

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**BRUNO ZAGONEL PIOVEZAN**

**DIVERSIDADE KIR EM DUAS POPULAÇÕES AMERÍNDIAS DO MATO GROSSO  
DO SUL**

**CURITIBA**

**2007**

**BRUNO ZAGONEL PIOVEZAN**

**DIVERSIDADE KIR EM DUAS POPULAÇÕES AMERÍNDIAS DO MATO GROSSO  
DO SUL**

Monografia apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Petzl-Erler

**CURITIBA**

**2007**

## **AGRADECIMENTOS**

## RESUMO

Os genes *KIR* (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), localizados no cromossomo 19q13.4, codificam receptores pertencentes à superfamília das imunoglobulinas encontrados nas células assassinas naturais (*natural killer* ou NK) e em algumas sub-populações de linfócitos T. Células que apresentam expressão reduzida de moléculas HLA (*human leukocyte antigens*), como as com transformações neoplásicas ou infectadas, não são reconhecidas como próprias e normais devido à ausência de engajamento dos receptores KIR inibidores das células NK. Essa falha de reconhecimento do próprio (*missing-self*) permite que sejam exterminadas. Os genes *KIR*, que codificam esses receptores, são polimórficos e as suas frequências variam amplamente entre populações. Este trabalho teve como objetivo descrever as frequências de 14 genes *KIR* e 2 pseudogenes em Guarani-Ñandeva (GND, n=50) e Guarani-Kaiowá (GKW, n=96), populações ameríndias do Estado do Mato Grosso do Sul. A genotipagem foi realizada através de um método de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene (PCR-SSP). Os genes de moldura, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, e *KIR3DP1* estão presentes em todos os indivíduos das duas amostras analisadas, exceto por um indivíduo GND que não apresentou *KIR3DL2*. A frequência mais baixa observada foi a do gene *KIR2DS3* (4% em GND e 3% em GKW). A frequência de presença dos genes inibidores varia entre 71% e 100% em GND, exceto *KIR2DL2* (21%) e 58% e 100% em GND, exceto *KIR2DL2* (32%). O haplogrupo A apresentou frequência de 62% em GND e 52% em GKW. O gene *KIR2DS4*, único ativador de cauda curta do haplogrupo A, tem alelos não funcionais (*KIR1D*) comuns em algumas populações, de modo que muitos indivíduos homocigotos para o haplogrupo A não apresentam genes *KIR* ativadores de cauda curta. A frequência de *KIR1D* foi 20% e 9% em GND e GKW, respectivamente. Em estudo anterior, observamos ausência de alelos *KIR1D* em Guarani-M'Byá do Estado do Paraná. As duas populações indígenas deste estudo são semelhantes quando comparada entre si e diferentes quando comparadas à população de Curitiba quanto às frequências dos genes *KIR*.

Palavras-chave: Polimorfismo KIR. Célula NK. Ameríndios.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	7
1 INTRODUÇÃO .....	7
1.1 O RECONHECIMENTO DA NORMALIDADE E A FALTA DO PRÓPRIO.....	9
1.2 RECEPTORES DA CÉLULA NK .....	9
1.3 ESTRUTURA E NOMENCLATURA KIR.....	11
1.4 DIVERSIDADE E POLIMORFISMO KIR .....	14
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS .....	17
3 MATERIAIS E METODOS .....	18
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS .....	18
3.2 GENOTIPAGEM.....	18
3.3 ANÁLISE DOS DADOS .....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 FREQUENCIA DOS GENES KIR .....	22
4.2 PRESENÇA DE KIR1D.....	25
4.3 HAPLÓTIPOS KIR .....	27
5. CONCLUSOES .....	31
REFERÊNCIAS.....	32

