragmentos de microssatélite pós-corrída eletroforética	26
Figura 11. Exemplo de análise do programa <i>Fragment Profiler 1.2</i>	26
Figura 12. Referência das cores para análise de desequilíbrio de ligação.....	38
Figura 13. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-A</i> com <i>D6S273</i>	39
Figura 14. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-A</i> com <i>D6S2792</i> ...	39
Figura 15. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-A</i> com <i>STR_MICA</i>	39
Figura 16. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-A</i> com <i>HLABC- 2CA</i>	40
Figura 17. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-B</i> com <i>D6S273</i>	40
Figura 18. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-B</i> com <i>D6S2792</i> ...	41
Figura 19. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-B</i> com <i>STR_MICA</i>	41
Figura 20. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-B</i> com <i>HLABC- 2CA</i>	43
Figura 21. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-DRB1</i> com <i>D6S273</i>	44
Figura 22. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-DRB1</i> com <i>D6S2792</i>	44
Figura 23. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-DRB1</i> com <i>STR_MICA</i>	44
Figura 24. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de <i>HLA-DRB1</i> com <i>HLABC-2CA</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Comparativo da constituição das moléculas HLA de Classe I e II	07
Tabela 02.	Alelos e proteínas do gene <i>HLA</i> de Classe I e II.....	10
Tabela 03.	Taxas de mutações das STRs em diferentes organismos.....	13
Tabela 04.	Dados moleculares dos microssatélites selecionados para estudo.....	19
Tabela 05.	Concentração de reagentes para PCR-SSOP.....	24
Tabela 06.	Protocolos para PCR-SSOP.....	24
Tabela 07.	Frequências alélicas do marcador <i>D6S2874</i>	28
Tabela 08.	Dez maiores frequências genotípicas de <i>D6S2874</i>	29
Tabela 09.	Frequências alélicas do marcador <i>D6S273</i>	29
Tabela 10.	Dez maiores frequências genotípicas de <i>D6S273</i>	30
Tabela 11.	Frequências alélicas do marcador <i>D6S2792</i>	30
Tabela 12.	Dez maiores frequências genotípicas de <i>D6S2792</i>	31
Tabela 13.	Frequências alélicas do marcador <i>STR_MICA</i>	31
Tabela 14.	Dez maiores frequências genotípicas de <i>STR_MICA</i>	32
Tabela 15.	Frequências alélicas do marcador <i>HLABC-2CA</i>	32
Tabela 16.	Dez maiores frequências genotípicas de <i>HLABC-2CA</i>	33
Tabela 17.	Frequências haplotípicas estimadas de <i>D6S273/D6S2792</i>	34
Tabela 18.	Frequências haplotípicas estimadas de <i>STR_MICA/HLABC-2CA</i>	34
Tabela 19.	Haplótipos estimados envolvendo grupos alélicos do gene <i>HLA-A</i> e os alelos dos microssatélites estudados.....	35
Tabela 20.	Haplótipos estimados envolvendo grupos alélicos do gene <i>HLA-B</i> e os alelos dos microssatélites estudados.....	36
Tabela 21.	Haplótipos estimados envolvendo grupos alélicos do gene <i>HLA-DRB1</i> e os alelos dos microssatélites estudados.....	37
Tabela 22.	Resultados encontrados nas associações entre <i>STR_MICA</i> e grupos alélicos do gene <i>HLA-B</i>	42
Tabela 23.	Comparativo das frequências alélicas entre a população afro-descendente e as populações caucasóide, Guarani Nandeva e euro-brasileira para o microssatélite <i>HLABC-2CA</i>	47
Tabela 24.	Comparativo das frequências alélicas entre a população afro-descendente e as populações caucasóide, Kaingang do Ivaí e croatas para o microssatélite <i>STR_MICA</i>	49

Tabela 25. Comparativo das frequências alélicas entre a população afro-descendente e as populações italiana, euro-brasileira e chinesa para o microsatélite <i>STR_MICA</i>	49
Tabela 26. Comparativo das frequências alélicas entre a população afro-descendente e as populações caucasóide, croata e coreana para o microsatélite <i>D6S2792</i>	50
Tabela 27. Comparativo das frequências alélicas entre a população afro-descendente e as populações caucasóide, Guarani Ñandeva e euro-brasileira para o microsatélite <i>D6S273</i>	51
Tabela 28. Comparativo das frequências alélicas entre a população afro-descendente e as populações caucasóide, Guarani Ñandeva e euro-brasileira para o microsatélite <i>D6S2874</i>	53
Tabela 29. Comparativo das estimativas dos haplótipos mais frequentes envolvendo o gene <i>HLA-B</i> e os microsatélites em estudo na população afro-descendente e caucasóide.....	55
Tabela 30. Comparativo das estimativas dos haplótipos mais frequentes envolvendo o gene <i>HLA-DRB1</i> e os microsatélites em estudo na população afro-descendente e caucasóide.....	55

LISTA DE GRÁFICOS E QUADROS

Gráfico 01. Número de alelos de <i>HLA</i> Classe I e II (1987 a 2009).....	10
Quadro 01. Workshop de <i>HLA</i>	04
Quadro 02. Desequilíbrio de ligação entre genes <i>HLA</i> e microssatélites.....	17
Quadro 03. Oligonucleotídeos Pós-PCR.....	25

LISTA DE ABREVIÇÕES

μL	Microlitro
μM	Micromolar
C2 e C4	Proteínas do sistema complemento C2 e C4
CD4+	Co-receptor CD4
CD8+	Co-receptor CD8
DNA	Ácido desoxirribonucléico (em inglês)
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos (em inglês)
Kb	Quilobases
KDa	Quilodaltons
KV	Quilovolt
Mb	Megabases
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (em inglês)
mM	Micromolar
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (em inglês)
PIC	Conteúdo de Informação Polimórfica (em inglês)
SSOP	Sondas de Seqüência Específica de Oligonucleotídeos (em inglês)
STR	Repetições Curtas em <i>Tandem</i> (em inglês)
Th_2	Células T <i>helper</i> 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral (em inglês)
VNTR	Número Variável de Repetições em <i>Tandem</i> (em inglês)

RESUMO

Microsatélites são curtas repetições de 2 a 6 pb de fragmentos de DNA em *tandem*, que são encontrados por todo o genoma. Microsatélites tem sido sugerido como um excelente marcador genético devido ao seu alto polimorfismo e fácil tipagem. Neste estudo, foi investigado cinco microsatélites que foram tipados na região MHC (*D6S2874*, *D6S273*, *D6S2792*, *STR_MICA* e *HLABC-2CA*). A amostra foi composta por afro-descendentes de Curitiba e região metropolitana. Foram estimadas as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas, bem como o desequilíbrio de ligação entre os alelos dos microsatélites e os grupos alélicos dos genes *HLA*: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*. Os microsatélites mais polimórficos foram encontrados próximos ao gene *HLA-B*, na região MHC de Classe I, sugerindo que esta região deve estar sujeita a rápida evolução. Comparação com amostras caucásicas de recente estudo em Curitiba revelaram similaridade nas frequências para os marcadores *D6S2792* e *STR_MICA* e significativa diferença para alelos dos marcadores *D6S2874*, *D6S273* e *HLABC-2CA* sugerindo a possibilidade de fluxo gênico e misturas de população. Os resultados obtidos permitem demonstrar desequilíbrio de ligação entre variantes de microsatélites e grupos alélicos dos genes *HLA*, especialmente nas proximidades de *HLA-B*. Este estudo contribui com o contínuo progresso da descrição e caracterização da região HLA, avaliação dos padrões de associação do MHC e aplicações de análise dos microsatélites MHC.

ABSTRACT

Microsatellites are short tandem repeats of 2-6bp DNA fragments, which are found all over the genome. Microsatellites have been suggested as excellent genetic markers, because of their extensive polymorphism and easy typing. In this study, we investigated five microsatellites in the MHC region (*D6S2874*, *D6S273*, *D6S2792*, *STR_MICA* and *HLABC-2CA*). Our sample was composed of Afro-Brazilians from Curitiba and nearby districts. Allelic, genotypic and haplotypic frequencies were estimated, as well as the linkage disequilibrium between alleles of these microsatellites and allelic groups of *HLA* genes *HLA-A*, *HLA-B* and *HLA-DRB1*. The most polymorphic microsatellites were found close to the *HLA-B* gene, in the MHC Class I region, suggesting that this region may be subject to a faster pace of evolution. Comparisons with a Caucasoid sample recently studied in Curitiba revealed similarity in allele frequencies for markers *D6S2792* and *STR_MICA* and significant differences for alleles of markers *D6S2874*, *D6S273* and *HLABC-2CA* suggesting the possibility of gene flow and population admixture. Our results show linkage disequilibrium between microsatellite variants and allelic groups of *HLA* genes, especially in the proximity of *HLA-B*. This study contributes with the continuing progress of *HLA* region description and characterization, evaluation of MHC association patterns and MHC microsatellites analysis applications.

1. INTRODUÇÃO

Elementos repetidos nos genomas de eucariotos têm sido verificados desde a década de 1970, e desde então inúmeras funções tem se atribuído a estes fragmentos. Os microssatélites, pequenas sequencias repetidas em *tandem*, estão dispersos por todo o genoma humano e, devido ao seu alto polimorfismo, têm sido utilizados como importantes ferramentas na área de pesquisa e também na área aplicada.

Dentre as muitas finalidades que estes marcadores podem exercer, estão, por exemplo, o estudo filogenético e a diferenciação de espécies, a construção de mapas genéticos, a estimativa de diversidade gênica, cálculos de taxas de cruzamento e marcadores para seleção de animais, vegetais e plantas. No entanto, estudos também têm associado os microssatélites a diversos tipos de doenças, e de fato, tem nos permitido um melhor entendimento sobre os mecanismos de desencadeamento destas patologias.

No MHC humano já foram descritos mais de 350 microssatélites, informativos no estudo genético de populações, na caracterização de haplótipos e no estudo de evolução gênica. Recentemente, tem sido proposto que informações sobre o desequilíbrio de ligação destes marcadores com genes *HLA* podem contribuir para elucidar casos de ambigüidades na tipagem doador receptoras para transplante de medula óssea. Tal situação visa diminuir custos laboratoriais, porém aumenta a importância de se conhecer as variações destes microssatélites em diferentes grupos étnicos, para que se tenham parâmetros comparativos para a implantação desta ferramenta nas rotinas laboratoriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MHC

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) é, sem dúvida, a região mais estudada do genoma humano. Localiza-se no braço curto do cromossomo 6 [6p21.31] e abrange aproximadamente 4Mb de extensão (Figura 01) (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993). Caracteriza-se pela presença de genes altamente polimórficos e polialélicos, que codificam moléculas com importante papel na sinalização da resposta imune (DOHERTY e ZINKEMAGEL, 1975; KLEIN e FIGUEROA, 1986; HUGHES e NEI, 1988).

A primeira informação sobre uma possível região de histocompatibilidade ocorreu em murinos nos anos 30. Os pesquisadores Peter Gorer e George Snell testaram a reação de tecidos transplantados de diferentes linhagens de murinos e relacionaram seus achados a uma região denominada H-2 (GORER, 1936).

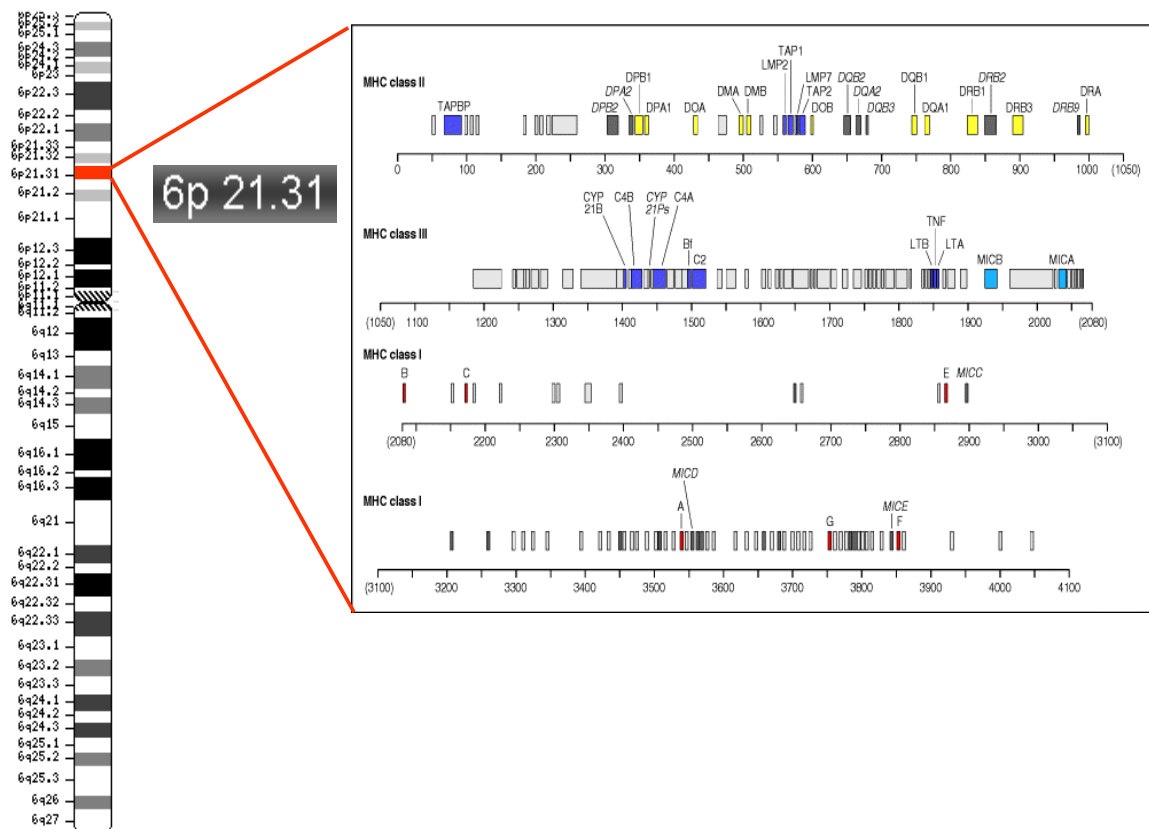


FIGURA 01. Localização do MHC humano no cromossomo 6 [6p 21.31]

No destaque, em vermelho está a localização do MHC humano no braço curto do cromossomo 6 [6p 21.31]. Na ampliação, pode-se verificar a grande diversidade de genes contidos neste fragmento do genoma [Adaptado de JANEWAY et al., 2007].

Em 1954, Jean Dausset descreveu uma região análoga e homóloga em seres humanos (Figura 02), observando a rejeição do tecido sangüíneo e de tecidos transplantados. No entanto, apenas em 1958 foi identificado o primeiro antígeno MHC humano, batizado de “Mac”, e que atualmente é conhecido como *HLA-A2* (DAUSSET, 1954; DAUSSET, 1958).

As funções desta região foram descritas por BODMER (1972) como pleiotrópicas, com papel central na histocompatibilidade (SNELL, 1981) e na reação imune (BENACERRAF e MCDEVITT, 1972; ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1974). Na época, as proteínas expressas por alguns genes do MHC foram chamadas de antígenos de histocompatibilidade e as proteínas produzidas pelos leucócitos dos doadores com as quais reagem receberam o nome de aloantígenos.

Em humanos, o sistema recebeu o nome de HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigens*) por ter sido observada primeiramente a expressão dos aloantígenos nas superfícies dos leucócitos. Desde então, várias pesquisas e os inúmeros encontros técnico-científicos internacionais, os *workshops*, realizados a partir de 1964, contribuíram para o conhecimento adquirido sobre o sistema HLA (Quadro 01).

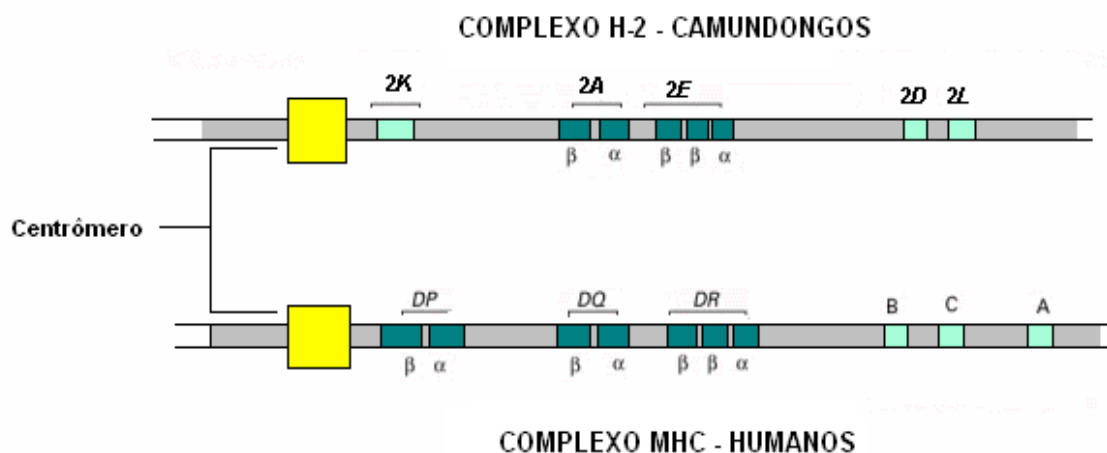


FIGURA 02. Esquematização dos complexos gênicos H-2 e MHC.

Comparação do Complexo H-2 em camundongos e o seu análogo humano, o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). [Adaptado de ALBERTS et al., 2004].

WORKSHOPS DE HLA		
ANO	CIDADE	ORGANIZADORES
1964	Durham / EUA	Bernar Amos
1965	Leiden /Holanda	Jon J. Van Rood
1967	Turim / Itália	Ruggero Cappellini
1970	Los Angeles / EUA	Paul Terasaki
1972	Evian / França	Jean Dausset
1975	Arhus/ Dinamarca	F. Kissmeyer-Nielsen
1977	Oxford / Inglaterra	Valter Bodmer
1980	Los Angeles / EUA	Paul Terasaki
1984	Munique / Alemanha e Viena /Austria	Ekkehard Albert e Wolfgang Mayr
1987	Nova York / EUA	Bo Dupont
1991	Yokohama / Japão	Kimiyoshi Tsuji
1996	St. Malo e Paris / França	Dominique Charron
2002	Victoria / Canadá	Bo Dupont e John A. Hansen
2005	Melbourne/ Austrália	James McCluskey
2008	Buzios / Brasil	Maria G. De Lima e Maria Elisa Moraes

QUADRO 01. FONTE: INTERNACIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKING GROUP (2009)

2.2. Estrutura do MHC

Após a descoberta de Gorer e Snell, o Complexo Principal de Histocompatibilidade passou a ser intensamente estudado, do ponto de vista funcional e estrutural, nos genomas dos vertebrados. KLEIN (1976) foi o primeiro a propor três grandes regiões para este complexo: (a) a região MHC de classe II, mais próxima ao centrômero; (b) a região MHC de classe I, mais próxima ao telômero; e (c) a região de MHC classe III, que ocupa uma porção intermediária entre as duas outras regiões.