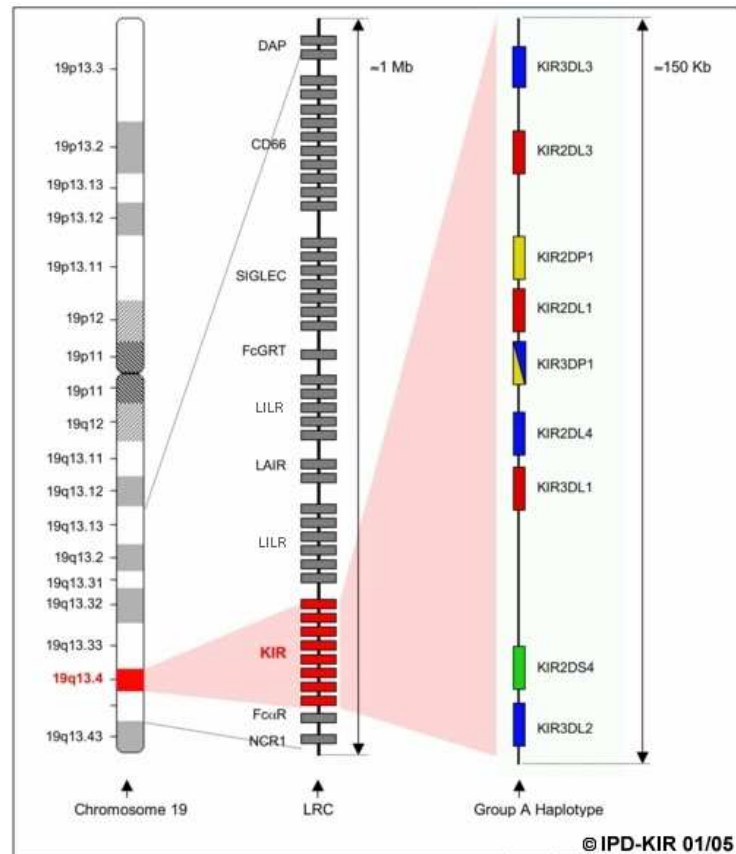
## 1 INTRODUÇÃO

As células NK (*natural killer* ou assassinas naturais) são uma subpopulação de linfócitos granulares que atuam na resposta imune inata destruindo células infectadas ou transformadas. Sua ativação é regulada por um balanço de sinais inibidores e ativadores gerados a partir de diferentes receptores, dentre eles os KIR (receptor da célula NK semelhante à imunoglobulina). Os receptores inibidores das células NK se ligam a moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe I próprias, expressas na maioria das células normais. Por outro lado, os ligantes para os receptores ativadores incluem certas moléculas comumente expressas em diferentes tipos celulares e alguns produtos microbianos. Na presença de sinais inibidores e ativadores a influência inibidora é epistática e a célula NK se encontra inativa, impedindo assim a morte de células normais. A infecção de células por alguns vírus e transformações neoplásicas podem inibir a expressão de moléculas MHC de classe I, levando a perda do sinal inibidor. As células NK então saem do seu estado inibido e as células infectadas ou transformadas são exterminadas.

Os genes *KIR* são expressos nas células NK e subpopulações de linfócitos T (YOUNG et al., 2001) e se encontram no complexo de receptores leucocitários (LRC; FIGURA 1) no cromossomo 19 (19q13.4), que codifica outros receptores da célula NK e moléculas relacionadas que também pertencem a superfamília das imunoglobulinas (KELLEY et al., 2005; WENDE et al., 1999). Já foram descritos 14 genes *KIR* e 2 pseudogenes. Esses se encontram justapostos num segmento de aproximadamente 150kb. Os receptores KIR podem diferir entre si quanto ao número de domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas (2 ou 3) e quanto a cauda citoplasmática, que pode ser curta e com ITAM (imunoreceptor ativador baseado em tirosina) com função ativadora ou longa e com ITIM (imunoreceptor inibidor baseado em tirosina) com função inibidora.

Um extenso polimorfismo é observado quando tratamos dos genes *KIR*. Haplótipos podem diferir quanto à variedade e quantidade de genes, o que somado ao polialelismo dos mesmos e a combinação dos cromossomos paterno e materno torna mínima a chance de dois indivíduos geneticamente não relacionados apresentarem o mesmo genótipo *KIR*. A frequência de cada um dos genes pode

variar amplamente entre populações. Mesmo populações próximas geográfica e etnicamente tem diferenças pequenas mas estatisticamente significativas (RAYES et al., 2007). No entanto, pouco se sabe sobre o significado funcional desta diversidade.



**FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO DOS GENES *KIR*** Os genes *KIR* se encontram no cromossomo 19q13.4 dentro do complexo de receptores leucocitários, LRC, e se estendem por um segmento de aproximadamente 150 mil pares de base. FONTE: IPD (ROBINSON et al., 2003).