As regiões do MHC de classe I e II contêm genes *HLA*, codificantes para glicoproteínas heteromórficas envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T. O alto grau de polimorfismo destes genes tem permitido sugerir a vantagem de indivíduos heterozigotos na apresentação de peptídeos antigênicos (DOHERTY e ZINKERNAGEL, 1975; KLEIN, 1986; HUGHES e NEI, 1988). Já a região de classe III possui genes que traduzem proteínas para diversas finalidades, como por exemplo, as moléculas do sistema complemento (TROWSDALE, 1995; AGUADO et al., 1996).

2.2.1 MHC de Classe I

A região de classe I possui extensão de 1,8Mb, é representada atualmente por 122 lócos, com cerca de 40 genes transcrevendo produtos funcionais (SHIINA et al., 2004). São encontrados nesta região os genes clássicos, expressos em quase todos os tipos celulares: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (WELLS e PARHAM, 1996); os genes não-clássicos: *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (KLEIN e SATO 2000a), e os pseudogenes *HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L* (CAMPBELL e MILNER, 1993).

Os genes *HLA-A*, *-B* e *-C* codificam produtos homônimos que constituem a cadeia pesada da molécula de classe I (formada por três domínios extracelulares: α_1 , α_2 e α_3). Adicionalmente, há ainda a ligação não-covalente com a molécula β_2 -microglobulina na região α_3 , codificada pelo gene *B2M* localizado no cromossomo 15 (Figura 03 e Tabela 01) (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993).

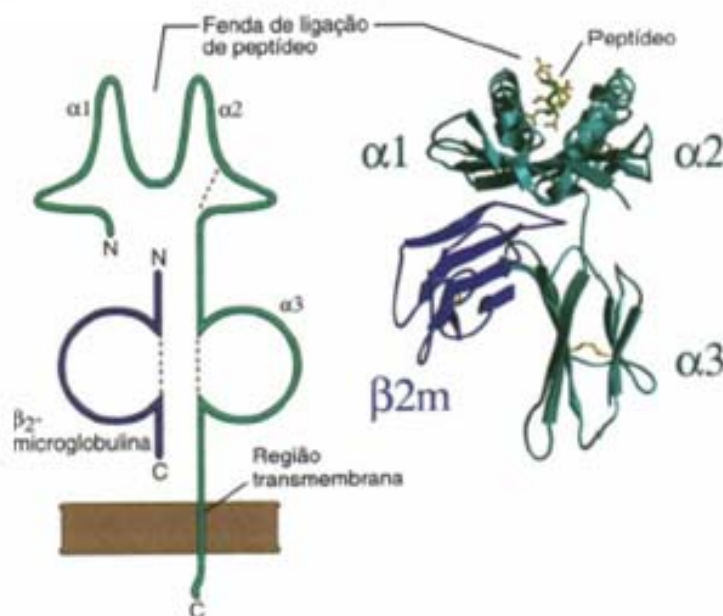


Figura 3. Estrutura linear e tridimensional da molécula HLA de Classe I

A estrutura linear e tridimensional da glicoproteína codificada pelos genes clássicos da região MHC de Classe I [ABBAS et al., 2008].

As glicoproteínas, codificadas pelos genes clássicos de classe I, são expressas em todas as células nucleadas e nas plaquetas (BARNSTABLE et al., 1978). A função principal destas glicoproteínas é a apresentação de peptídeos antigênicos às células T CD8⁺ (Figura 05^A e 05^C), constituindo um dos principais mecanismos de defesa do organismo hospedeiro contra patógenos intracelulares (SPIES et al., 1986).

2.2.2 MHC de Classe II

A extensão da região MHC de classe II corresponde aproximadamente a 0,7Mb, e tem 34 locos descritos. Similarmente à estrutura da região de classe I, são também encontrados genes clássicos, como os *HLA-DQ*, *-DP* e *-DR*, e genes não clássicos, os *HLA-DM* e *-DO*.

As moléculas glicoprotéicas, sintetizadas pelos genes *HLA-DQ*, *-DP* e *-DR*, são expressas em células imunocompetentes como células B, células dendríticas e macrófagos. A estrutura molecular é composta por duas cadeias α (α_1 e α_2) de peso molecular 32-34 kDa; e duas cadeias β , denominadas de β_1 e β_2 , com 29-32 kDa de peso molecular (Figura 04 e Tabela 01) (STITES et al., 2000).

As cadeias α e β estão associadas não-covalentemente, ancoradas pela porção carboxi-terminal, formando uma molécula com função de apresentar fragmentos peptídicos de proteínas antigênicas, acoplados em sua fenda, às células T CD4+ (Figura 05^B e 05^D). Este complexo peptídeo-molécula HLA de classe II é montado em células apresentadoras de antígenos, que são principalmente os linfócitos B, os macrófagos e as células dendríticas (revisado por BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

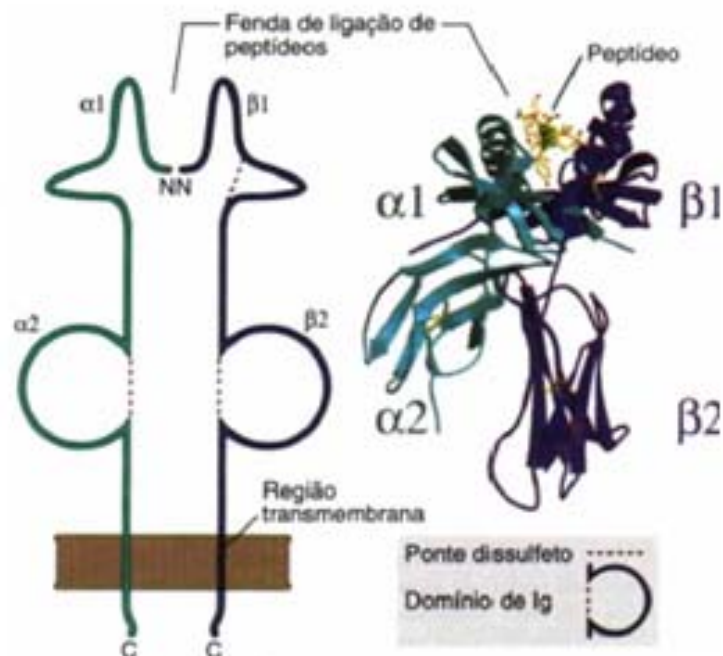


FIGURA 04. Estrutura linear e tridimensional da molécula HLA de Classe II

A estrutura linear e tridimensional da glicoproteína codificada por genes clássicos da região MHC de Classe II [ABBAS et al., 2008].

TABELA 01: COMPARATIVO DA CONSTITUIÇÃO DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E II

Características	Molécula HLA de classe I	Molécula HLA de Classe II
Cadeias polipeptídicas	α (44-47 kD) β_2 -microglobulina (12kD)	α (32-34 kD) β (29-32 kD)
Localização dos resíduos polimórficos	Domínios $\alpha 1$ $\alpha 2$	Domínios $\alpha 1$ $\beta 1$
Tamanho da fenda de ligação de peptídeos	Acomoda 8-11 resíduos de aminoácidos	Acomoda 10-30 resíduos ou mais de aminoácidos
Nomenclatura dos genes clássicos (em humanos)	<i>HLA-A</i> ; <i>HLA-B</i> ; <i>HLA-C</i>	<i>HLA-DR</i> ; <i>HLA-DQ</i> ; <i>HLA-DP</i>

Fonte: ABBAS et al., 2008

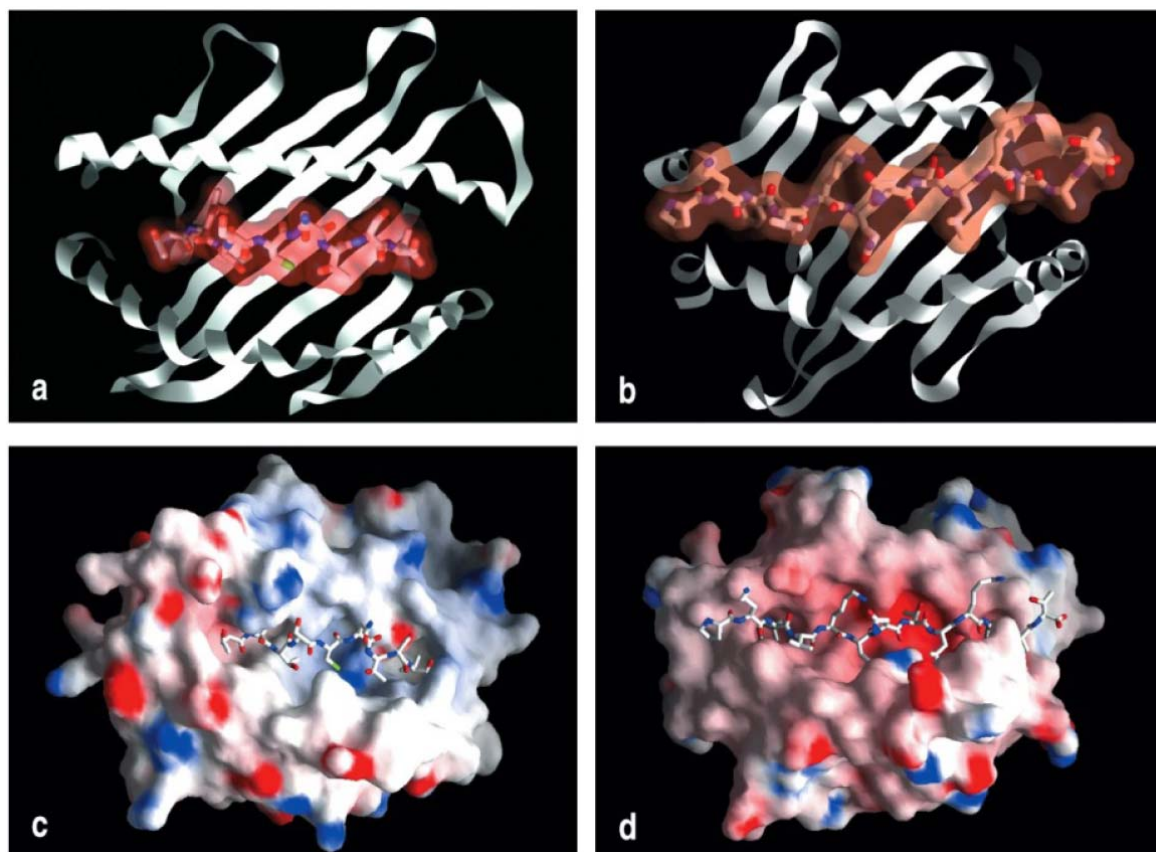


FIGURA 05. Visualização de “cima” das moléculas HLA de Classe I e II com peptídeo acoplado junto a fenda.

Em a e c tem-se em detalhes a molécula HLA de Classe I acoplada a um peptídeo, que lhe confere estabilidade. Na figura b e d é mostrada a molécula HLA de Classe II com sua fenda preenchida pelo peptídeo. [ABBAS e LICHTMAN, 2008].

2.2.3. MHC de Classe III

Como referido anteriormente, trata-se de uma região intermediária às duas outras regiões do MHC (Classe I e Classe II). Este segmento possui alta densidade gênica, com uma média aproximada de um gene a cada 14,5Kb (SHIINA et al., 2004). Toda sua extensão abrange 0,9Mb, e seus produtos codificados somam mais de 70 polipeptídeos diferentes (Figura 06) (HAUPTMANN e BAHRAM, 2004).

Além de codificarem proteínas como C2, C4 e o Fator B do sistema complemento, a região MHC de classe III é bastante conhecida por expressar outros produtos importantes na resposta imune, como o Fator de Necrose Tumoral (*TNF*, do inglês *Tumor Necrosis Factor*), e também proteínas envolvidas na produção e transporte de peptídeos (AGUADO et al., 1996).

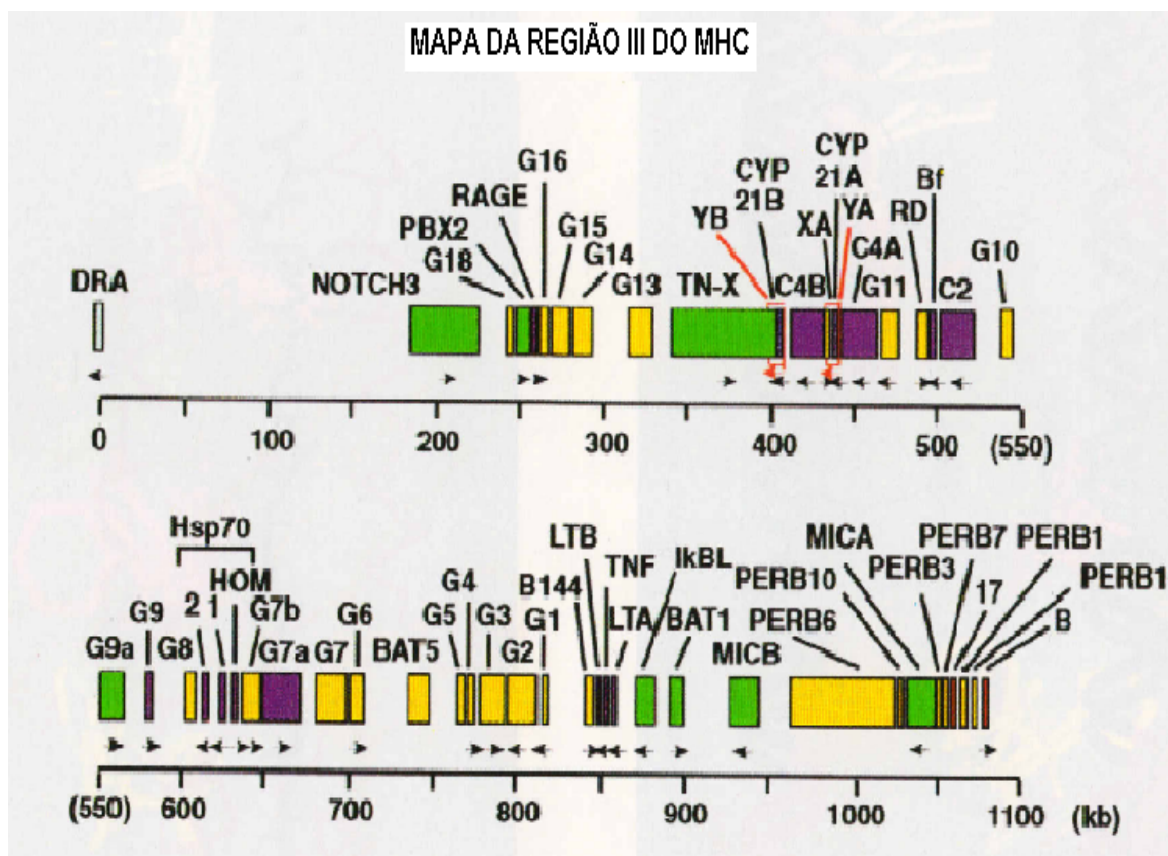


FIGURA 06. Mapa genético da região III do MHC Humano.

O mapa realça a quantidade de genes da região III do MHC humano bem como a sua direção de transcrição, quando estas são conhecidas [JARDETZKY, 1996].

2.3. Polimorfismo do MHC

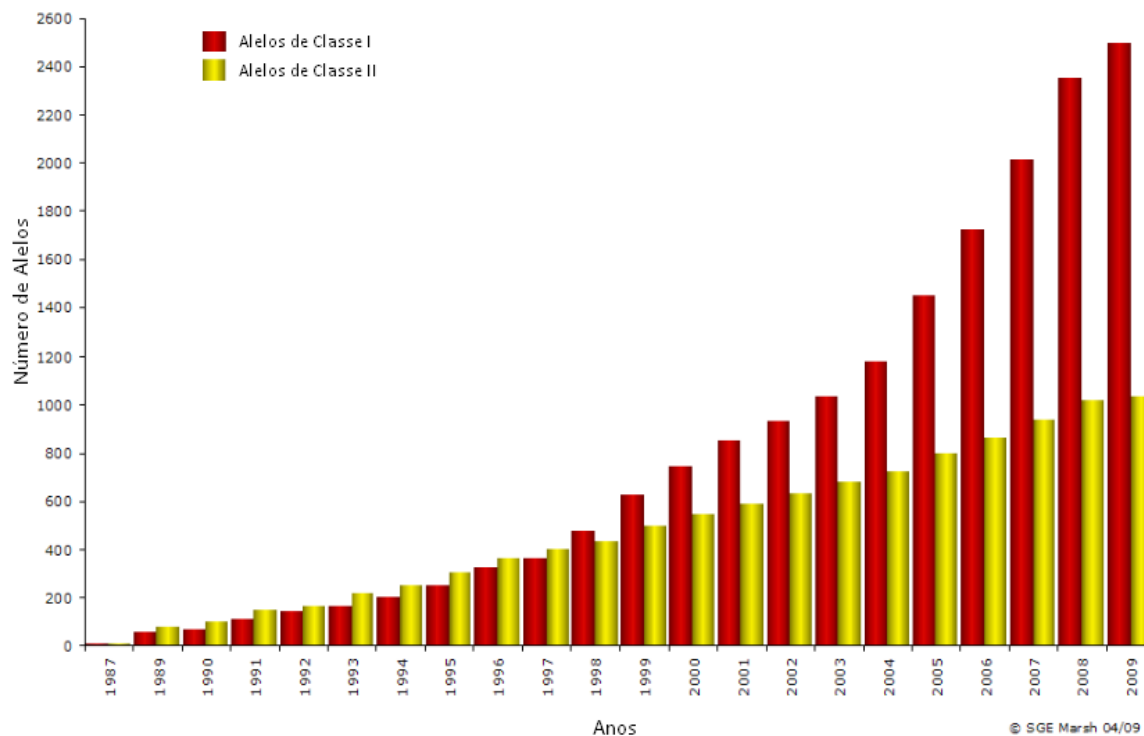
Os genes do MHC, principalmente os genes *HLA* clássicos, possuem duas características que os tornam interessantes para estudo: o polialelismo e o alto polimorfismo (Tabela 02) (SATTA et al., 1994). HUGHES e NEI (1988) estimaram que a heterozigose pudesse atingir até 90% em alguns locos deste complexo em seres humanos. Para eles, quatro hipóteses poderiam explicar o elevado grau de polimorfismo: (a) alta taxa de mutação; (b) conversão gênica; (c) seleção sobredominante; ou (d) seleção dependente de frequência.

Para JEFFREY e BANGHAM (2000), outros fenômenos poderiam estar relacionados com a geração deste alto polimorfismo, como por exemplo, a deriva genética, a seleção, a escolha não aleatória de parceiros com relação aos locos MHC, ou ainda a incompatibilidade materno-fetal. No entanto, a função que o MHC desempenha no sistema imune, permitindo que este identifique e elimine patógenos, talvez seja a principal força seletiva a propiciar e manter esta diversidade.

No caso dos alelos *HLA*, é evidente que tamanha quantidade de variações não permite que todos sejam expressos numa população, o que resulta também numa variação das frequências de certos alelos de forma intra e interpopulacional. Um exemplo bem conhecido é o antígeno HLA-A3, que é frequente em populações caucasóides, mas que em grupos de origem oriental e indígena, é extremamente raro (SIDNEY et al., 1996).

Estudos realizados com primatas e animais domésticos permitem evidenciar a importância do polimorfismo no sistema imune. Para uma população com menor índice de polimorfismo nos genes centrais da resposta imune, há uma grande susceptibilidade a doenças e epidemias, se comparada a outras populações extremamente polimórficas para os mesmo genes (PARHAM, 1999).

Atualmente, o advento da biologia molecular e a formação de grandes consórcios de pesquisa têm acelerado as descobertas e caracterizado melhor os genes que compõem a região MHC. O *IMGT/HLA DATABASE* tem disponibilizado em <<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/intro.html>> dados recentes sobre os alelos dos genes *HLA*, conforme demonstrados no Gráfico 01 e na Tabela 02 abaixo:

GRÁFICO 01: NÚMERO DE ALELOS DE HLA CLASSE I E II (1987 A 2009)

FONTE: IMGT/HLA DATABASE – Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/intro.html> - acessado em 30/04/2009.

TABELA 02: ALELOS E PROTEÍNAS DO GENE *HLA* DE CLASSE I E II

ALELOS E PROTEÍNAS DOS PRINCÍPAIS GENES DA REGIÃO MHC		
Genes	Número de Alelos	Número de Proteínas
<i>HLA-A</i>	767	600
<i>HLA-B</i>	1178	999
<i>HLA-C</i>	439	346
<i>HLA-G</i>	43	14
<i>HLA-DQA1</i>	34	25
<i>HLA-DQB1</i>	96	70
<i>HLA-DRB1</i>	618	506
<i>HLA-DPB3</i>	50	40

FONTE: IMGT/HLA DATABASE – Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> - acessado em 30/04/2009.

2.4. Sistema HLA e transplantes

O transplante é um procedimento cirúrgico, caracterizado como sendo a transferência de células, tecidos ou órgãos, podendo ser de um indivíduo para ele próprio ou para outro indivíduo. Pode ser classificado em quatro tipos distintos: (a) autólogo, quando o indivíduo para si mesmo, não ocorrendo rejeição do enxerto; (b) singênico: ocorrido entre indivíduos geneticamente idênticos, como no caso dos gêmeos monozigóticos, teoricamente sem rejeição de enxerto; (c) alogênico: ocorrido entre indivíduos de mesma espécie, mas geneticamente diferentes, com risco de rejeição; e (d) xenogênico: ocorrido entre indivíduos de espécies diferentes, com chance iminente de risco de rejeição.

O transplante de medula óssea, enxerto de células-tronco hematopoiéticas, é clinicamente indicado para o tratamento de distúrbios do sistema hematopoiético ou do sistema imune e em casos de doenças malignas da medula óssea e tumores sólidos disseminados [ALBERTS et al., 2004; JANEWAY, et al. 2007]. No transplante alogênico, as proteínas do tecido transplantado recebem o nome de aloantígenos, enquanto que o tecido propriamente dito é chamado de aloenxerto. Quando há incompatibilidade entre doador e receptor, devido a diferenças das proteínas HLA, os aloantígenos do tecido transplantado do doador são reconhecidos como não-próprios pelo organismo do receptor, desta maneira, a resposta imune é desencadeada e pode culminar na rejeição do aloenxerto

Neste mecanismo de reconhecimento do não-próprio, os macrófagos reconhecem o aloantígeno, processando-o de forma a ser apresentado por moléculas HLA de classe II aos linfócitos T CD4+. A resposta imune é desencadeada com o estímulo da produção de células T específicas contra os aloantígenos. Numa outra cascata de eventos, as células Th₂ estimulam linfócitos B a produzirem anticorpos específicos [ABBAS et al., 2008].

A tipagem de doadores e receptores aparentados e não aparentados busca indivíduos que mostrem identidade para os grupos alélicos de *HLA*. Entretanto, o número extraordinariamente grande de alelos em cada loco da região de MHC, incluindo os genes *HLA*, contribui para que cada um destes alelos tenha uma frequência relativamente baixa na população, resultando numa grande dificuldade para que dois indivíduos possuam as proteínas HLA idênticas, dificultando a busca de doador e receptor compatíveis.

2.5. Microssatélites

Os microssatélites são repetições curtas de segmentos em *tandem*, de dois a seis pares de bases, encontrados no genoma (Figura 07) e são também conhecidos como SRTs (do inglês, *Short Repeat Tandem*). Estes segmentos foram descritos primeiramente por volta de 1980, e compõe, juntamente com os minissatélites, uma parte do genoma conhecida como VNTRs (do inglês, *Variable Number of Tandem Repeats*) (HAMADA et al., 1982; TAUTZ e RENZ, 1984).

Dentre as características das STRs, tem-se um padrão co-dominante de herança e uma elevada quantidade de alelos, devido às variações nos números de repetições destes segmentos. Os microssatélites têm sido empregados em vários contextos, como no estudo de genética de populações, no mapeamento de genes, na medicina forense e nos estudos filogenéticos (GOURRAUD et al., 2004).

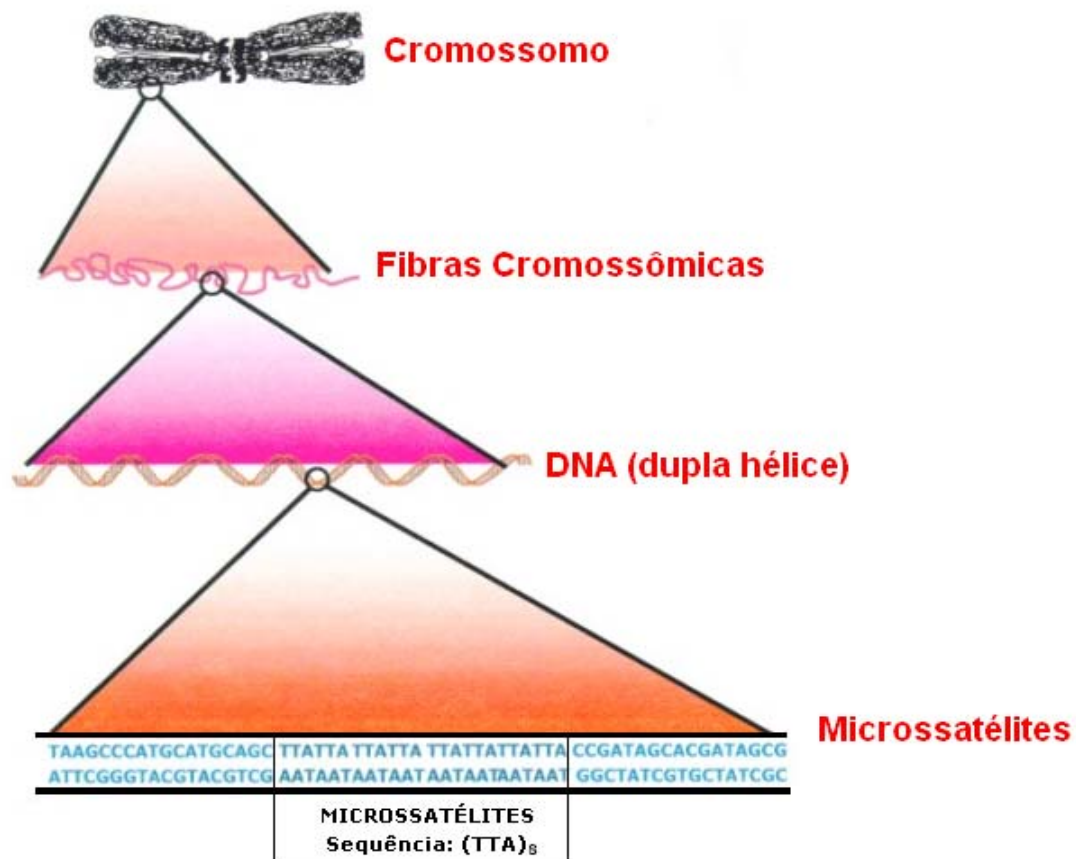


FIGURA 07. Exemplo de uma STR hipotética localizada no genoma
 No detalhe a “anatomia” dos microssatélites, ilustrada pela seqüência hipotética (TTA), que possui oito repetições, representada como (TTA)₈ [Adaptada de “*The anatomy microsatellite*” – 2009].

Os alelos, em função das variações nas repetições, acabam sendo distribuídos de diferentes formas nas populações, de tal maneira que algumas destas podem apresentar determinados alelos que estão ausentes em outras (FOISSAC et al., 1997). Esta variabilidade, somada a relativa facilidade com que são encontrados no genoma, permite considerá-los como importantes marcadores genéticos (GODSTEIN E POLLOCK, 1997).

As STRs apresentam grande instabilidade, com altas taxas de mutações, que variam em diferentes organismos (Tabela 03). Estas mutações geralmente ocorrem por dois processos diferentes:

- Na recombinação entre as moléculas de DNA por *crossing-over* desigual ou conversão gênica (SMITH, 1976; JEFFREYS et al. 1994).
- No processo de replicação do DNA, principalmente por perda ou ganho de repetições, por um mecanismo denominado “escorregamento” da DNA polimerase (Figura 08) (LEVINSON e GUTMAN, 1987).

TABELA 03. TAXAS DE MUTAÇÕES DAS SRTs EM DIFERENTES ORGANISMOS

Organismos	Taxa de Mutações	Referencias:
<i>Escherichia coli</i>	10^{-2}	POWELL et al. 1996
<i>Drosophila melanogaster</i>	6.10^{-6}	LEVINSON e GUTMAN, 1987
<i>Homo sapiens</i>	10^{-3}	WEBER e WONG, 1993

A quantificação destas seqüências repetidas pode ser calculada usando vários parâmetros, dentre eles se destaca o PIC (do inglês, *Polymorphism Information Content*), conteúdo de informação polimórfica, que é obtido através do número de alelos e a sua frequência na população (HEARNE et al., 1992).

O fato de serem instáveis também tem permitido sugerir que os microssatélites possam apresentar importante papel biológico no desenvolvimento de doenças, como síndromes e neoplasias, especialmente no câncer colorretal (KLORR et al., 2005). Estudos sobre a origem de síndromes genéticas tem associado expansões destas repetições em *tandem* a um papel central na síndrome do X-Frágil, na distrofia miotônica (FU et al. 1991; ASLANDIS et al. 1992), na Doença de Huntington e na Doença de Kennedy (FOISSAC et al., 2000).

As aplicações nos estudos das STRs têm contribuído para uma melhor compreensão das doenças autoimunes e infecciosas, através da quantificação e tipagens de genes ou de regiões que tenham possíveis participações nestes processos (JAWAHEER E GRAHAM, 2002).

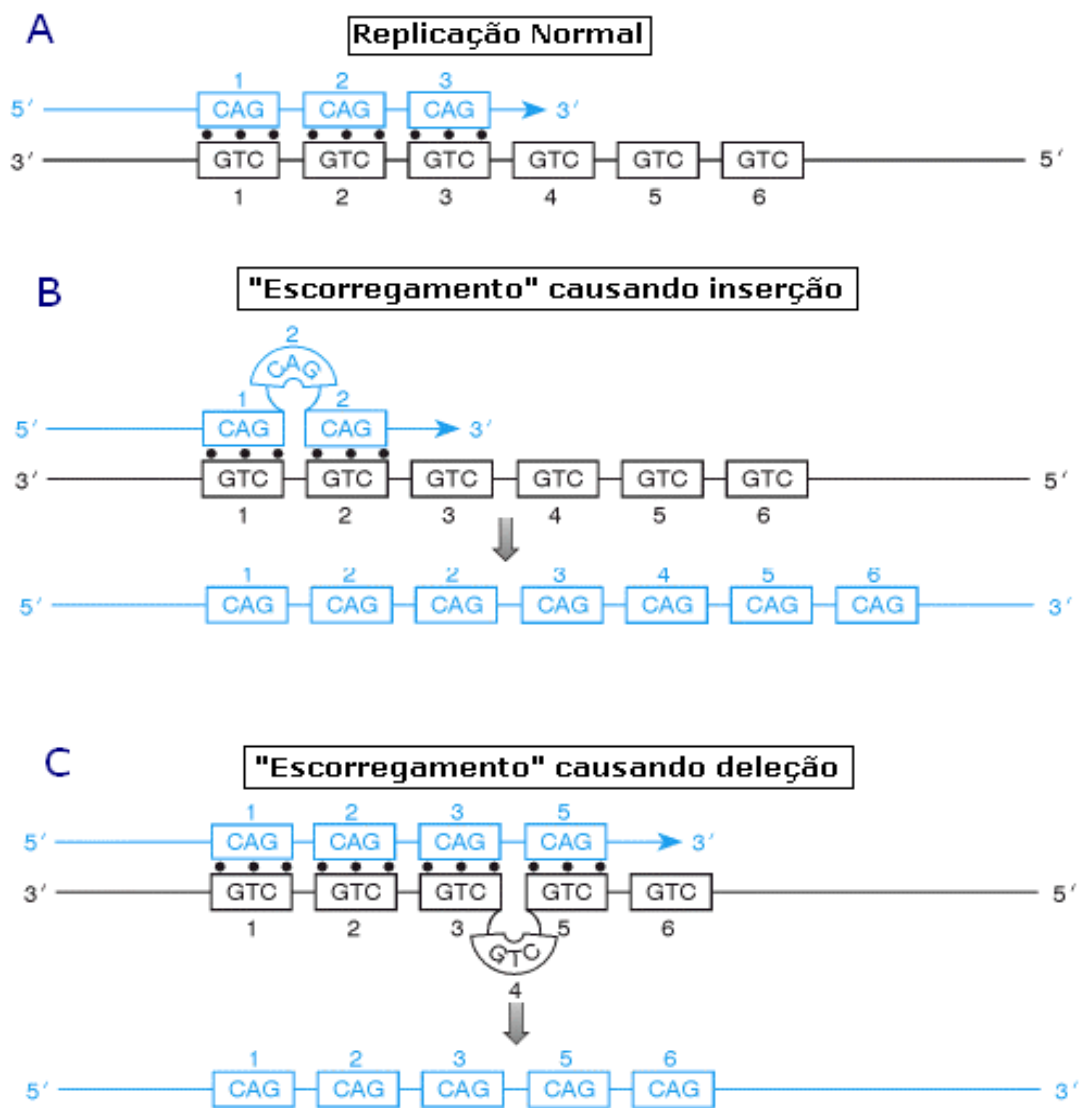


FIGURA 08. Mecanismo de "eskorregamento" da DNA polimerase na STR
 Em **A**, a replicação normal do DNA realizado pela DNA polimerase. Em **B**, o "eskorregão" da enzima formando inserções de uma trinca na fita sintetizada. Em **C**, o mesmo processo, porém causando a deleção de uma trinca [STRACHAN e READ, 2002]

2.5.1. Microssatélites e Desequilíbrio de Ligação

Alelos são variantes alternativas de um mesmo gene, que se localizam no mesmo loco cromossômico, e que em princípio, segregam aleatoriamente. Entretanto, quando diferentes locos estão muito próximos ou “ligados”, seus alelos segregam conjuntamente na formação de gametas, como um bloco único, denominado de haplótipo.

O desequilíbrio de ligação ocorre quando a frequência observada de certos haplótipos difere da esperada, calculada através dos produtos dos alelos que o constitui (VOGEL e MOTULSKI, 2000). Ou seja, se dois alelos **a** e **b**, originados de locos diferentes ligados (A e B) com frequências p_a e p_b , respectivamente, tem seus produtos combinados numa frequência diferente da frequência do haplótipo **ab** (p_{ab}).

$p_{ab} = (p_a).(p_b)$	→	Frequência normal
$p_{ab} \neq (p_a).(p_b)$	→	Desequilíbrio de ligação

Para expressar o valor do desequilíbrio de ligação, utiliza-se a seguinte expressão:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - [(p_a).(p_b)]$$

Onde:

Δ_{ab} : é a medida do desvio de desequilíbrio de ligação. Seu valor depende das frequências alélicas, que possuem valores entre 0 e 1.

LEWONTINI (1964) sugeriu normalizar a medida de Δ , dividindo-o pelo seu máximo teórico, através da seguinte fórmula:

$$\Delta'_{ab} = \Delta_{ab} / \Delta_{ab \text{ Max}}$$

- $\Delta_{ab \text{ Max}}$: valor maior de $[(p_a).(p_b), (1 - p_a).(1 - p_b)]$, se $\Delta_{ab} > 0$

$$\Delta'_{ab} = \Delta_{ab} / \Delta_{ab \text{ Min}}$$

- $\Delta_{ab \text{ Min}}$: valor menor de $[(p_b).(1 - p_a), (p_a).(1 - p_b)]$, se $\Delta_{ab} \leq 0$

Δ'_{ab} (ou D') traz a informação a respeito da magnitude do desequilíbrio de ligação em relação ao maior valor que este pode assumir, podendo atingir valores

que variam de +1,00 a -1,00. Os valores positivos indicam acoplamento (ocorrem juntos mais frequentemente que o esperado), enquanto que valores negativos indicam repulsão entre alelos em questão (ocorrem juntos menos frequentemente que o esperado). Para este estudo, foi utilizado Δ'_{ab} como medida do desequilíbrio de ligação para a análise de resultados.

Entre os fatores que influenciam estas alterações nas frequências haplotípicas, citam-se:

- **Taxas de recombinação:** no genoma há altas taxas de recombinação para desequilíbrio de ligação menor, e baixas taxas de recombinação para desequilíbrio de ligação maior. Desta maneira, o desequilíbrio de ligação está associado inversamente à taxa de recombinação, pois depende da distância entre os segmentos (PROBST, 2000; VOGEL e MOTULSKY, 2000).
- **Inversões:** o potencial de recombinação pode ser influenciado por inversões no genoma, de tal maneira que passa a ter grande efeito sobre o desequilíbrio de ligação (YU et al., 2001).
- **Misturas recentes de populações:** o desequilíbrio de ligação pode existir, por exemplo, populações em equilíbrio de ligação e heterogêneas em relação as frequências haplotípicas, se misturam. Esta recente mistura ainda não permitiria a distribuição aleatória dos alelos (PROBST, 2000; VOGEL e MOTULSKY, 2000).
- **Deriva Genética:** em populações de menor tamanho, a ação da deriva genética pode levar a perda de determinados haplótipos, influenciando o aumento do desequilíbrio de ligação (ARDLIE et al., 2002).
- **Crescimento populacional:** quando há um rápido crescimento populacional, o desequilíbrio de ligação é atenuado através da redução do efeito da deriva genética (ARDLIE et al., 2002).
- **Seleção natural:** quando as combinações de alelos podem trazer vantagem seletiva a seus portadores acabam sendo preservadas. Uma forma da ação da seleção natural pode também ocorrer através do “efeito carona”, que é quando

um haplótipo inteiro que flanqueia determinada variante favorável pode rapidamente atingir uma alta frequência, contribuindo para o aumento do desequilíbrio de ligação na região (ARDLIE et al., 2002).

- **Co-evolução dos genes:** o desequilíbrio de ligação pode ser aumentado se dois locos estiverem co-evoluindo, pois a taxa de recombinação entre eles diminui através da presença de pontos frios de permuta (PROBST, 2000).
- **Conversão gênica:** atua diminuindo o desequilíbrio de ligação, com ação que equivale a dois eventos de recombinação muito próximos (ARDLIE, 2002).