Comparações entre seqüências e haplótipos *KIR* intraespecíficas e entre espécies é consistente com uma evolução rápida desta família gênica (KHAKOO et al., 2000). A alta similaridade de seqüência entre estes genes (de 85% a 99%), somada a sua disposição seqüencial, predispõem a evolução através de um mecanismo de permuta desigual, ajudando a explicar as expansões e retrações do complexo *KIR* e a filogenia dos haplótipos existentes (KHAKOO et al., 2004; MARTIN et al., 2003).

## 1.1 O RECONHECIMENTO DA NORMALIDADE E A FALTA DO PRÓPRIO.

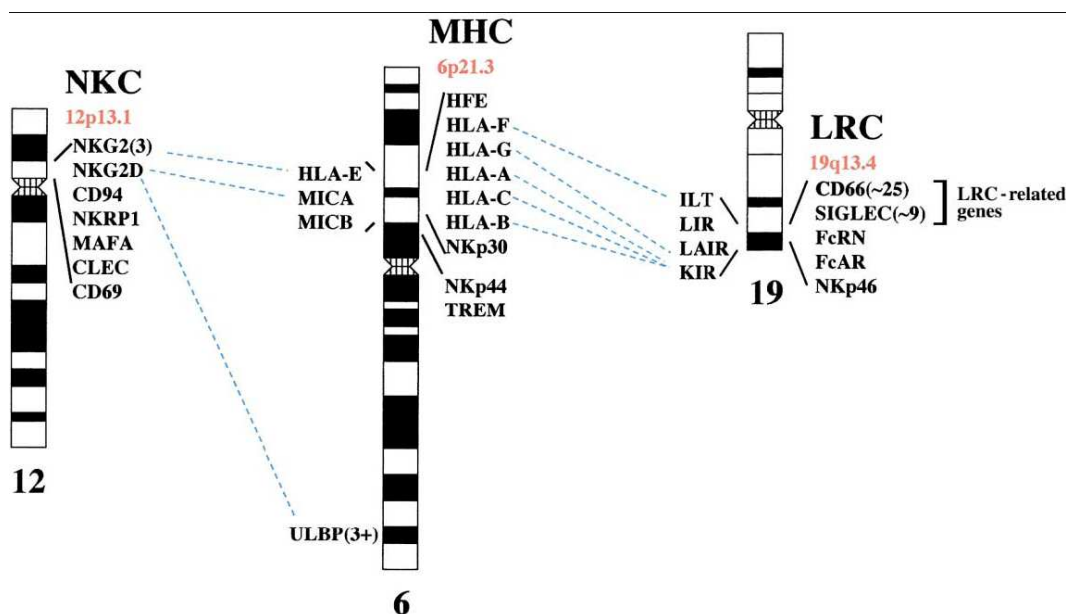
As células NK participam de um processo que poderia ser descrito, de certo modo, como um reconhecimento da normalidade, no qual células não percebidas como próprias são exterminadas. Segundo a hipótese da falta do próprio (do inglês, *missing self*), moléculas MHC de classe I (expressas constitutivamente na maioria das células normais) se ligam a receptores inibidores presentes nas células NK. O engajamento entre receptor inibidor e ligante bloqueia ação assassina da célula NK. Na falta do ligante MHC não há sinal inibidor e as células NK ficam livres para atacar (LJUNGGREN et al., 1991). Originalmente, a ausência de moléculas MHC próprias foi considerada como condição suficiente para ação da célula NK. Recentemente, entretanto, uma variedade de receptores ativadores expressos pela célula NK foram caracterizados e parecem ser funcionalmente relevantes (RAULET, 2006). Alguns de seus respectivos ligantes ainda não foram identificados, mas os já descritos incluem certas moléculas expressas em tipos celulares normais e alguns produtos microbianos. Aparentemente as células NK são reguladas por um balanço de sinais tanto inibidores como ativadores num processo complexo envolvendo diversos genes muitas vezes polimórficos. Apesar dos avanços na compreensão de todo esse mecanismo, ainda não está totalmente claro como se formam células NK capazes de atacar células infectadas ou transformadas sem atacar células normais.

## 1.2 RECEPTORES DA CÉLULA NK

Diversos receptores de NK humanas já foram identificados. Esses pertencem a três famílias principais. A primeira a ser descoberta foi a famílias dos receptores KIR. Uma segunda é a dos receptores leucocitários semelhantes a imunoglobulinas (ILT, ou LIR). Como os KIR, os ILT também são codificados por genes que se encontram no cromossomo 19 no LRC. Trata-se de uma família com cerca de 13 genes relacionados, os quais codificam receptores inibidores que podem ter de 2 a 4 domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulinas e com um ITIM em sua



cauda citoplasmática (NATARAJAN et al., 2002). A terceira família é a dos receptores semelhantes à lectina tipo C que, diferentemente dos KIR e ILT, são codificados por genes localizados no cromossomo 12p13.1 no *Natural Killer Complex* (NKC) (BROWN et al., 2000). A ela pertencem os receptores CD94/NKG2 e NKG2D. Os CD94/NKG2 são heterodímeros compostos de moléculas semelhantes à lectina ligada covalentemente à CD94 que tem como ligantes moléculas MHC de classe I não clássicas. A subunidade NKG2 pode ser codificada por pelo menos quatro genes, enquanto a subunidade CD94 é invariável e codificada por um único gene (CHANG et al., 1995). Por outro lado NKG2D é um homodímero de função ativadora que reconhece MICA e MICB, moléculas minimamente expressas em tecido normal, mas que tem sua expressão aumentada em resposta ao estresse e em células de tumor epitelial (NATARAJAN et al., 2002).



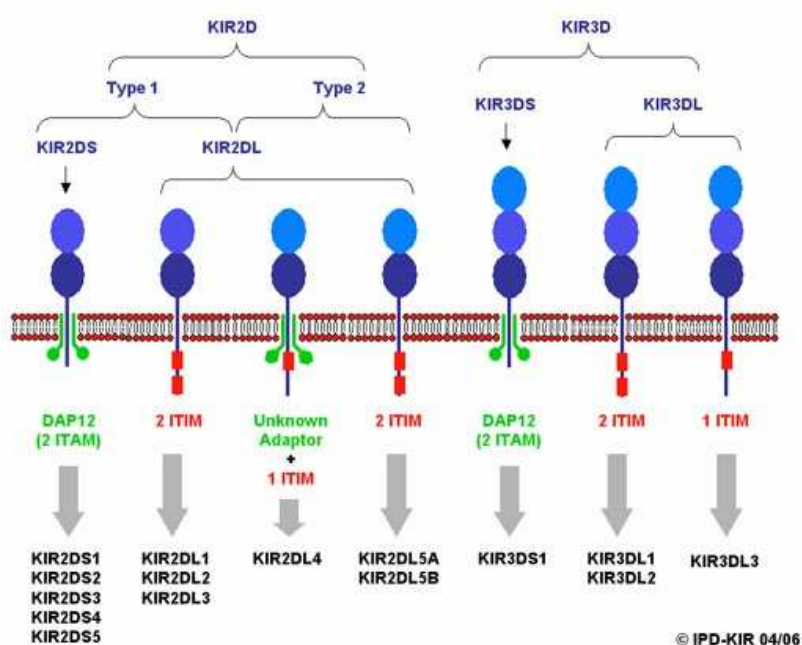
**FIGURA 2 - INTERAÇÕES ENTRE RECEPTORES DA CÉLULA NK E SEUS PRINCIPAIS LIGANTES**

As linhas pontilhadas representam interações entre os produtos dos genes indicados

FONTE: TROWSDALE, 2001.