A análise de desequilíbrio de ligação com o sistema HLA tem sido muito útil nas investigações de associações deste sistema gênico com doenças de etiologia genética (VOGEL e MOTULSKY, 2000). Vários autores já descreveram desequilíbrio de ligação envolvendo genes *HLA* e microssatélites (Quadro 02),

DESEQUILIBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE GENES HLA E MICROSSATÉLITES		
Região do MHC	HLA x Microssatélite	Referências
MHC de Classe I	HLA de classe I x <i>D6S105</i> HLA de classe I x <i>D6S265</i>	WORWOOD et al., 1994.
	<i>HLA-B</i> x <i>MIB</i> <i>HLA-B</i> x <i>TNF</i>	GRIMALDI et al., 1996
MHC de Classe III	Vários haplótipos de <i>HLA</i> x 05 microssatélites <i>TNF</i>	JONGENEEL, et al., 1991 ; ABRAHAM et al., 1993 ; CROUAU-ROY et al., 1993 ; UDALOVA et al., 1993 ; MONOS et al., 1995.
MHC de Classe II	<i>HLA-DR</i> x <i>DQ-CAR</i> <i>HLA-DQ</i> x <i>DQ-CAR</i>	MACAUBAS et al., 1995

QUADRO 02. Exemplos de desequilíbrio de ligação envolvendo genes HLA e microssatélites

2.5.2. Microssatélites para Estudo

Dentre os diversos microssatélites existentes na região MHC, cinco se destacam por sua importância nos estudos clínicos e populacionais: *D6S2874* (*TAP1CA*); *D6S273*; *D6S2792* (*TNF- α*); *STR_MICA* e *HLABC-2CA*.

Estes marcadores estão localizados dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade, distribuídos em suas três regiões (Figura 09). Os dados moleculares de cada um estão descritos na Tabela 04.

- *D6S2874*

Localiza-se na região de classe II do MHC, no íntron 3 do gene *TAP1*, o que faz com que este microssatélite também seja conhecido como *TAP1-CA* (FOISSAC et al. 2000).

- *D6S273*

Localiza-se na região de classe III do MHC, na região da superfamília Hsp70 e do gene *G6D* (FOISSAC et al. 2000).

- *D6S2792*

Conhecido como *TNF- α* , está localizado no lóco do Fator de Necrose Tumoral a 3,5Kb do gene *TNF- β* . Apresenta alto polimorfismo, assim como também outros microssatélites no lóco *TNF* (GRUBIC et al., 2006).

A tipagem de microssatélites deste lóco pode apresentar importantes ferramentas para a compatibilidade entre doadores e receptores no pós-operatório. Estudos têm relacionado problemas menos graves de pacientes na recuperação pós-operatório quando é realizado previamente a tipagem do lóco *TNF* aos lócos dos genes *HLA* de classe I e II. Estes procedimentos têm diminuído a ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro e aumento na sobrevida dos pacientes (WITT et al., 1999).

- *STR_MICA*

Localiza-se no éxon 5 do gene *MICA*, na região I do MHC. Está relacionado com a codificação de alaninas na proteína MICA, por apresentar repetições em *tandem* da trinca (GCT) (OTA et al., 1997). A nomenclatura para este marcador é designada conforme a quantidade de repetições da trinca (GCT), desta maneira:

- a) *STR_MICA**A4: quatro repetições [(GCT)₄];
- b) *STR_MICA**A5: cinco repetições [(GCT)₅];
- c) *STR_MICA**A6: seis repetições [(GCT)₆];
- d) *STR_MICA**A9: nove repetições [(GCT)₉];
- e) *STR_MICA**A5.1: variação de *A5, com inserção e uma guanina, alterando a matriz de leitura [(GCT)₄ (GGCT)₁];

- *HLABC-2CA*

Localiza-se na região de classe I do MHC, entre os genes *HLA-B* e *HLA-C*, e possui como característica a grande diversidade, que é refletida na existência de um grande número de alelos, sendo descritos até 24 alelos (BELTRAME et al., 2005).

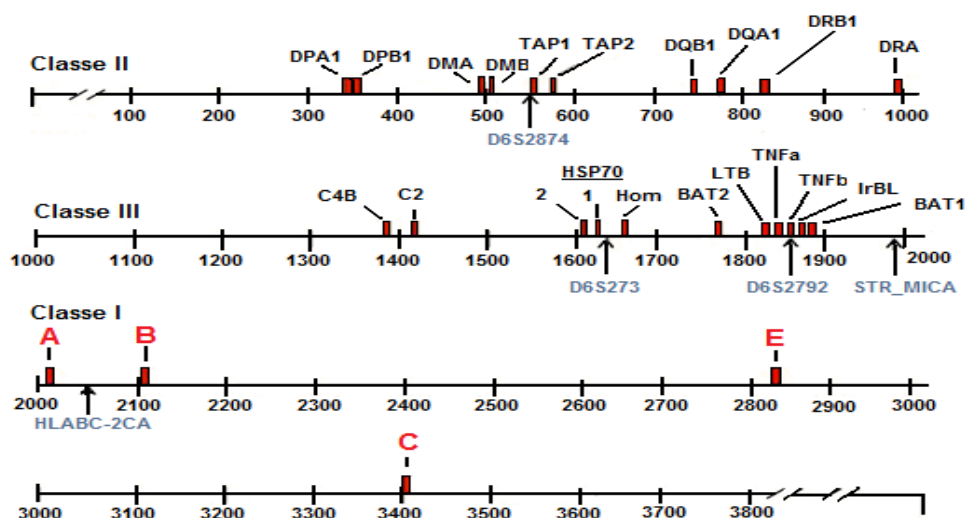


FIGURA 09. Localização dos microssatélites para estudo na região MHC.
A localização dos *D6S2874*, *D6S273*, *D6S2792*, *STR_MICA* e *HLABC-2CA* no MHC, abrangendo as regiões de classe I, II e III.

Tabela 04. DADOS MOLECULARES DOS MICROSSATÉLITES SELECIONADOS PARA ESTUDO

Microssatélites	Unidade de repetição	Número de repetição	Número de Alelos	PIC
<i>TNF-α</i>	CA	CA ₆ -CA ₁₈	12-14	0,86
<i>D6S2874</i>	CA	*	7	0,62
<i>D6S273</i>	CA	*	6	0,76
<i>STR_MICA</i>	GCT	GCT ₄ -GCT ₉	5	0,69-0,75
<i>HLABC-2CA</i>	CA	*	24	*

(*) Informações indisponíveis

FONTE: FOISSAC et al. (2000); BELTRAME et al. (2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Analisar os microssatélites *D6S2874*, *D6S273*, *D6S2792*, *STR_MICA* e *HLABC-2CA* da região MHC em uma amostra composta por 269 doadores voluntários de medula óssea, do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH – UFPR). Esta amostra é composta por indivíduos autodenominados afro-descendentes;

3.2. Objetivos Específicos

- Tipar os microssatélites *D6S2874*, *D6S273*, *D6S2792*, *STR_MICA* e *HLABC-2CA*;
- Estimar as frequências alélicas e genotípicas para estes marcadores;
- Estimar as frequências haplotípicas para os microssatélites de uma mesma região do MHC, e de todos os marcadores em estudo com os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*;
- Averiguar a conformidade das distribuições genotípicas dos microssatélites estudados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Comparar os resultados obtidos nesta amostra com outros resultados encontrados em uma amostra de caucasóides;
- Verificar o possível desequilíbrio de ligação entre os microssatélites estudados e os grupos alélicos dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*.

4. JUSTIFICATIVA

A análise de microssatélites é uma ferramenta promissora na obtenção de informações sobre haplótipos *HLA*. As técnicas associadas à análise de microssatélites (PCR e eletroforese) são simples e rápidas, possibilitando a tipagem de várias amostras com custo baixo se comparadas com a tipagem de alelos *HLA* de classe I e II. Adicionalmente, dificuldades na tipificação alélica de alguns genes da região MHC, como por exemplo, o *HLA-B* e o *HLA-DRB1*, têm comprometido a determinação de forma precisa da compatibilidade receptor-doador.

É importante a análise de novos marcadores polimórficos, de fácil determinação alélica e que possam trazer maiores informações sobre haplótipos *HLA*, e deste modo, aumentar a precisão no processo de busca de compatibilidade entre os candidatos a doador e os receptores de medula óssea. Os microssatélites se apresentam como ferramenta de alto potencial, pois suas características já abordadas têm demonstrado ser uma alternativa viável para este processo.

O desequilíbrio de ligação entre genes *HLA* e microssatélites na região MHC, já verificado em outros estudos, permite sugerir que as STRs possam ser bons marcadores de haplótipos específicos, haja vista que o conhecimento destes desequilíbrios pode contribuir significativamente para esclarecimentos dos casos de ambigüidades durante as tipagens, auxiliando no processo de seleção doador-receptor.

Poucos trabalhos têm relatos de estudos de microssatélites envolvendo uma amostra populacional afro-descendente, e no Brasil se trata de um trabalho inédito e informativo, sendo ainda complementar ao trabalho de Sens

Neste trabalho, foram investigados cinco microssatélites numa amostra de 269 doadores voluntários afro-descendentes de medula óssea. Foi utilizado o banco de dados do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade da Universidade Federal do Paraná (LIGH-UFPR) como fonte da amostra. Complementarmente, foi realizada uma comparação com outro estudo onde se tipificou os mesmos microssatélites em uma amostra populacional caucasóide.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Caracterização da Amostra

A amostra foi constituída de 269 doadores voluntários de medula óssea, autodenominados afro-descendente, cadastrados no banco de dados do LIGH-UFPR.

A pré-seleção destas amostras foi realizada *in silico* e de forma aleatória, pesquisada no banco de dados do LIGH, e posteriormente, encaminhadas para análise de concentração de DNA, através da leitura de densidade ótica (D.O.).

5.2. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras já havia sido realizada pela equipe de rotina do LIGH, através de dois procedimentos:

- A. Método “*salting-out*”: obtenção de DNA de alto peso molecular, onde há rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e a precipitação do DNA com etanol (JOHN et al., 1991, modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr, 1991).
- B. Método *EZ-DNA*[®]: obtenção de DNA de concentração variando entre 20 a 200 ng/μL, com utilização do kit comercial *EZ-DNA*[®] (Biological Industries), que consiste na destruição celular por lise com guanidina, precipitação do DNA com etanol e solubilização do mesmo por NaOH 8 mM ou em água.

5.3. Medida da Concentração de DNA

Após a pré-seleção, foram medidas as concentrações de DNA destas amostras, através da leitura da D.O., realizada com o espectrofotômetro *Gene Quantpro RNA/DNA calculator*. Foram selecionadas as amostras que apresentaram concentração mínima de 100 ng/μL de DNA, e índice de pureza que apresentaram variações entre 1,50 e 2,00.

Foi utilizada água ultrapura (Mili-Q[®]) para diluição das amostras, até ser obtida a concentração de 20 ng/μL, necessária para a amplificação dos microssatélites em estudo na PCR-SSOP. As concentrações dos reagentes para o *mix* desta PCR se encontram descritas na Tabela 05.

5.4. Tipagem dos lócos *HLA-A*, *HLA-B*, *-DRB1*

A tipagem dos lócos *HLA-A*, *-B* e *-DRB1* foi previamente realizada pela equipe do LIGH em baixa resolução, conforme descrito abaixo:

➤ Tipagem em baixa resolução

Os genes *HLA-A*, *-B* e *-DRB1* foram tipados em baixa resolução, para a definição dos grupos alélicos, através do método PCR-SSOP reverso (do inglês, *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes*), utilizando a tecnologia Luminex (*LABScreen*) e usando os kits *LABType® rSSO typing tests* (One Lambda, Inc). Esta tecnologia emprega um sistema de multi-análise que trabalha com um conjunto de microesferas codificadas por cores que representam diferentes comprimentos de onda, as quais são analisadas num avançado citômetro de fluxo.

As microesferas codificadas por uma determinada cor contêm em sua superfície apenas oligonucleotídeos-sonda da mesma seqüência, deste modo, diferentes microesferas podem ser adicionadas em um único tubo, substituindo o formato multi-poços convencionais. Neste método PCR-SSOP reverso, a região alvo do DNA é amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores biotinilados. Estes produtos marcados são desnaturados e hibridizados em um único tubo com as sondas acopladas às microesferas. Por fim, faz-se a marcação da estreptoavidina conjugada com ficoeritrina e a leitura da reação através do software específico.

5.5. Amplificação dos microssatélites

A tipagem dos microssatélites foi realizada com base em método semi-automatizado. As regiões dos microssatélites selecionadas foram amplificadas por PCR, através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluorescência. Esta reação foi programada para 30 ciclos, e a temperatura e os tempos das ciclagens estão descritos na Tabela 06.

Os microssatélites *D6S273* e *D6S2874* foram amplificados numa mesma reação, por PCR-Multiplex. Neste tipo de PCR, várias regiões são amplificadas simultaneamente pela adição de vários pares de oligonucleotídeos iniciadores. Este protocolo foi padronizado por OLIVEIRA (2007) e também utilizado por SENS-ABUÁZAR (2008) em seu trabalho envolvendo os mesmos microssatélites deste estudo. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e os fragmentos esperados ao final da amplificação estão descritos no Quadro 03.

TABELA 05. CONCENTRAÇÃO DE REAGENTES PARA PCR-SSOP

Concentração Final para PCR (mix)					
REAGENTES	D6S2874	D6S273	D6S2792	STR_MICA	HLABC-2CA
Tampão (10x)	1X	1X	1X	1X	1X
dNTP (2,5 mM)	0,25mM	0,25mM'	0,25 mM	0,25mM	0,25mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	1,5mM	2,5mM	1,5mM	1,5mM
Taq-polimerase (5U/ µL)	0,25U	0,25U	0,25U	0,25 U	0,25U
DNA	6ng/µL	6ng/µL	6ng/µL	5ng/µL	4ng/µL
Oligonucleotídeos Iniciadores	0,22µM	0,68µM	0,5µM	0,2µM	2µM

TABELA 06. PROTOCOLOS PARA PCR-SSOP

Temperatura e tempo de ciclagem					
Microssatélites	Incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
<i>D6S2874</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	55°C-30 seg	72°C-1 min	72°C-40 min
<i>D6S273</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	55°C-30 seg	72°C-1 min	72°C-40 min
<i>D6S2792</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	55°C-30 seg	72°C-1 min	72°C-40 min
<i>STR_MICA</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	54,5°C-30 seg	72°C-1 min	72°C-40 min
<i>HLABC-2CA</i>	94°C-3 min	94°C-30 seg	60°C-30 seg	72°C-1 min	72°C-40 min

As etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram realizadas para total de 30 ciclos

OLIGONUCLEOTÍDEOS PÓS-PCR			
Lóco	Oligonucleotídeo iniciador direto 5' → 3'	Oligonucleotídeo iniciador reverso 5' → 3'	Fragmentos (Kb)
<i>D6S2874</i>	gcttgatctccccctc	ggacaatatttgctcctgagg	185-215
<i>D6S273</i>	gcagaagttgagtattctgc	accaaactcaaatttcgg	139-163
<i>TNFα</i>	gcctctagattcatccagccaca	cctctctcccctgcaacacaca	97-121
<i>SRT-MICA</i>	ccttttttcagggaaagtgc	ccttaccatctccagaaactgc	180-200
<i>HLABC-2CA</i>	tgggcaatgagtcctatgac	tgccattggccctaaatgc	90-130

QUADRO 03. Características dos oligonucleotídeos obtidos pós PCR.

5.6. Corrida Eletroforética

As regiões amplificadas foram desnaturadas e submetidas à corrida eletroforética no aparelho seqüenciador *MegaBACE[®] 1000* (*GE Healthcare*). Para este procedimento foi preparada uma solução com o detergente TWEEN e o marcador de peso molecular *ET-ROX 400* (*GE Healthcare*), necessário para a identificação dos tamanhos de fragmentos das amostras amplificadas.

As amostras amplificadas foram distribuídas em placas de 96 poços, contendo 0,3 μ L do marcador, 7,7 μ L de TWEEN 0,02X e 2,0 μ L do produto amplificado da PCR. A placa contendo amostras e reagentes foi centrifugada e desnaturada por 3 minutos a 94°C e colocada diretamente em gelo para manter as fitas de DNA separadas. A injeção no seqüenciador *MegaBACE[®] 1000* foi realizada com tensão de 3KV por 80 segundos e a corrida com 8KV por 80 minutos.

O seqüenciador *MegaBACE[®] 1000* permite que sejam injetados mais de um microssatélite numa mesma placa e, conseqüentemente, numa mesma corrida, desde que sejam evitadas possíveis sobreposições dos mesmos, ou seja, produtos da PCR possam com tamanhos similares e marcados com a mesma fluorescência.

6. ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES

A corrida eletroforética no seqüenciador *MegaBACE*[®] 1000 gerou resultados que foram visualizados através do programa *Fragment Profiler 1.2* (GE Healthcare). O marcador de peso molecular *ET-ROX 400* apresenta 20 picos, e cada um deles corresponde ao tamanho de pares de bases correspondente (Figura 10).

Para interpretação dos gráficos, consideraram-se dois picos como correspondente aos indivíduos com dois alelos diferentes (heterozigotos), enquanto que gráficos contendo apenas um único pico são os correspondente a indivíduos com alelos iguais (homozigotos) (Figura 11).

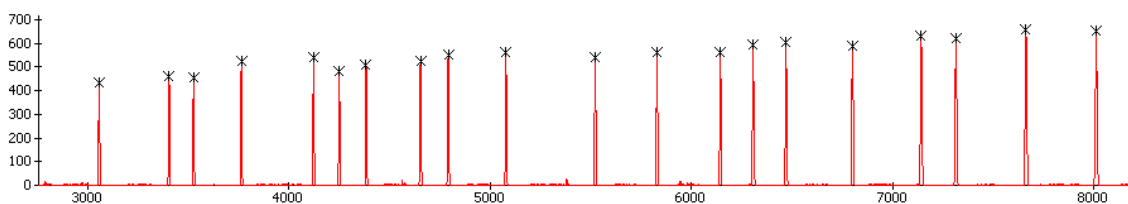


FIGURA 10: Picos do marcador *ET-ROX 400* (GE Healthcare) para identificação dos fragmentos de microssatélite pós-corrida eletroforética

Os picos representam oligonucleotídeos de tamanhos conhecidos, sendo citados da esquerda para a direita: 60, 90, 100, 120, 150, 160, 170, 190, 200, 220, 250, 270, 290, 300, 310, 330, 350, 360, 380 e 400 pb.