### 1.3 ESTRUTURA E NOMENCLATURA KIR

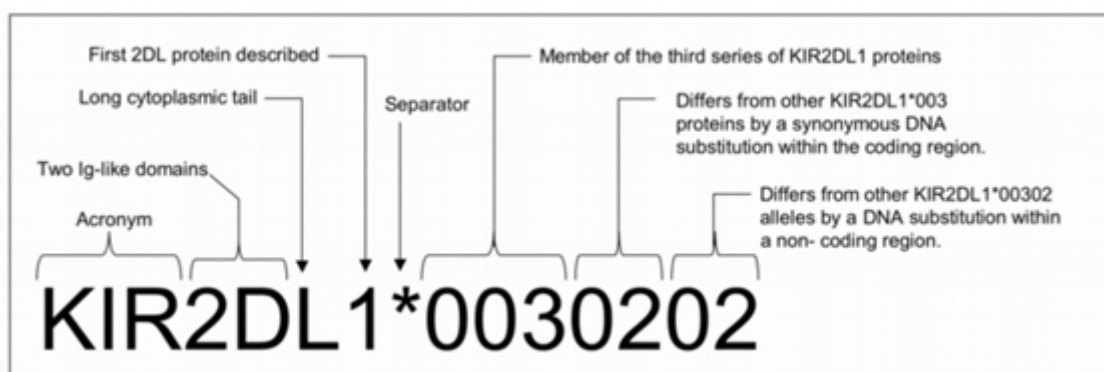
Os receptores KIR são constituídos por uma porção extracelular (que pode ter 2 ou 3 domínios semelhantes a imunoglobulinas), uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática, que pode ser curta e com ITAM ou longa e com ITIM (FIGURA 3), sendo que os receptores de cauda curta têm função ativadora e os de cauda longa função inibidora, à exceção de *KIR2DL4* que aparentemente pode promover os dois tipos de sinal (KIKUCHI-MAKI et al., 2003).



**FIGURA 3 – RECEPTORES KIR** Os receptores KIR podem apresentar 2 ou 3 domínios extracelulares e uma cauda citoplasmática curta ou longa. FONTE: IPD. (ROBINSON et al., 2003).

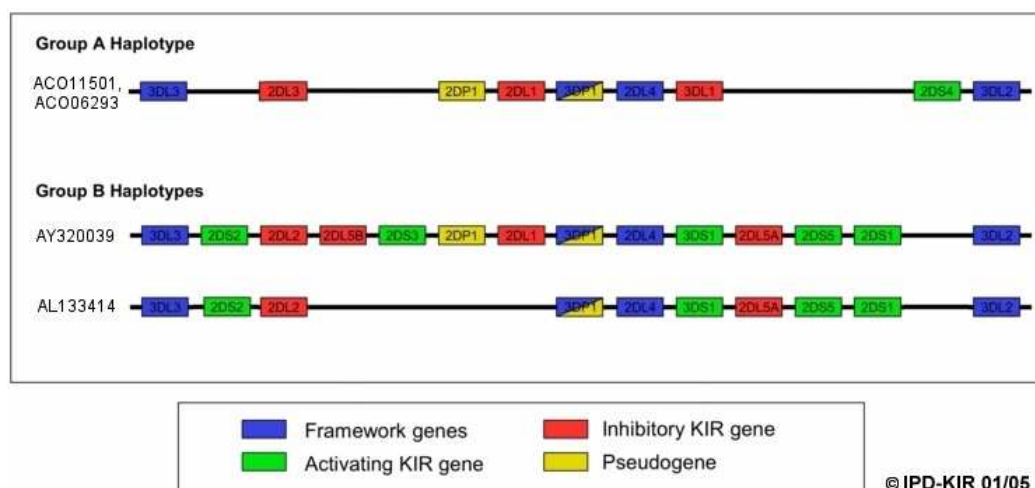
Os receptores KIR são codificados por genes que variam, em comprimento, de 4 a 16kb (seqüência genômica completa) e podem ter de 4 a 9 exons, com uma seqüência de cerca de 2kb separando-os, a não ser por um segmento de 14kb a montante do gene *KIR2DL4*.

A nomenclatura dos genes *KIR* é baseada em sua estrutura molecular: designa-se 2D ou 3D conforme o número de domínios extracelulares e L ou S (do inglês, *long* e *short*) para cauda citoplasmática longa ou curta, respectivamente (FIGURA 3). Tal denominação geralmente é precedida pelo acrônimo KIR (LONG et al., 1996). Os dois pseudogenes são chamados de *KIR2DP1* e *KIR3DP1*, uma vez que o primeiro apresenta semelhança com os demais genes de dois domínios, e o segundo com *KIR3DL3*. Entretanto, outros nomes como *KIRZ* e *KIRX* também podem ser encontrados na literatura (CARRINGTON e PARHAM, 2003). Para os alelos adota-se o mesmo sistema de nomenclatura HLA: primeiro vem o nome do gene seguido por um asterisco que é utilizado como separador. Depois, temos uma designação numérica na qual os três primeiros dígitos indicam alelos que apresentam diferenças na região codificadora. Os dois números seguintes distinguem alelos que diferem apenas por mutações sinônimas na região codificadora e os dois últimos distinguem alelos que diferem em regiões não codificadoras, como íntrons ou o promotor (MARSH et al., 2002; FIGURA 4).