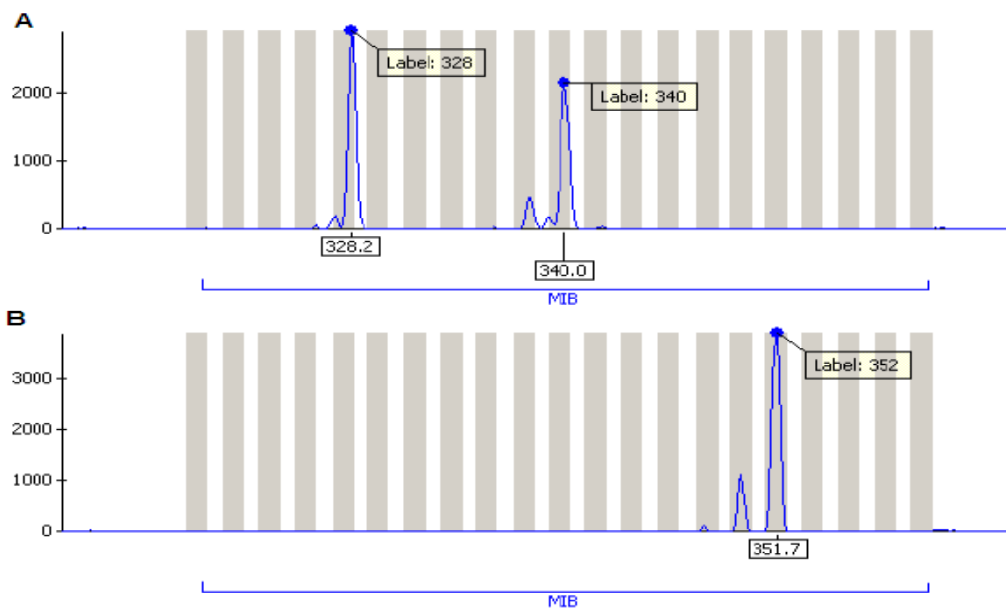


FIGURA 11. Exemplo de análise do programa *Fragment Profiler 1.2*

O *Fragment Profiler 1.2* realizou a análise das corridas eletroforéticas, indicando as amostras em heterozigose (A), e as amostras em homozigose (B) para os alelos dos microssatélites.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

7.1. Cálculo das frequências alélicas e genotípicas

Para cálculo das frequências alélicas e genotípicas foi utilizado o programa *Arlequin 3.11* (EXCOFFIER et al., 2005). No caso das frequências genotípicas, os resultados foram obtidos por contagem direta e comparados segundo o teorema de Hardy-Weinberg, através do método proposto por GUO e THOMPSON (1992). As frequências alélicas tiveram seus cálculos baseados na fórmula:

$$f_{al} = n/2N$$

Sendo:

- f_{al} : frequência alélica (ou frequência de determinado grupo alélico)
- n : frequência absoluta de um alelo ou grupo alélico na amostra
- N : número de indivíduos na amostra. O N é multiplicado por 2 (número máximo de alelos de um gene no mesmo lóco).

7.2. Cálculo das frequências haplotípicas

As frequências haplotípicas foram estimadas a partir do método da máxima verossimilhança, que utiliza o algoritmo da maximização da expectativa (EM), de acordo com o que foi descrito por EXCOFFIER e SLATKIN (1995). Tal método foi empregado através do uso do programa *Arlequin 3.11*, que estimou as frequências haplotípicas, tomando como base as frequências alélicas da determinada amostra.

7.3. Cálculo do desequilíbrio de ligação

O cálculo do desequilíbrio de ligação já foi mencionado em detalhes no item 1.5.1. O estudo será baseado nas tipagens dos cinco microssatélites para este estudo, juntamente com os genes *HLA-A*; *-B* e *-DRB1* previamente tipados. O programa *Arlequin 3.11* realizou a parte estatística, e grau de significância foi avaliado pelo Teste Exato de Fisher, utilizando tabelas de contingência 2x2, com limiar de significância $p \leq 0,05$.

7.4. Comparação entre populações

As comparações de resultados entre populações se ativeram a frequências alélicas. O grau de significância foi menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$) avaliado pelo Teste Exato de Fisher, realizado através do programa *BioEstat 5.0*.

8. RESULTADOS

Para os resultados, os microssatélites foram organizados segundo a ordem em que aparecem localizados nos cromossomos, da região centromérica para a região telomérica, desta maneira tem-se a seguinte ordem:

- Microssatélites da Região MHC de Classe II
 - *D6S2874*
- Microssatélites da Região MHC de Classe III
 - *D6S273*
 - *D6S2792*
- Microssatélites da Região MHC de Classe I
 - *STR_MICA*
 - *HLABC-2CA*

8.1. Frequências alélicas e genotípicas

8.1.1. Microssatélites da Região MHC de Classe II

Na região MHC de Classe II, foi estudado o microssatélite *D6S2874*, sendo identificados nove alelos nesta população, conforme demonstrado na Tabela 07. Na Tabela 08 é possível verificar os resultados das frequências genotípicas.

TABELA 07: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO MARCADOR *D6S2874*

<i>n</i> = 221	
<i>Alelos</i>	<i>Frequência (%)</i>
185	0,91
187	6,79
191	39,82 *
193	37,33
197	0,23
199	0,45
201	4,52
203	4,52
205	5,43

(*) O valor em negrito marca o alelo de maior incidência na população

TABELA 08. DEZ MAIORES FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *D6S2874*

$p_{HW} = \geq 0,05$
 Heterozigosidade: 62,89%
 Diversidade gênica: 69,19%

Genótipos	Frequência (%)
191/193	29,7
191/191	15,9
193/103	13,9
187/191	5,4
187/193	5,1
191/205	4,3
193/205	4,1
191/201	3,6
191/203	3,6
193/201	3,4
Outros	11,0

8.1.2. Microssatélites da Região MHC de Classe III

Na região MHC de Classe II foram estudados dois microssatélites, *D6S273* e *D6S2792*. O *D6S273* apresentou sete alelos na população, e os resultados estão demonstrados na Tabela 09 e 10, enquanto que *D6S2792* teve 14 alelos identificados, conforme apresentados nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 09: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO MARCADOR *D6S273*

$n = 234$

Alelos	Frequência (%)
147	11,3
149	6,8
151	35,2 *
153	16,0
155	22,9
157	4,3
159	3,4

(*) O valor em negrito marca o alelo de maior incidência na população

TABELA 10. DEZ MAIORES FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *D6S273* $p_{HW} = 0,028$

Heterozigosidade: 78,63%

Diversidade gênica: 77,89%

Genótipos	Frequência (%)
151/155	16,1
151/151	12,4
151/153	11,3
147/151	8,0
153/155	7,3
155/155	5,2
147/155	5,2
149/151	4,8
147/153	3,6
149/155	3,1
Outros	23,0

TABELA 11: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO MARCADOR *D6S2792* $n = 222$

Alelos	Frequência (%)
99	2,3
101	18,9
103	2,0
105	8,8
107	5,4
109	20,3 *
111	14,4
113	1,6
115	2,5
117	9,5
119	10,8
121	0,9
123	2,3
125	0,6

(*) O valor em negrito marca o alelo de maior incidência na população

TABELA 12. DEZ MAIORES FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DE *D6S2792*

$p_{HW} = 0,10$
 Heterozigosidade: 86,48%
 Diversidade gênica: 87,00%

Genótipos	Frequência (%)
101/109	7,7
109/111	5,9
101/111	5,5
109/119	4,4
109/109	4,1
101/119	4,1
109/117	3,8
101/117	3,6
105/109	3,6
101/105	3,3
Outros	54,0

8.1.3. Microssatélites da Região MHC de Classe I

Na região MHC de Classe II, foram estudados os microssatélites *STR_MICA* e *HLABC-2CA*. O *STR_MICA* tem sete alelos descritos na literatura científica, destes, cinco estiveram presentes na amostra populacional (A4, A5, A5.1, A6 e A9), detalhados na Tabela 13 e Tabela 14, respectivamente as frequências alélicas e genotípicas.

Já o marcador *HLABC-2CA* foi o que apresentou a maior quantidade de alelos, entre todos os marcadores estudados, com um total de 22, conforme demonstrados na Tabela 15 e 16.

TABELA 13: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO MARCADOR *STR_MICA*

$n = 184$

Alelos	Frequência (%)
A4	10,0
A5	12,1
A5.1	25,3
A6	28,5 *
A9	24,2

(*) O valor em negrito marca o alelo de maior incidência na população

TABELA 14. DEZ GENÓTIPOS MAIS FREQUENTES DE *STR_MICA* $p_{HW} = 0,049$

Heterozigosidade: 75,00%

Diversidade gênica: 77,44%

Genótipos	Frequência (%)
A5.1/A6	14,3
A6/A9	13,9
A5.1/A9	11,0
A6/A6	8,3
A5/A6	7,0
A5.1/A5.1	6,1
A5/A5.1	6,1
A5/A9	5,9
A9/A9	5,9
A4/A6	5,9
Outros	15,7

TABELA 15: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO MARCADOR *HLABC-2CA* $n = 225$

Alelos	Frequência (%)
89	0,7
91	0,2
93	1,8
95	1,3
97	0,4
99	6,2
101	5,3
103	7,9
105	2,4
107	8,4 *
109	4,0
111	7,7
113	4,6
115	8,8
117	6,2
119	6,6
121	6,6
123	7,3
125	7,7
127	3,3
129	1,5
131	1,1

TABELA 16. DEZ GENÓTIPOS MAIS FREQUENTES DE *HLABC-2CA*

$p_{HW} = 0,010$
 Heterozigosidade: 88,00%
 Diversidade gênica: 93,83%

Genótipos	Frequência (%)
107/111	1,5
103/115	1,4
111/115	1,4
103/107	1,3
115/125	1,3
107/111	1,3
115/123	1,3
107/125	1,3
103/111	1,2
107/123	1,2
Outros	86,8

8.2. Frequências haplotípicas entre microssatélites combinados

Para as possíveis frequências haplotípicas, foram combinados os resultados dos microssatélites pertencentes a mesma região do MHC e levados ao programa *Arlequin 3.11*. Foram agrupados os marcadores *D6S273* e *D6S2792*, da região MHC de Classe III, e *STR_MICA* e *HLABC-2CA*, da região MHC de Classe I. A região MHC de Classe II esteve representada apenas pelo marcador *D6S2874*, e não foi possível combiná-lo com outro marcador.

- *D6S273* e *D6S2792*

Foram genotipadas 190 amostras para ambos os microssatélites, das quais foram obtidos 55 haplótipos diferentes. Os dez haplótipos de maior incidência, contidos foram estimados em 51,63% do total, sendo *151/111* o mais frequente com 8,22% (Tabela 12)

- *STR_MICA* e *HLABC-2CA*

Foram selecionadas 153 amostras contendo estes dois marcadores, resultando de 66 haplótipos diferentes. O haplótipo de maior frequência foi o *A6/125*, com 5,81%. Os dez haplótipos mais frequentes tiveram 33,73% do total (Tabela 13).

TABELA 17: FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ESTIMADAS DE *D6S273/D6S2792*

<i>n = 190</i>	
Haplótipos	Frequências (%)
151/111	8,2
151/101	8,1
151/109	7,4
155/101	4,6
153/117	4,6
153/109	4,2
155/119	3,9
147/109	3,6
151/117	3,6
155/109	3,5

TABELA 18: FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ESTIMADAS DE *STR_MICA/HLABC-2CA*

<i>n = 153</i>	
Haplótipos	Frequências (%)
A6/125	5,8
A6/103	4,1
A5.1/111	4,0
A5.1/107	3,3
A9/123	3,0
A9/127	2,9
A9/115	2,8
A5.1/115	2,7
A9/107	2,6
A6/115	2,5

8.3. Frequências haplotípicas entre microssatélites e genes *HLA*

Para cada microssatélite em estudo, foram realizadas combinações dos haplótipos obtidos com frequência alélica igual ou superior a 2% na população, com os grupos alélicos dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*. Os resultados podem ser visualizados nas Tabelas 19, 20 e 21

TABELA 19: HAPLÓTIPOS ESTIMADOS ENVOLVENDO GRUPOS ALÉLICOS DO GENE *HLA-A* E OS ALELOS DOS MICROSSATÉLITES ESTUDADOS

<u>D6S2874</u>		<u>D6S273</u>		<u>D6S2792</u>		<u>STR MICA</u>		<u>HLABC-2CA</u>	
<i>Haplot.</i>	<i>Freq.</i> (%)	<i>Haplot.</i>	<i>Freq.</i> (%)	<i>Haplot.</i>	<i>Freq.</i> (%)	<i>Haplot.</i>	<i>Freq.</i> (%)	<i>Haplot.</i>	<i>Freq.</i> (%)
01/191	3,0	01/155	2,3	01/101	4,0	01/A5.1	3,2	01/107	2,6
01/193	4,3	02/147	2,8	02/101	5,4	02/A4	2,5	02/99	2,2
02/191	10,2	02/149	3,4	02/105	3,0	02/A5.1	4,0	02/103	3,2
02/193	10,0	02/151	9,0	02/109	5,3	02/A6	7,2	02/111	3,2
02/203	3,0	02/153	5,2	02/111	4,4	02/A9	5,8	02/115	4,0
02/205	2,6	02/155	6,1	02/119	4,1	03/A5.1	2,9	02/123	2,4
03/193	3,4	03/151	2,8	30/111	2,4	11/A9	2,2	02/125	2,1
23/191	2,6	23/151	4,5	68/109	4,8	23/A6	3,9	23/115	2,3
23/193	2,8	24/155	2,4			24/A5	2,5		
24/191	2,6	31/151	3,1			24/A9	2,3		
24/193	3,0	33/151	2,6			29/A6	2,4		
29/191	2,7	68/151	3,3			30/A5.1	2,7		
30/191	2,9					30/A6	2,5		
33/193	2,9					33/A5.1	2,2		
68/191	2,9					33/A6	2,1		
68/193	2,7					68/A5.1	2,6		
Outros	38,4	Outros	52,5	Outros	66,6	Outros	43,8	Outros	78,0

TABELA 20: HAPLÓTIPOS ESTIMADOS ENVOLVENDO GRUPOS ALÉLICOS DO GENE *HLA-B* E OS ALELOS DOS MICROSSATÉLITES ESTUDADOS

<u>D6S2874</u>		<u>D6S273</u>		<u>D6S2792</u>		<u>STR MICA</u>		<u>HLABC-2CA</u>	
<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>
07/191	3,2	07/155	4,1	07/119	4,2	07/A5.1	7,1	07/111	3,7
07/193	2,5	08/159	2,4	08/101	4,5	08/A5.1	4,1	08/107	3,3
08/193	3,3	14/151	2,3	14/101	2,9	14/A6	4,3	14/103	2,0
14/193	2,8	15/151	2,5	15/101	3,4	15/A5	4,8	15/101	2,9
15/187	2,4	15/155	3,1	15/109	4,3	15/A5.1	4,7	29/107	3,2
15/191	2,7	35/151	3,3	35/101	2,6	18/A4	4,6	44/103	2,2
15/193	2,7	35/153	2,6	35/109	2,6	35/A9	8,7	45/125	2,2
35/191	3,8	35/155	3,0	44/111	2,1	39/A9	2,6	53/115	3,2
35/193	3,4	39/151	3,1	53/109	3,4	44/A5.1	3,5		
39/193	2,1	44/151	2,6			44/A6	4,1		
44/191	5,9	44/153	2,1			49/A6	2,4		
44/193	2,0	44/155	2,4			51/A6	4,1		
51/191	2,9	45/151	2,4			53/A9	4,6		
51/193	3,4	51/155	3,0			58/A9	3,0		
53/191	2,8	53/151	4,0						
53/193	2,3	58/151	2,2						
58/191	2,2								
Outros	49,6	Outros	54,9	Outros	70,0	Outros	40,4	Outros	77,3

TABELA 21: HAPLÓTIPOS ESTIMADOS ENVOLVENDO GRUPOS ALÉLICOS DO GENE *HLA-DRB1* E OS ALELOS DOS MICROSSATÉLITES ESTUDADOS

<i>D6S2874</i>		<i>D6S273</i>		<i>D6S2792</i>		<i>STR MICA</i>		<i>HLABC-2CA</i>	
<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>	<i>Haplot.</i>	<i>Freq. (%)</i>
01/191	5,1	01/151	4,4	01/101	4,1	01/A5.1	2,2	11/123	2,0
01/193	4,4	01/153	2,7	01/109	2,2	01/A6	5,0	13/101	2,5
03/191	3,8	01/155	2,5	03/101	3,1	01/A9	2,8	15/111	2,2
03/193	2,4	03/149	2,3	03/109	2,9	03/A5.1	4,4		
04/191	3,9	04/147	2,5	04/101	2,0	04/A5	3,3		
04/193	3,7	04/155	2,5	04/109	2,2	04/A9	3,1		
07/191	5,5	07/151	3,9	07/111	2,8	07/A5.1	2,8		
07/193	2,1	08/151	4,9	08/109	3,3	07/A6	2,2		
08/193	2,7	08/153	2,1	11/111	2,1	07/A9	2,1		
11/191	3,5	11/151	3,2	13/101	2,9	08/A6	3,0		
11/193	5,5	11/153	4,1	13/105	2,6	11/A5.1	2,6		
13/191	5,3	13/151	3,9	13/109	2,3	11/A6	2,8		
13/193	8,6	13/155	6,2	13/119	3,1	13/A5.1	5,0		
15/191	6,0	15/147	2,5	15/111	2,6	13/A6	3,9		
15/193	3,8	15/151	3,6	15/119	3,1	13/A9	4,7		
16/193	2,1	16/151	2,1			15/A4	2,2		
						A5/A5.1	2,5		
						15/A6	3,4		
						15/A9	3,3		
						16/A5	2,1		
Outros	31,6	Outros	46,6	Outros	58,7	Outros	38,7	Outros	93,3

8.4. Microssatélites e desequilíbrio de ligação com genes *HLA*

Conforme já descrito na metodologia, o desequilíbrio de ligação foi calculado baseado nas tipagens dos microssatélites deste estudo e dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* previamente tipificados.

Os resultados para o desequilíbrio de ligação foram ilustrados baseados no trabalho de SANTOS (2005). Os significados das cores estão representados em detalhe na Figura 12. Os valores para as associações em desequilíbrio de ligação positivo variaram de +0.20 a +1.00, enquanto que o desequilíbrio de ligação negativo foi de -0.01 a -1.00. Para as associações em equilíbrio de ligação, foram considerados valores de 0.00 a +0.19.

Neste estudo, foram analisadas apenas as associações que apresentaram valores estaticamente significativos, com $p \leq 0,05$. As demais associações que não se enquadraram neste limiar, foram agrupadas no mesmo grupo das associações em equilíbrio (0.00 a +0.19) para fins de representação nas ilustrações em cores.

O marcador *D6S2874* foi excluído da análise por não ter apresentado conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weiberg. Para os demais, foram analisados separadamente com os grupos alélicos do gene *HLA-A*, depois de *HLA-B* e por fim, de *HLA-DRB1*.

	MÁXIMO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO POSITIVO OU ACOPLAMENTO MÁXIMO (+1.00)
	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO POSITIVO OU ACOPLAMENTO (DE +0.70 A +0.99)
	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO POSITIVO OU ACOPLAMENTO (DE +0.20 A +0.69)
	EQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO OU DESEQUILÍBRIO NÃO SIGNIFICATIVO (DE 0.00 A +0.19)
	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO NEGATIVO OU REPULSÃO (DE -0.01 A -0.99)
	MÁXIMO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO NEGATIVO OU REPULSÃO MÁXIMA (-1.00)

FIGURA 12. Referência das cores para análise de desequilíbrio de ligação

As cores ilustram as associações dos alelos dos microssatélites em estudo com os grupos alélicos dos genes *HLA-A*; *HLA-B* e *HLA-DRB1*. Alelos em equilíbrio de ligação são agrupados juntamente com os resultados não significativos estatisticamente [Adaptado de SENS-ABUÁZAR, 2008].

▪ *Associações entre marcadores e o gene HLA-A*

D6S273: Os valores para D' mais altos foram para acoplamentos foram: $D6S273*151$ -HLA-A23 [+0.38]; $D6S273*147$ - HLA-A32 [+0.37]; e $D6S273*151$ -HLA-A31 [+0.36]. Foi verificado ainda sete repulsões máximas, conforme mostrado na Figura 13.