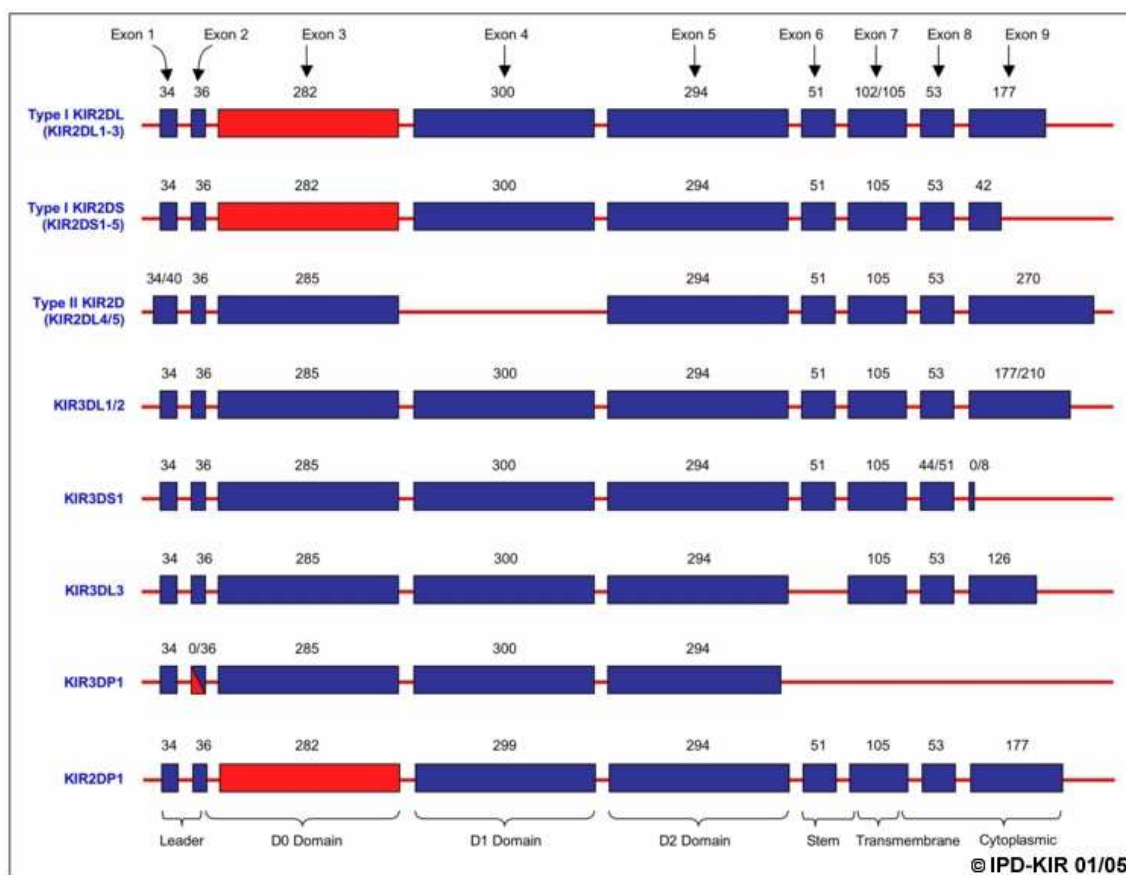


**FIGURA 4 – NOMENCLATURA *KIR*** Devido ao grande sucesso da nomenclatura dos alelos HLA foi decidido que os alelos *KIR* seriam nomeados de maneira análoga.  
 FONTE: IPD (ROBINSON et al., 2003).

Apesar de algumas propostas em discussão, a nomenclatura dos haplótipos *KIR* ainda não é consensual. Usualmente eles são separados em dois haplogrupos classificados segundo seu conteúdo gênico (FIGURA 5). Haplótipos do grupo A tem como único gene de cauda curta *KIR2DS4*, enquanto os do haplogrupo B são caracterizados pela presença de pelo menos um dos seguintes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* (MARSH et al., 2003).



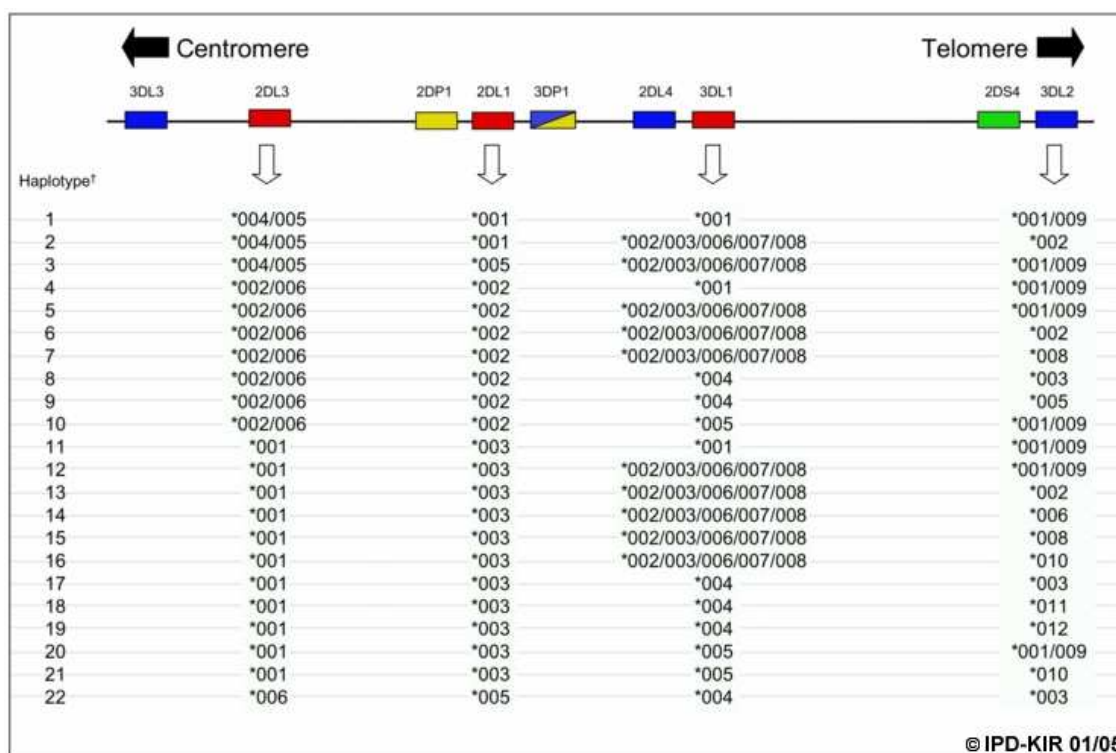
**FIGURA 5 – HAPLOGRUPOS *KIR*** Representação esquemática de haplótipos *KIR* já seqüenciados. Os genes de moldura foram alinhados para facilitar a visualização. A figura não está em escala. FONTE: IPD (ROBINSON et al., 2003).



**FIGURA 6 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES *KIR*** As caixas azuis representam os exons e as caixas vermelhas o pseudoexon 3 e a deleção do exon 2 em *KIR3DP1*. Os números acima das caixas representam o tamanho dos exons em pares de base. Os exons foram alinhados para facilitar a visualização. Os íntrons não estão em escala. As chaves na parte inferior da figura demonstram a correlação entre os exons e a porção da molécula codificada. FONTE: IPD (ROBINSON et al., 2003).

## 1.4 DIVERSIDADE E POLIMORFISMO *KIR*

Os genes *KIR* são bastante diversos. Haplótipos *KIR* podem diferir em número e tipo de genes que contém. Logo esses haplótipos podem ser distinguidos pelo seu conteúdo gênico. Os genes, individualmente, também são polimórficos, de modo que mesmo haplótipos de mesmo conteúdo gênico podem se diferenciar de acordo com a combinação alélica que apresentam. Sendo assim, a diversidade *KIR* encontrada em humanos deriva de três diferentes níveis de organização: o conteúdo gênico de seus haplótipos, o polimorfismo alélico e a combinação de haplótipos materno e paterno. Somados, esses três componentes tornam mínimas as chances de que indivíduos não relacionados geneticamente apresentem o mesmo genótipo e o que se observa é uma ampla variação genotípica quando comparados diferentes populações.