		GRUPOS ALÉLICOS DE HLA-A																			
		01	02	03	11	23	24	25	26	29	30	31	32	33	34	36	66	68	69	74	80
147				■									■								
149		■															■				
151						■						■	■				■				
153						■											■				
155					■															■	
157			■																		■
159		■	■																		

FIGURA 13. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de HLA-A com D6S273

D6S2792: foram verificados dois acoplamentos máximos [$D'=+1.00$]: $D6S2792*105$ -HLA-A69; e $D6S2792*119$ - HLA-A34; e também 10 repulsões máximas, conforme Figura 14.

		GRUPOS ALÉLICOS DE HLA-A																			
		01	02	03	11	23	24	25	26	29	30	31	32	33	34	36	66	68	69	74	80
99		■	■																		
101		■			■							■							■		■
103																					
105																■			■		
107			■														■			■	
109				■	■					■									■		
111						■					■										
113									■		■						■				
115																					
117										■											
119		■				■												■			
121				■					■				■								
123																					
125										■											

FIGURA 14. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de HLA-A com D6S2792

STR_MICA: nas associações com o gene HLA-A, apenas $STR_MICA*A9$ -HLA-A80 apresentou $D'=+1.00$, enquanto que o $STR_MICA*A4$ -HLA-A63 apresentou $D'=+0.63$. Houve ainda cinco associações com $D'=-1.00$ (Figura 15).

		GRUPOS ALÉLICOS DE HLA-A																			
		01	02	03	11	23	24	25	26	29	30	31	32	33	34	36	66	68	69	74	80
A4								■													
A5							■				■		■					■			
A5.1		■	■									■									
A6						■	■				■										
A9					■					■							■				■

FIGURA 15. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de HLA-A com STR_MICA

HLABC-2CA: as associações apresentaram no geral baixo valor para D'. Apenas *HLABC-2CA*103-HLA-A25* e *HLABC-2CA*103-HLA-A25* apresentaram acoplamento máximo, enquanto que *HLABC-2CA*103-HLA-A25* e *HLABC-2CA*103-HLA-A25* tiveram $D' = +0.64$. Foi possível verificar também dois haplótipos em repulsão máxima (Figura 16).

		GRUPOS ALÉLICOS DE HLA-A																			
		01	02	03	11	23	24	25	26	29	30	31	32	33	34	36	66	68	69	74	80
89			■																		
91																					
93							■														
95					■																
97							■			■											
99								■													
101																					
103								■					■								
105											■										■
107		■	■																		
109																					
111			■																		
113			■									■									
115		■	■	■	■											■					
117																					■
119																■					
121									■												
123																	■				
125																					
127			■																		■
129		■	■																		
131				■																	

FIGURA 16. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de HLA-A com HLABC-2CA

- *Associações entre marcadores e o gene HLA-B*

D6S273: apresentou um desequilíbrio de ligação mais pronunciado com o gene *HLA-B*. Os valores para D' foram mais altos para *D6S273*151- HLA-B41* [+0.78]; *D6S273*159- HLA-B08* [+0.67]; e *D6S273*147- HLA-B42* [+0.63]. Ocorreram ainda sete repulsões máximas, conforme a Figura 17.

		GRUPOS ALÉLICOS DE HLA-B																												
		07	08	13	14	15	18	27	35	37	38	39	40	41	42	44	45	47	48	49	50	51	52	53	55	56	57	58	81	
147													■		■															
149				■				■																						
151		■						■				■		■			■					■		■						■
153			■				■	■																■		■	■			
155		■				■						■				■				■			■		■					
157											■																			
159			■																											

FIGURA 17. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de HLA-B com D6S273

D6S2792: apresentou forte desequilíbrio de ligação com *HLA-B*. Foram cinco acoplamentos máximos [$D'=+1.00$]: *D6S2792*99-HLA-B48*; *D6S2792*111- HLA-B81*; *D6S2792*115-HLA-B37*; *D6S2792*117-HLA-B37*; e *D6S2792*125-HLA-B39*. Adicionalmente, apresentou ainda quatro associações com alto valor para D' : *D6S2792*111-HLA-B13* [$+0.81$]; *D6S2792*101-HLA-B08* [$+0.75$]; *D6S2792*107-HLA-B50* [$+0.74$]; e *D6S2792*117-HLA-B56* [$+0.74$]. Por fim, também foi verificado o máximo desequilíbrio de ligação negativo, com 10 associações (Figura 18)

GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-B</i>	
	07 08 13 14 15 18 27 35 37 38 39 40 41 42 44 45 47 48 49 50 51 52 53 55 56 57 58 81
99	
101	
103	
105	
107	
109	
111	
113	
115	
117	
119	
121	
123	
124	

FIGURA 18. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de *HLA-B* com *D6S2792*

STR_MICA: a associação entre os alelos deste microssatélite com os grupos alélicos do gene *HLA-B* foram bastante intensas. No total foram sete acoplamentos máximos [$D'=+1.00$] e outras cinco associações com $D' \geq 0.75$. Adicionalmente, foi possível constatar 17 respulsões máximas, conforme demonstrado na Figura 19.

Na Tabela 22 estão relacionados todas as associações com valores para D' expressivos, tanto de acoplamento quanto de repulsões.

GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-B</i>	
	07 08 13 14 15 18 27 35 37 38 39 40 41 42 44 45 47 48 49 50 51 52 53 55 56 57 58 81
A4	
A5	
A5.1	
A6	
A9	

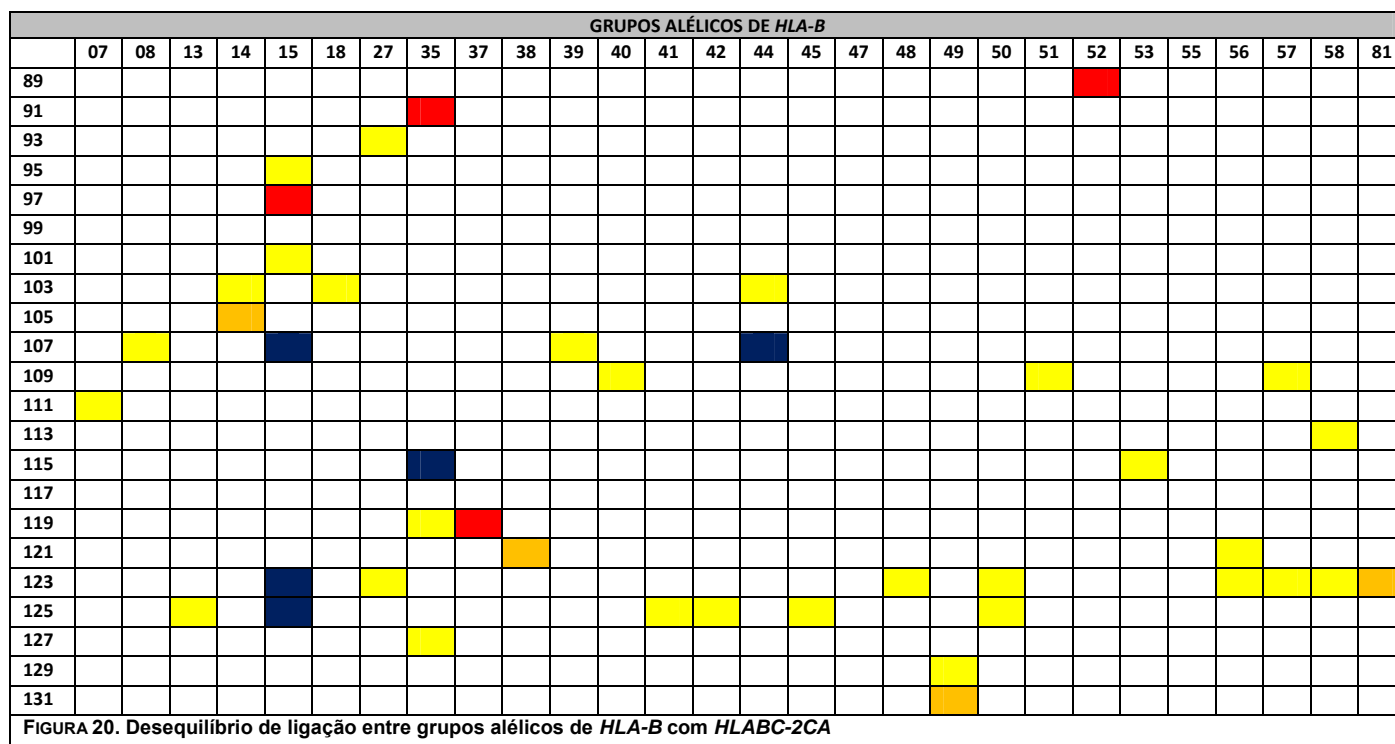
FIGURA 19. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de *HLA-B* com *STR_MICA*

TABELA 22: RESULTADOS ENCONTRADOS NAS ASSOCIAÇÕES ENTRE *STR_MICA* E GRUPOS ALÉLICOS DO GENE *HLA-B*

Haplótipos	Valor para D'	Associação
<i>STR_MICA</i> *A4- <i>HLA-B18</i>	+1.00	Acoplamento máximo
<i>STR_MICA</i> *A4- <i>HLA-B55</i>	+1.00	Acoplamento máximo
<i>STR_MICA</i> *A4- <i>HLA-B56</i>	+1.00	Acoplamento máximo
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B37</i>	+1.00	Acoplamento máximo
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B42</i>	+1.00	Acoplamento máximo
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B49</i>	+1.00	Acoplamento máximo
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B50</i>	+1.00	Acoplamento máximo
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B51</i>	+0.90	Acoplamento
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B58</i>	+0.89	Acoplamento
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B14</i>	+0.78	Acoplamento
<i>STR_MICA</i> *A4- <i>HLA-B27</i>	+0.75	Acoplamento
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B53</i>	+0.75	Acoplamento
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B14</i>	-0.79	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B53</i>	-0.81	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B15</i>	-0.82	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B07</i>	-0.85	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B51</i>	-0.85	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B07</i>	-0.88	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B15</i>	-0.89	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B35</i>	-0.90	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B07</i>	-0.91	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B35</i>	-0.91	Repulsão
<i>STR_MICA</i> *A4- <i>HLA-B15</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A4- <i>HLA-B35</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A5- <i>HLA-B07</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A5- <i>HLA-B44</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B18</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B39</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B45</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B51</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A5.1- <i>HLA-B58</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B08</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B18</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B27</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A6- <i>HLA-B40</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B14</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B18</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B40</i>	-1.00	Repulsão máxima
<i>STR_MICA</i> *A9- <i>HLA-B44</i>	-1.00	Repulsão máxima

Nesta tabela constam apenas os haplótipos com o valor de D' entre +0.75 e +1.00, e entre -0.75 e -1.00.

HLABC-2CA: apresentou associações com máximo acoplamento, como foi o caso de *HLABC-2CA*89-HLA-B52*; e *HLABC-2CA*92-HLA-B15*. Também foi verificado valores expressivos de D', onde tivemos: *HLABC-2CA*111-HLA-B55* [+0.82]; *HLABC-2CA*121-HLA-B38* [+0.82]; *HLABC-2CA*131-HLA-B49* [+0.79]; *HLABC-2CA*123-HLA-B81* [+0.73]; e *HLABC-2CA*125-HLA-B04* [+0.71]. Por fim, foram identificadas cinco repulsões máximas, conforme demonstrado na Figura 20.



- *Associações entre marcadores e o gene HLA-B*

D6S273: as associações apresentaram baixos maiores valores de D', sendo os maiores: *D6S273*159-HLA-DRB1*03* [+0.46]; e *D6S273*151- HLA-DRB1*14* [+0.41]. Foi possível verificar também quatro repulsões máximas, demonstrado na Figura 21.

D6S2792: apresentou duas associações com alto valor para D': *D6S2792*103-HLA-DRB1*13* [+0.87]; e *D6S2792*109- HLA-DRB1*10* [+0.79], e 10 associações de máximo desequilíbrio de ligação negativo, conforme verificado na Figura 22.

GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DRB1</i>													
	01	03	04	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
147					■		■						
149	■	■											
151			■		■				■		■		
153		■						■			■	■	
155					■			■		■			
157													
159		■											

FIGURA 21. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de *HLA-DRB1* com *D6S273*

GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DRB1</i>													
	01	03	04	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
99													
101	■	■						■					■
103										■			
105	■	■	■						■				
107				■									
109					■		■					■	■
111			■										
113								■					
115													
117		■		■									
119		■			■		■					■	
121													
123													
125			■				■						

FIGURA 22. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de *HLA-DRB1* com *D6S2792*

STR_MICA: o máximo valor de D' para as associações com o gene *HLA-DRB1* foi de +0.40, entretanto foi possível notar quatro haplótipos em máximo desequilíbrio de ligação negativo, representado abaixo na Figura 23.

GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DRB1</i>													
	01	03	04	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
A4													
A5	■	■	■							■			■
A5.1		■				■							
A6	■												
A9								■					■

FIGURA 23. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de *HLA-DRB1* com *STR_MICA*

HLABC-2CA: apresentou apenas um acoplamento máximo, o haplótipo *HLABC-2CA*91-HLA-DRB1*14*, e um valor razoável para D' com a associação *HLABC-*

2CA*89-*HLA-DRB1**12 [+0.66]. Entretanto, pode-se notar oito repulsões máximas, conforme abaixo na Figura 24.

GRUPOS ALÉLICOS DE <i>HLA-DRB1</i>		01	03	04	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
89										+				
91												-		
93							+							
95	+													
97												+		
99														
101											+			
103			-											
105								+						
107									-				-	+
109			+											
111			-	-										
113														
115			-					+						
117							+					-		
119														
121														
123														
125				-										
127													+	
129														
131													+	

FIGURA 24. Desequilíbrio de ligação entre grupos alélicos de *HLA-A* com *HLABC-2CA*

9. DISCUSSÃO

9.1. Frequências Alélicas e Genotípicas

Os microssatélites têm demonstrado inúmeras aplicações em diversos ramos da genética e biotecnologia. A aplicação destes em estudos populacionais também tem contribuído para uma melhor compreensão da dinâmica das populações. Um dos objetivos centrais deste estudo com microssatélites foi estimar as frequências alélicas e genotípicas dos marcadores *D6S2874*, *D6S273*, *D6S2792*, *STR_MICA* e *HLABC-2CA*, e de posse destes dados, estabelecer comparações com uma amostra caucasóide previamente coletada na mesma região assim como com amostras de outras populações mundiais relacionadas na literatura.

O marcador *HLABC-2CA* demonstrou ser, dentre todos, o mais polimórfico, pois além do número relativamente alto de alelos identificados (22), também apresentou a maior heterozigosidade observada (88%), e diversidade gênica (93,83%). Estes números também foram semelhantes aos encontrados por SENS-ABUÁZAR (2008) em uma amostra de caucasóides da mesma região, que para 22 alelos identificados encontrou 90,8% de heterozigosidade, e 93% de diversidade gênica. Em estudos com outras populações também foi possível ter um panorama parecido, como em ameríndios, no estudo de Guarani Ñandeva reportado por OLIVEIRA (2007), com 92,4% de heterozigosidade observada e 89% de diversidade gênica. BELTRAME (2005), estudando uma amostra populacional de euro-brasileiros do sul do Brasil, encontrou 20 alelos para *HLABC-2CA*.

A população afro-descendente apresentou diferenças significativas com as três populações mencionadas (caucasóides, Guarani Ñandeva e euro-brasileira), conforme demonstrado na Tabela 23. Foram, ao todo, 10 alelos de caucasóides, seis de Guarani Ñandeva e seis de euro-brasileira que apresentaram um valor estatisticamente significativo em relação à nossa população em estudo. Nas frequências genotípicas, SENS-ABUÁZAR (2008) encontrou apenas um genótipo próximo ao patamar de 5% de frequência (119/113), além de outros acima dos 2%, diferentemente da população afro-descendente, onde todos tiveram frequências abaixo dos 2%, sendo o de maior frequência o genótipo 107/115 (1,5%).

TABELA 23: COMPARATIVO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E AS POPULAÇÕES CAUCASÓIDE, GUARANI ÑANDEVA E EURO-BRASILEIRA PARA O MICROSSATÉLITE *HLABC-2CA*

Alelos de <i>HLABC-2CA</i>	Afro-Descendente (n= 225)	Outras Populações					
		Caucasóide (n= 289)	<i>p</i>	Guarani Ñandeva (n=84)	<i>p</i>	Euro-Brasileira (n=117)	<i>p</i>
89	0,7	0,0	0,43	0,0	1,00	0,0	1,00
91	0,2	0,0	1,00	18,1	<10 ⁻⁶	0,4	1,00
93	1,8	0,0	0,04	0,0	0,58	0,0	0,31
95	1,3	2,5	0,31	0,0	1,00	3,8	0,18
97	0,4	0,7	0,51	0,0	1,00	0,4	1,00
99	6,2	0,3	<10 ⁻⁶	0,0	0,03	0,0	0,01
101	5,3	7,0	0,46	1,2	0,20	3,8	0,78
103	7,9	2,2	0,01	1,2	0,05	1,7	0,02
105	2,4	7,3	0,02	0,6	0,33	6,3	0,12
107	8,4	2,2	<10 ⁻⁶	1,8	0,03	1,4	0,01
109	4,0	12,4	<10 ⁻⁶	13,9	0,02	11,2	0,02
111	7,7	7,0	0,86	15,1	0,13	5,9	0,65
113	4,6	11,0	0,02	7,2	0,39	13,0	0,01
115	8,9	2,6	<10 ⁻⁶	0,6	<10 ⁻⁶	5,6	0,39
117	6,2	3,6	0,28	12,7	0,15	3,5	0,60
119	6,6	3,4	0,13	0,0	0,02	2,1	0,10
121	6,6	5,2	0,71	9,0	0,61	7,0	0,82
123	7,3	9,4	0,52	10,2	0,63	9,4	0,67
125	7,7	6,2	0,48	4,2	0,30	6,6	0,82
127	3,3	8,2	0,04	0,6	0,20	8,8	0,04
129	1,5	5,2	0,03	3,6	0,35	3,1	0,40
131	1,1	1,6	0,70	0,0	1,00	2,4	0,60
133	0,0	1,2	0,26	0,0	1,00	1,7	0,33
135	0,0	0,8	0,51	0,0	1,00	0,7	1,00
137	0,0	0,0	1,00	0,0	1,00	0,4	1,00
141	0,0	0,0	1,00	0,0	1,00	0,4	1,00
151	0,0	0,0	1,00	0,0	1,00	0,4	1,00
<i>p</i>			<10 ⁻³		<10 ⁻³		<10 ⁻³

n: número de amostras analisadas

Caucasóide: estudo de SENS-ABUÁZAR, 2008.

Guarani Ñandeva: estudo de OLIVEIRA, 2007

Euro-Brasileira: estudo de BELTRAME, 2005

■ Diferenças significativas em relação aos dados obtidos da população afro-descendente ($p > 0,05$)

■ Alelo mais frequente na população

Em relação ao microssatélite *STR_MICA*, a literatura científica descreve oito alelos (*A4*, *A5*, *A5.1*, *A6*, *A7*, *A9* e *A10*), sendo que em nossos estudo, não foram identificados apenas os alelos *A7* e *A10*. Estes últimos são raros e foram encontrados apenas em estudos de ameríndios, conforme descreve OLIVEIRA (2007) em Guarani M'byá e Kaingangue do Ivaí, ou ainda em populações chinesas, como constata-se no trabalho de TIAN et al. (2006).

Comparando as frequências alélicas deste microssatélite com estudos em outras populações, foi verificado que não existem diferenças significativas entre as nossas amostras e as amostras estudadas por SENS-ABUÁZAR (2008), ou ainda com outras populações de origem europeia, como a croata, do estudo de GRUBIC et al. (2006), a Italiana, do estudo de BOLOGNESI et al. (2001), ou ainda a euro-brasileira do sul do Brasil, do estudo de BELTRAME (2005), sendo sempre os alelos mais frequentes *A5.1* e *A6*, mas sem diferença estatística, conforme demonstrado nas Tabelas 24 e 25.

No entanto, ao comparar a população afro-descendente com a amostra de Kaingang do Ivaí, do estudo de OLIVEIRA (2007), foram constatadas diferenças estatísticas significativas em todos os alelos, com o alelo *A10* presente em 22,2% e, o contraponto, o alelo *A4*, com incidência abaixo do 1%, diferentemente das outras populações mencionadas, o que pode ser inferido como um possível fluxo gênico deste alelo proveniente de outras populações. Já em relação à população chinesa, do estudo de FENG et al. (2004), observa-se diferença significativa para o alelo *A5*.

A heterozigiosidade observada para *STR_MICA* foi de 75% enquanto que a diversidade gênica foi 77,44%, valores muito próximos aos encontrados por SENS-ABUÁZAR (2008) na população caucasóide da mesma região (heterozigiosidade observada: 77,6%; diversidade gênica: 76,8%). Diferentemente, em ameríndios, OLIVEIRA (2007) relatou valores que variaram de 41,3% a 59% para heterozigiosidade observada e de 40% a 67% de diversidade gênica.

Estudos tem mostrado que microssatélites localizados próximos aos genes HLA clássicos possuem maior polimorfismo (MALKKI et al., 2005), como no caso do *HLABC-2CA*, que se localiza entre o *HLA-A* e *HLA-C*, ou ainda próximos a *HLA-B*, como no caso de *STR_MICA*, localizado numa região que está sempre sob ação de seleção natural balanceadora (SLATKIN, 1995).

TABELA 24: COMPARATIVO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E AS POPULAÇÕES CAUCASÓIDE, KAINGANG DO IVAÍ E CROATAS PARA O MICROSSATÉLITE *STR_MICA*

Alelos de <i>STR_MICA</i>	Afro-Descendente (n= 184)	Outras Populações					
		Caucasóide (n= 245)	<i>p</i>	Kaingang do Ivaí (n=130)	<i>p</i>	Croatas (n=176)	<i>p</i>
A4	10,0	7,6	0,48	0,8	<10 ⁻⁶	17,3	0,09
A5	12,1	14,6	0,57	34,5	<10 ⁻⁶	10,2	0,61
A5.1	25,3	29,2	0,52	0,0	<10 ⁻⁶	27,5	0,73
A6	28,5	27,8	1,00	2,4	<10 ⁻⁶	26,0	0,73
A9	24,2	20,8	0,56	40,1	0,03	19,0	0,38
A10	0,0	0,0	1,00	22,2	<10 ⁻⁶	0,0	1,00
<i>p</i>		0,79		<10⁻³		0,35	

n: número de amostras analisadas

Caucasóide: estudo de SENS-ABUÁZAR, 2008.

Kaingang do Ivaí: estudo de OLIVEIRA, 2007

Croatas: estudo de GRUBIC et al., 2006

- Diferenças significativas em relação aos dados obtidos da população afro-descendente ($p > 0,05$)
- Alelo mais frequente na população

TABELA 25: COMPARATIVO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E AS POPULAÇÕES ITALIANA, EURO-BRASILEIRA E CHINESA PARA O MICROSSATÉLITE *STR_MICA*

Alelos de <i>STR_MICA</i>	Afro-Descendente (n= 184)	Outras Populações					
		Italiana (n=101)	<i>p</i>	Euro-Brasileira (n=117)	<i>p</i>	Chinesa (n=106)	<i>P</i>
A4	10,0	14,0	0,34	11,0	1,00	13,2	0,43
A5	12,1	13,6	0,85	11,7	1,00	28,8	<10 ⁻⁶
A5.1	25,3	31,6	0,42	27,0	0,79	16,4	0,37
A6	28,5	27,2	1,00	28,0	1,00	14,6	0,08
A9	24,2	13,0	0,09	22,3	0,89	17,0	0,55
A10	0,0	0,0	1,00	0,0	1,00	0,0	1,00
<i>p</i>		0,30		0,99		<10⁻²	

n: número de amostras analisadas

Italiana: estudo de BOLOGNESI et al., 2001

Euro-Brasileira: estudo de BELTRAME, 2005

Chinesa: estudo de FENG et al., 2004

- Diferenças significativas em relação aos dados obtidos da população afro-descendente ($p > 0,05$)
- Alelo mais frequente na população

O marcador *D6S2792* também apresentou uma grande quantidade de alelos na população em estudo. Ao todo foram 14 alelos, variando entre 99 e 125 pb. O alelo mais frequente foi o *D6S2792*109* com 20,3%, e a heterozigiosidade observada e diversidade gênica deste microssatélite atingiram 86,48 e 87%, respectivamente. Em outras populações também foram encontradas uma quantidade similar de alelos, porém com diferenças entre os mais incidentes, como foi o caso de caucasóides em que o alelo *D6S2792*101* foi o mais freqüente (25,1%), mas sem significância estatística conforme a Tabela 26.

TABELA 26: COMPARATIVO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E AS POPULAÇÕES CAUCASÓIDE, CROATA E COREANA PARA O MICROSSATÉLITE *D6S2792*

Alelos de <i>D6S2792</i>	Afro-descendente (n= 222)	Outras Populações					
		Caucasóide (n=281)	<i>p</i>	Croata (n=152)	<i>p</i>	Coreana (n=133)	<i>p</i>
99	2,3	1,7	0,52	0,9	0,41	3,8	0,50
101	18,9	25,1	0,17	16,1	0,69	19,2	0,79
103	2,0	1,9	0,99	1,9	1,00	0,4	0,30
105	8,8	6,2	0,39	5,9	0,32	1,1	<10 ⁻⁶
107	5,4	6,4	0,70	7,8	0,38	1,9	0,15
109	20,3	16,2	0,36	12,8	0,13	30,6	0,06
111	14,4	11,7	0,42	9,8	0,26	8,6	0,30
113	1,6	0,7	0,33	0,0	0,28	0,4	0,31
115	2,5	1,0	0,25	3,6	0,53	2,6	0,99
117	9,5	13,0	0,32	22,3	0,01	11,7	0,85
119	10,8	13,5	0,41	11,5	0,85	10,9	1,00
121	0,9	0,4	1,00	0,0	1,00	0,8	1,00
123	2,3	1,4	0,48	6,5	0,10	4,1	0,50
125	0,6	0,8	1,00	0,3	1,00	0,4	1,00
127	0,0	0,0	1,00	0,0	1,00	0,4	1,00
<i>p</i>		0,50		0,02		0,01	

n: número de amostras analisadas

Caucasóide: estudo de SENS-ABUÁZAR, 2008.

Guarani Nandeva: estudo de GRUBIC et al., 2006

Coreana: estudo de KIM et al., 2000

■ Diferenças significativas em relação aos dados obtidos da população afro-descendente ($p > 0,05$)

■ Alelo mais frequente na população

No entanto, em relação ao estudo de GRUBIC et al (2006) na população croata, o alelo mais frequente (*D6S2792*117*) apresentou diferença significativa. Outra população comparada com este trabalho foi a estudada por KIM et al. (2000) com coreanos, na qual foi verificada diferença significativa entre os dados populacionais.

Na frequência genotípica, foi observado que o genótipo *101/109* foi o mais comum na amostra em estudo, com 7,7%, o que também foi observado no estudo de SENS-ABUÁZAR (2008), onde o mesmo genótipo teve frequência pouco acima dos 7%. Isto nos permite confirmar que as frequências alélicas e genotípicas entre afro-descendentes e caucasóides, para este marcador, estão muito próximas em Curitiba e região metropolitana.

Para o microssatélite *D6S273*, foram identificados sete alelos na amostra afro-descendente, com os tamanhos de fragmentos variando entre 147 e 159 pb. A heterozigotidade observada foi de 78,63%, e a diversidade gênica 77,89%. Na comparação com outras populações, houve diferenças significativas com os estudos de SENS-ABUÁZAR (2008), OLIVEIRA (2007) e BELTRAME (2005) (Tabela 27).

TABELA 27: COMPARATIVO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E AS POPULAÇÕES CAUCASÓIDE, GUARANI ÑANDEVA E EURO-BRASILEIRA PARA O MICROSSATÉLITE *D6S273*

Alelos de <i>D6S273</i>	Afro-Descendente (n= 234)	Outras Populações					
		Caucasóide (n=281)	<i>p</i>	Guarani Ñandeva (n=84)	<i>p</i>	Euro-Brasileira (n=117)	<i>p</i>
147	11,3	7,8	0,22	33,3	$<10^{-6}$	7,6	0,37
149	6,8	5,7	0,85	0,6	0,02	6,8	1,00
151	35,2	21,0	$<10^{-6}$	22,0	0,14	19,1	0,02
153	16,0	24,5	0,66	33,3	0,01	32,6	0,01
155	22,9	30,0	0,18	9,5	0,02	24,6	0,79
157	4,3	3,7	0,82	0,0	0,07	3,0	0,56
159	3,4	7,3	0,07	1,3	0,68	6,3	0,25
<i>p</i>		$<10^{-3}$		$<10^{-3}$		$<10^{-2}$	

n: número de amostras analisadas

Caucasóide: estudo de SENS-ABUÁZAR, 2008.

Guarani Ñandeva: estudo de OLIVEIRA, 2007

Euro-Brasileira: estudo de BELTRAME, 2005

- Diferenças significativas em relação aos dados obtidos da população afro-descendente ($p > 0,05$)
- Alelo mais frequente na população

Em relação à população caucasóide, foi constatada diferença estatística no alelo *D6S273*151* ($p=0,01$), já para a população de Guarani Nandeva, esta diferença ocorreu no alelo *D6S273*147* (o mais incidente nesta população) e também no *D6S273*153*, ambos com valores de $p<10^{-6}$. Em euro-brasileiros, era de se esperar também diferenças no alelo *D6S273*151* ($p=0,02$), porém também ocorreu no alelo *D6S273*153* ($p=0,01$). Nas frequências genótípicas, os dez genótipos mais frequentes somaram 77% do total e o genótipo 151/155 foi o de maior frequência (16,1%), o mesmo encontrado no estudo de SENS-ABUÁZAR (2008), com percentual próximo aos 13%.

Finalmente, o marcador *D6S2874*, o único estudado da região MHC de Classe II, também foi o que apresentou a menor heterozigosidade observada (62,89%), a menor diversidade gênica (69,19%) e também o que apresentou desvio para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW}<10^{-3}$). Hipóteses para explicar esta não conformidade poderiam estar relacionadas a erros na tipagem ou atribuição dos alelos e/ou um possível desequilíbrio de ligação com algum outro gene próximo que esteja sendo selecionado positiva ou negativamente nesta população.

Foram identificados nove alelos, com tamanhos de fragmentos variando de 185 a 205 pb, sendo os mais frequentes *D6S2874*191* e o *D6S2874*193*, respectivamente com 39,82% e 37,33%, muito maior que a frequência de todos os outros alelos. Os resultados obtidos em outras populações corroboram os deste estudo, como foi o estudo de BELTRAME (2005) e também de SENS-ABUÁZAR (2008), o que talvez permita inferir uma seleção positiva para estes dois alelos nestas populações (Tabela 28).

Foram verificadas também diferenças significativas entre este estudo e as três populações anteriormente mencionadas, sempre com $p<10^{-3}$. O alelo *D6S2874*187* apareceu apenas em afro-descendentes, apresentando diferença significativa também em relação às três outras populações, podendo ser talvez um alelo característico deste grupo étnico. Por outro lado, *D6S2874*201* teve uma alta frequência (45,2%) em Guarani Nandeva, o que poderia indicar surgimento neste grupo étnico e posterior passagem para as outras populações, como caucasóides e afro-descendentes, através do fluxo gênico, conforme comenta OLIVEIRA (2007) em seu estudo.

Na frequência genotípica, como era de se esperar, o genótipo mais frequente em afro-descendentes foi 191/193, com 29,7%, assim como ocorreu em

caucasóides com frequência superior a 35%.

TABELA 28: COMPARATIVO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS ENTRE A POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E AS POPULAÇÕES CAUCASÓIDE, GUARANI NĀNDEVA E EURO-BRASILEIRA PARA O MICROSSATÉLITE *D6S2874*

Alelos de <i>D6S2874</i>	Afro-Descendente (n= 221)	Outras Populações					
		Caucasóide (n= 289)	<i>p</i>	Guarani Nāndeva (n=84)	<i>p</i>	Euro-Brasileira (n=117)	<i>p</i>
185	0,9	0,0	0,43	0,0	1,00	0,0	1,00
187	6,8	0,0	<10 ⁻⁶	0,0	0,01	0,0	<10 ⁻⁶
191	39,8	44,0	0,62	16,1	<10 ⁻⁶	44,4	1,00
193	37,3	43,2	0,50	38,7	1,00	41,0	1,00
197	0,2	0,0	1,00	0,0	1,00	0,0	1,00
199	0,5	0,0	0,43	0,0	1,00	0,0	1,00
201	4,5	2,5	0,31	45,2	<10 ⁻⁶	1,3	0,02
203	4,5	4,2	1,00	0,0	0,07	6,8	0,06
205	5,4	1,4	0,03	0,0	0,04	2,5	0,14
207	0,0	4,7	<10 ⁻⁶	0,0	1,00	4,0	0,02
<i>p</i>			<10 ⁻³		<10 ⁻³		<10 ⁻³

n: número de amostras analisadas

Caucasóide: estudo de SENS-ABUÁZAR, 2008.

Guarani Nāndeva: estudo de OLIVEIRA, 2007

Euro-Brasileira: estudo de BELTRAME, 2005

■ Diferenças significativas em relação aos dados obtidos da população afro-descendente ($p > 0,05$)

■ Alelo mais frequente na população

9.2. Frequências Haplotípicas

As frequências haplotípicas foram estimadas pelo programa *Arlequin* 3.11, calculadas por verossimilhança. Os valores que foram gerados são possibilidades (estudos probabilísticos) calculadas com algoritmo da maximização da expectativa – algoritmo EM – descrito por EXCOFFIER E SLATKIN (1995). Os resultados foram baseados nas frequências alélicas dos marcadores em estudo, haja vista que não havia conhecimento da fase gamética das amostras analisadas.

Os marcadores combinados, de acordo com sua localização no MHC, foram: (a) *D6S273* e *D6S2792*; e (b) *STR_MICA* e *HLABC-2CA*. A região MHC de Classe II apresentou apenas o microsatélite *D6S2874* e por isso não foi possível uma

combinação com outro marcador.

Para a combinação *D6S273* e *D6S2792*, num total de 190 amostras, entre os 55 haplótipos diferentes, o mais freqüente foi o *151/111*, (8,2%). Já no estudo de SENS-ABUÁZAR (2008), foram verificados 60 haplótipos diferentes, sendo *155/101* o mais comum, (9,8%). Na região MHC de Classe III, os marcadores *STR_MICA* e *HLABC-2CA*, investigados em 153 amostras, apresentaram como mais freqüente o haplótipo *A6/125* com 5,81% entre todas as 66 haplótipos diferentes estimados, diferente do estudo de caucasóides, onde foi estimado 76 haplótipos, sendo o *A5.1/113* o mais freqüente, com 7,6%.

Assim como foi constatado no trabalho de SENS-ABUÁZAR (2008), a estimativa haplotípica também acabou refletindo o observado nas frequências alélicas, ou seja, os marcadores com maior número de alelos apresentaram maior quantidade de haplótipos com frequências mais baixas. Porém, para *151/111*, o alelo *D6S2792*111* não foi o mais freqüente na população, o mesmo fato constatando-se com o alelo *HLABC-2CA*125*. Esta associação poderia dever-se a um possível desequilíbrio de ligação entre estes alelos.

Os haplótipos mais freqüentes que envolveram associações entre os grupos alélicos do gene *HLA-A* com os alelos dos marcadores estudados foram:

- *D6S2874*: haplótipos *02/191* e *02/193*, com 10,0 e 10,2% respectivamente;
- *D6S73*: haplótipo *02/151*, com 9,0%;
- *D6S2792*: haplótipos *02/101* e *02/109*, com 5,4 e 5,3% respectivamente;
- *STR_MICA*: haplótipo *02/A6*, com 7,2%;
- *HLABC-2CA*: haplótipo *02/115*, com 4,0%

Nesta etapa, não foi possível a comparação com a população caucasóide analisada por SENS-ABUÁZAR (2008), uma vez que esta comparação não foi realizada no estudo anterior.

Para as associações estimadas entre o gene *HLA-B* e os microssatélites em estudo, foram constatados que os haplótipos mais freqüentes para os marcadores *D6S273*, *D6S2792* e *STR_MICA* são os mesmos na população afro-descendente e caucasóide. Adicionalmente, apenas o marcador *D6S273* apresenta diferença significativa entre as duas populações, mas também foi o único a não estar de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg no estudo envolvendo a população afro-descendente (Tabela 29).

Já nas associações com o gene *HLA-DRB1*, as estimativas mostraram que o grupo alélico *HLA-DRB1*13* é o mais frequente em quatro dos cinco microssatélites, diferentemente do que ocorreu com o estudo de caucasóides, que apontou o grupo alélico *HLA-DRB1*03* como sendo o mais frequente em todos os microssatélites comparados. Por fim, as duas populações não tiveram coincidências haplotípicas nesta etapa, como constatado na Tabela 30.

TABELA 29: COMPARATIVO DAS ESTIMATIVAS DOS HAPLÓTIPOS MAIS FREQUENTES ENVOLVENDO O GENE *HLA-B* E OS MICROSSATÉLITES EM ESTUDO NA POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E CAUCASÓIDE

Microssatélites	<u>Afro-Descendentes</u>		<u>Caucasóides</u>	
	Haplótipos	Freq. (%)	Haplótipos	Freq. (%)
<i>D6S2874</i>	44/191	5,9	35/191	8,7
<i>D6S273</i>	07/155	4,1	07/155	8,0
<i>D6S2792</i>	08/101	4,5	08/101	8,3
<i>STR_MICA</i>	35/A9	8,7	35/A9	10,5
<i>HLABC-2CA</i>	07/111	3,7	08/109	7,9

Caucasóide: estudo de SENS-ABUÁZAR, 2008.

Os haplótipos são compostos primeiramente pelo grupo alélico do gene HLA e depois pelo alelo do microssatélite

TABELA 30: COMPARATIVO DAS ESTIMATIVAS DOS HAPLÓTIPOS MAIS FREQUENTES ENVOLVENDO O GENE *HLA-DRB1* E OS MICROSSATÉLITES EM ESTUDO NA POPULAÇÃO AFRO-DESCENDENTE E CAUCASÓIDE

Microssatélites	<u>Afro-Descendentes</u>		<u>Caucasóides</u>	
	Haplótipos	Freq. (%)	Haplótipos	Freq. (%)
<i>D6S2874</i>	13/193	8,6	03/193	10,6
<i>D6S273</i>	13/155	6,2	03/159	6,7
<i>D6S2792</i>	01/101	4,1	03/101	9,5
<i>STR_MICA</i>	01/A6	5,0	03/A5.1	9,1
	13/A5.1	5,0		
<i>HLABC-2CA</i>	13/101	2,5	03/109	8,1

Caucasóide: estudo de SENS-ABUÁZAR, 2008.

Os haplótipos são compostos primeiramente pelo grupo alélico do gene HLA e depois pelo alelo do microssatélite

9.3. Desequilíbrio de Ligação

O desequilíbrio de ligação com os grupos alélicos dos genes *HLA* foi realizado apenas com os microssatélites que apresentaram conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Desta maneira, o microssatélite *D6S2874* foi excluído desta etapa de estudo, pois apresentou o valor de $p_{HW} < 10^{-3}$. As análises destes desequilíbrios nos permitem melhor caracterização da região MHC, obter maiores informações em estudos de genética de populações e auxílio em pesquisas que envolvam doenças relacionadas aos genes *HLA*.

O microssatélite *D6S273* foi o que apresentou, dentre todos os marcadores, o mais fraco desequilíbrio com os genes *HLA*. Em relação aos genes *HLA-A* e -*DRB1*, não foi estimado nenhum acoplamento máximo, e os valores apontaram $D' \leq +0.70$. Sendo com *HLA-B* um desequilíbrio de ligação moderado, com $D' > 0.70$ e sete repulsões máximas. Em caucasóides, SENS-ABUÁZAR (2008) relatou a mesma situação para este marcador em relação aos genes *HLA* de seu estudo (*HLA-B* e *HLA-DRB1*).

O microssatélite *D6S2792* apresentou associações mais acentuadas nos desequilíbrios de ligação. Foram identificados nas associações com *HLA-A*, dois acoplamentos máximos (*D6S2792*105-HLA-A69* e *D6S2792*119-HLA-A34*) e dez repulsões máximas. Os alelos *D6S2792*109* e *D6S2792*119* apresentaram três associações cada. No entanto para o gene *HLA-B*, as associações foram consideradas fortes, com cinco acoplamentos máximos, sendo eles: *D6S2792*99-HLA-B48*; *D6S2792*111-HLA-B81*; *D6S2792*115-HLA-B37*; *D6S2792*117-HLA-B37*; e *D6S2792*125-HLA-B39* e outras 11 repulsões máximas. Já para *HLA-DRB1*, a situação ficou muito similar as associações com *HLA-A*. Em estudo envolvendo caucasóides, SENS-ABUÁZAR (2008) classificou como moderado o desequilíbrio de ligação com *HLA-B*, relatando poucas associações de repulsão máxima e valores de $D' \geq +0.70$ para associações com o gene *HLA-DRB1*, os valores de D' foram baixos.

O marcador *STR_MICA* apresentou moderada associação com *HLA-A*, porém com o gene *HLA-B* os desequilíbrios foram os mais fortes e intensos, dentre todos os marcadores estudados, com altos valores para D' , sete acoplamentos máximos e 17 repulsões máximas. Para *HLA-DRB1*, as associações foram consideradas fracas. SENS-ABUÁZAR (2008) reportou a mesma situação para este marcador, forte ligação com *HLA-B* e fraca com *HLA-DRB1*. As associações haplotípicas *STR-MICA*A4-B18*; *STR-MICA*A5.1-HLA-B07*; *STR-MICA*A5.1-HLA-B08*; *STR-*

*MICA*A5.1-B13*; e *STR-MICA*A6-HLAB-B51* apresentaram $D' > 0.70$ tanto nestas duas populações como também em outras populações mundiais como a italiana (BOLOGNESI, *et al.*, 2001) e a croata (GRUBIC *et al.*, 2006), enquanto que a *STRMICA*A6-HLA-B51* também foi encontrada, além afro-descendentes e caucasóides, em populações de origem chinesa (FENG *et al.*, 2004 e TIEN *et al.*, 2006).

Da mesma maneira que D6S2874 não apresentou conformidade neste estudo, o marcador HLABC-2CA também apresentou o mesmo problema técnico no estudo de SENS-ABUÁZAR (2008), sendo excluído desta etapa do estudo e impossibilitando a análise comparativa com as duas populações. Na população afro-descendente, *HLABC-2CA* apresentou desequilíbrio de ligação mais forte com o gene *HLA-B*, onde foram identificados quatro acoplamentos máximos e cinco repulsões máximas. Adicionalmente, algumas associações também apresentaram $D' > 0.70$. Já para o gene *HLA-DRB1* os desequilíbrios apresentaram oito repulsões máximas e apenas um acoplamento máximo, e valores de $D' < 0.70$. As associações com o alelo *HLA-A* foram as mais fracas dentre os três genes associados analisados.

O *HLA-B* apresentou, dentre os três genes *HLA*, os mais elevados valores de desequilíbrio de ligação. O loco deste gene se encontra em situação privilegiada com os microssatélites escolhidos pra estudo, pois sua localização é a mais central na região MHC em relação aos outros genes *HLA* em estudo. A ordem de proximidade dos microssatélites com este gene é: *STR_MICA*, *HLABC-2CA*, *D6S2792* e *D6S273*, refletindo diretamente também na ordem de altos valores de D' , e conseqüentemente, nos fortes resultados de associações.

OLIVEIRA (2007) menciona que tal desequilíbrio pronunciado nas proximidades dos genes *HLA* clássicos poderia estar indicando co-evolução entre estes locos e SENS-ABUÁZAR (2008) cita que esta evolução seria mais rápida devido a constantes acúmulos de mudanças, acentuando o desequilíbrio de ligação, justificando os marcadores mais polimórficos (*HLABC-2CA*, *STR_MICA* e *D6S2792*) e alto desequilíbrio de ligação com *HLA-B*.

A caracterização destas associações (microssatélites e genes *HLA*) foi bastante informativa para um conhecimento maior sobre a população em estudo. Muitos estudos tem se baseado nestas informações para sugerir a aplicação do conhecimento sobre microssatélites no auxílio da seleção doador-receptor em

transplantes de medula óssea, em alguns casos até a substituição da tipagem *HLA* por microssatélites. Entendemos que a tipagem dos microssatélites não substitui de forma alguma a tipagem de alta resolução dos alelos *HLA*. No entanto, acreditamos que a tipagem destes variantes seja uma ferramenta importante para auxiliar casos de ambigüidade fazendo uso dos dados de desequilíbrio de ligação.

10. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram analisados microssatélites da região MHC, aos quais os objetivos foram verificar suas frequências, genótípicas e haplotípicas, bem como possíveis desequilíbrios de ligação com os genes *HLA*. Estas informações são relevantes na busca de marcadores para haplótipos *HLA* específicos. Nas amostras investigadas constatou-se que o microssatélite *HLABC-2CA* foi o marcador mais polimórfico dentre todos os analisados.

As comparações entre amostras de população caucasóide com as amostras deste estudo (população auto classificada afro-descendente), ambas originadas de Curitiba e região metropolitana, possibilitaram verificar diferenças significativas nas frequências de alguns alelos para os marcadores. Para algumas situações, é possível que as misturas das populações não tenham tido tempo hábil para estabelecer uma frequência similar nas duas populações. Em outras situações, a presença de alelos em frequência muito baixa pode sugerir fluxo gênico com a entrada deste alelo provenientes de outros grupos étnicos com frequência significativa.

O desequilíbrio de ligação entre microssatélites e a região *HLA* variou de moderado a acentuado. O *HLA-B* apresentou mais fortemente estas associações com os alelos dos marcadores, sugerindo explicações quanto à localização de seu loco, não tão distante dos marcadores estudados, ou sendo alvo de processos evolutivos a partir de acúmulos rápidos de mudanças.

Os resultados deste estudo mostraram o potencial destes microssatélites como marcadores de haplótipos *HLA*, permitindo uma melhor caracterização destes segmentos em relação ao MHC e no conhecimento de suas frequências em populações afro-descendentes. Fazem-se necessários estudos complementares para que sejam agregadas mais informações importantes a respeito destes marcadores, principalmente para possíveis aplicações laboratoriais.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. : Imunologia celular e molecular. O complexo principal de Histocompatibilidade. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABRAHAM, L.; MARLEY, J.; NEDOSPASOV, S. et al. Microsatellites, RFLP and sequence specific oligonucleotide typing of the TNF region: Comparisons of the 4 AOHW cell panel. Human Immunology, New York, v. 39: 17-23, 1993.

AGUADO, B. MILNER, C.M.; CAMPBELL, R.D. Genes of the MHC class III region and the functions of the proteins they encode. In Browning M.; McMICHAEL, A. HLA and MHC: genes, molecules and function, 1996.

ALBERTS, B.; BRAT, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Biologia Molecular da Célula. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ARDLIE, K.G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of Linkage Disequilibrium in the human genome. Nature Reviews Genetics, London, v. 3, p. 299-309, 2002.

ASLANDIS, C.; JANSEN, G.; ANEMIYA, C.; SHUTLER, G.; MAHADEVAN, M.; TSILFINDS, C. Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. Nature, v. 355: 548-551, 1992.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, v. 392 (6673): 245-252, 1998.

BARNSTABLE, C.J.; JONES, E.A.; CRUMPTON, M.J. Isolation, structure and genetics of HLA-A, -B, -C and DRw (Ia) antigens. British medical bulletin, v. 34 (3): 241-246, 1978.

BELTRAME, M. H. ; OLIVEIRA, L. A. ; PETZL-ERLER, M. L. . Marcadores microsatélites em populações humanas. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (13., 2005, Curitiba). Livros de resumos. Curitiba: UFPR/PRPPG, 2005.

BENACERRAF, B.; MCDEVITT, H.O. Histocompatibility-linked immune response genes. Science, Washington, v. 175: 273-279, 1972.

BODMER, J.G. et al. Nomenclature for factors of the HLA system. Tissue Antigens, Copenhagen, v. 49: 297-321, 1997.

CAMPBELL, R.D.; MILNER, C.M. MHC genes in autoimmunity. Current Opinion in Immunology, London, v. 5, 887-893, 1993.

CAMPBELL, R.D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. *Immunology Today*, v.14 (7): 349-352, 1993.

CROAU-ROY, B.; BOUZEKRI, N.; CARCASSI, C.; CLAYTON, J.; CONTU, L.; CAMBON-THOMSEN, A. Strong association between microsatellites and HLA-B, DR haplotype (BR18-DR3): Implication for microsatellite evolution. *Immunogenetics*, New York, v. 43, 255-260, 1996.

DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. *Acta haematologica*, Warszawa, v. 20, 156-166, 1958.

DAUSSET, J. Leuco agglutinins and blood transfusion. *Vox sanguinis*, Oxford, v. 4, p. 190-194, 1954

DOHERTY, P.C.; ZINKERNAGEL, R.M. Enhanced immunological suiveivance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature*, Basingstoke, v. 256: 50-52, 1975.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, V. 1: 47-50. 2005.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*, v.12 (5): 921-927, 1995.

FOISSAC, A.; CROUAU-ROY, B.; FAURÈ, S.; THOMSEN, M.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: an overview. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 55, p. 197-214, 1997.

FOISSAC, A.; SALHI, M.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 55, p. 477-509, 2000.

FU, Y.H.; KUHL, D.P.; PIZZUTI, A.; PIERETTI, M.; SUTCLIFFE, J.S.; RICHARDS, S. (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, v. 67: 1047-1058, 1991.

GODSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, Oxford, v. 88: 335-342, 1997.

GORER, P.A. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *The Journal of Experimental Biology*, Cambridge, v. 17:42-46, 1936.

GOURRAUD, P. A.; MANO, S.; BARNETCHE, T.; CARRINGTON, M.; INOKO, H.; CAMBON-THOMSEN, A. Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 64, 543-555, 2004.

GRIMALDI, M.C.; CLAYTON, J.; PONTAROTTI, P.; CAMBON-THOMSEN, A.; COUAU-ROY, B. New highly polymorphic microsatellite marker in linkage disequilibrium with HLA-B. *Human Immunology*, New York, v. 51: 89-94, 1996.

GRUBIC', Z.; TINGL, K.; UNEC,R.; CAR, H.; EC;UK-JELIC; IC', E.; BRKLJAC; IC'-KERHIN, V. Linkage disequilibria between human leucocyte antigen-B and closely linked microsatellites in the Croatian population. *Journal Compilation*, v. 69: 86-94, 2006.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, v. 48: 361-372, 1992.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings National Academy Sciences*, Washington, v.79: 6465-9,1982

HAUPTMANN, G.; BAHRAM, S. Genetics of the central MHC. *Current Opinion on Immunology*, London, v. 16, n. 5, p. 668-672, 2004.

HEARNE, C.; GHOSH, S.; TODD, J. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genetics*, Cambridge, v. 8: 288-294, 1992.

HUGHES, A.L.; NEI, M. Pattern of nucleotide at the major histocompatibility complex class I locos reveals overdominant selection. *Nature*, Basingstoke v. 335: 167-170, 1988.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JARDEZKY, T. Crystal structures of MHC class I and class II molecules. In Browning M.; McMICHAEL, A. *HLA and MHC: genes, molecules and function*, 1996.

JAWAHEER, D.; LI, W.; GRAHAM, R. Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v.71, p.585-94, 2002.

JEFFREY, K.H.M.; BANGHAM, C.R.M. Do infections drive MHC diversity? *Microbes and infection*, v. 2: 1335-1341, 2000.

JEFFREYS, A.J.; TAMAKI, K.; MACLEOD, AT. MONCKTON, D.G.; NEIL, D.L.; ARMOUR, J.A.L. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics*, v. 6: 136-145, 1994.

JOHN, S.W.M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. *Nucleic Acids Research*, v. 19, 408, 1991.

JONGENEEL, C.V.; BRIANT, L.; UDALOVA, I.A.; SEVIN, A.; NEDASPASOV, S.A.; CAMBON-THOMSEN, A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to the extended HLA haplotypes. *Immunology, Oxford*, v. 88: 9717-9721, 1991.

KLEIN, J. Antigen-major histocompatibility complex T-cell receptors: inquiries into the immunological ménage à trois. *Immunologic research*, v. 5 (3) 173-190, 1986.

KLEIN, J. Relative importance of H-2 regions in the development of graft-versus-host reactions. *Transplant Proceedings*, v. 8(3):335-338, 1976.

KLEIN, J.; FIGUEROA, F. Evolution of the major histocompatibility complex. *Critical Reviews Immunology, New York*, v. 6: 295-386, 1986.

KLEIN J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. *Advances in immunology. New England Journal of Medicine, Massachusetts*, v. 343 (10):702-709, 2000a.

KLOOR, M.; BECKER, C.; BENNER, A.; WOERNER, S.M.; GEBERT, J.; FERRONE, S.; VON KNEBEL DOEBERITZA, M. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Research*, v.65 (14): 6418-6424, 2005.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGUER, J.I. JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Studies*, v. 19: 5444, 1991.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology Evolution*, v. 4: 203-221, 1987.

LEWONTIN, R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, v. 49: 49-67, 1964.

MACAUBAS, C.; HALLMAYER, J.; KALIL, J.; KIMURA, A.; YASUNAGA, S.; GRUMET, F.C.; MIGNOT, E. Extensive Polymorphism of a (CA)_n microsatellite located in the HLA-DQA1/DQB1 class II region. *Human Immunology, New York*, v. 42, 209-220, 1995.

MONOS, D.; KAMOUN, M.; UDALOVA, I. et al. Genetic polymorphism of the human TNF region in insulin-dependent diabetes mellitus. Linkage disequilibrium of TNFab microsatellite alleles with HLA haplotypes. *Human Immunology*, New York, v. 44: 70-79, 1995.

OLIVEIRA, L.A. Diversidade populacional de microssatélites do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em populações indígenas do Paraná e do Mato Grosso do Sul. Curitiba, 2007. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Genética. Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; MIZUKI, N.; ANDO, H.; FURIHATA, K.; ONO, S.; PIVETTI-PEZZI, P.; TABBARA, K.F.; PALIMERIS, G.D.; NIKBIN, B.; DAVATCHI, F.; CHAMS, H.; GENG, Z.; BAHRAM, S.; INOKO, H. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi, Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 49: 448-454, 1997.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plants Science*, v. 7: 215-222, 1996.

SANTOS, P.S.C. Análise de desequilíbrio de ligação e de frequências haplotípicas HLA-A, HLA-B E HLA-DRB1 na amostra de doadores voluntários de medula óssea do LIGH. Curitiba, 2005. Trabalho de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Bilógicas, Universidade Federal do Paraná.

SATTA, Y.; O'HUIGIN, C.; TAKAHATA, N.; KLEIN, J. Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proceedings National Academy Sciences*, Washington, v. 91: 7184-7188, 1994.

SENS-ABUAZAR, C. Análise de microssatélites da Região MHC em uma amostra de doadores voluntários de medula óssea. Curitiba, 2008. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Genética. Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J.K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 64, p.631-649, 2004.

SIDNEY, J.; GREY, H.M.; SOUTHWOOD, S.; CELIS, E.; WENTWORTH, P.A.; del GUERCIO, M.F.; CHESNUT, R.W. SETTE, A. Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules. *Human immunology*, v. 45 (2): 79-93, 1996.

SMITH, G.P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, v. 191: 528-535, 1976.

SNELL, G.D. Studies in histocompatibility. *Science*, v.213 (4504): 172-178, 1981.

SPIES, T.; MORTON, C.C.; NEDOSPASOV, S.A.; FIERS, W.; PIOUS, D; STROMINGER, J.L. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proceedings National Academy Sciences*, v. 83 (22): 8699-8702, 1986

STRACHAN, T.; READ, A.P. *Genética Molecular Humana*. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

TUATZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 12; 4127-38, 1984.

The anatomy microsatellite": disponível em:

<http://www.asicoaquaticmarkers.com/AnatomyofaMicrosatellite.htm> - Acessado em: 10/04/2009.

The European Bioinformatics Institute (EBI)1: Disponível em:

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/intro.html> - acessado em 30/04/2009.

The European Bioinformatics Institute (EBI)2: Disponível em:

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html> - acessado em 30/04/2009.

TROWSDALE, J. "Both man & bird & beast": comparative organisation of MHC genes. *Immunogenetics*, v. 41: 1-17, 1995.

UDALOVA, I.A.; NEDOSPASOV, S.A; WEBB, G.C; CHAPLIN, D.D; TURETSKAYA, R. Highly informative typing of the Human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics*, v.16: 180-186, 1992.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. *Genética Humana: problemas e abordagens*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000

WELLS, R.S.; PARHAM, P. HLA class I genes: structure and diversity. In Browning M.; McMICHAEL, A. *HLA and MHC: genes, molecules and function*, 1996.

WORWOOD, M. RAHA-CROWDHURY, R.; DARKE, C. Distribution of alleles at D6S105 and D6S265 with possible HLA haplotypes associations. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 44: 322-325, 1994.

YU, A.; ZHAO C.; FAN, Y.; JANG, W.; MUNGALL, A.J.; DELOUKAS, P.; OLSEN, A.; DOGGETT, N.A.; GHEBRANIOUS, N.; BROMAN, K.W.; WEBER, J.L. Comparisons of human genetic and sequence-based physical maps. *Nature*, Basingstoke, v. 409: 951–953, 2001.

WEBER, J.L.; WONGR, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, v. 2: 1123-1128, 1993.

ZINKERNAGEL, R.M.; DOHERTY, P.C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, Basingstoke, v. 248: 701-702, 1974.