† = Allelic variants and haplotype nomenclature of group A haplotypes according to Shilling *et al.*, 2002.

**FIGURA 7 – VARIAÇÕES ALÉLICAS DE UM HAPLÓTIPO *KIR*** Haplótipos de mesmo conteúdo gênico podem diferir quanto aos seus alelos. Note o impacto das variações alélicas na diversidade *KIR*. FONTE: IPD (ROBINSON *et al.*, 2003).

De modo geral, todos os haplótipos *KIR* são flanqueados na porção centromérica pelo gene *KIR3DL3* e na porção telomérica por *KIR3DL2*. Lado a lado na porção central dos haplótipos estão *KIR3DP1* e *KIR2DL4* (FIGURA 5 e 7). Esses genes, sempre presentes (apesar de raras exceções), são designados como genes de moldura (MARTIN et al., 2000; VILCHES et al., 2002; WILSON et al., 2000) limitando duas porções variáveis na qual se encontram os demais genes.

Todos os estudos populacionais publicados até o momento revelam a presença de ambos os haplogrupos, A e B, nas populações testadas. Já foram registradas, por exemplo, freqüências do haplogrupo A de 75% em japoneses (YAWATA et al., 2002), 58% em euro-descendentes (PARHAM, 2005), mas de apenas 15% em aborígenes australianos (TONEVA et al., 2001). Há uma implicação funcional interessante na distribuição desses dois haplogrupos. Além de *KIR2DL4*, que codifica um receptor que pode transmitir tanto um sinal inibidor quanto ativador, o haplogrupo A contém um único gene *KIR* ativador, *KIR2DS4* (CARRINGTON e NORMAN, 2003). Já o haplogrupo B, contém uma variedade de combinações envolvendo outros genes *KIR* ativadores. Porém, *KIR2DS4* possui alguns alelos nulos, não funcionais, com freqüência populacional variando de 78% a 98% em europeus (BONTADINI et al., 2006). De maneira semelhante, *KIR2DL4* também possui um alelo não funcional freqüente em algumas populações. Deste modo indivíduos homocigotos para o haplogrupo A podem não apresentar nenhum gene *KIR* ativador (HSU et al., 2002; WITT, MARTIN e CHRISTIANSEN, 2000). Como o haplogrupo A apresenta elevada freqüência em algumas populações, há milhões de pessoas que não apresentam genes *KIR* ativadores funcionais, sugerindo que os genes *KIR* ativadores são menos importantes que os inibidores para sobrevivência (PARHAM, 2005).

O variante não funcional do gene *KIR2DS4* já foi caracterizado através de seqüenciamento (HSU et al., 2002). Trata-se de uma deleção de 22pb na seqüência do exon 5 (que codifica um domínio extracelular) encontrada nos alelos *KIR2DS4\*003*, *KIR2DS4\*004*, *KIR2DS4\*006* e *KIR2DS4\*007*. Tal deleção provoca uma mudança na matriz de leitura codificando uma proteína sem função. Estes alelos apresentam grande similaridade de seqüência com o gene do receptor de NK presente em macacos, *Mm-KIR1D*. Foi sugerido então que esse grupo de alelos fosse chamado de *KIR1D* (MAXWELL et al., 2002).

É difícil estimar a composição de haplótipos *KIR* a partir de perfis heterozigotos (CRUM et al., 2000; JIANG et al., 2005 e NORMAN et al., 2002). Nas tipagens, a ausência se comporta como recessiva. Como consequência, homo e heterozigotos para presença de um gene *KIR* apresentam o mesmo resultado. Para alguns pares de genes do haplogrupo B há um forte desequilíbrio de ligação, o que ajuda na identificação de alguns haplótipos (UHRBERG et al., 1997). Muitos haplótipos foram definidos a partir de análises de segregação em famílias (GÓMEZ-LOZANO et al., 2002; SHILLING et al., 2002; UHRBERG et al., 2002). Entretanto, esses dados apesar de valiosos não são definitivos, uma vez que nem sempre a ordem dos genes e o seu número de cópias podem ser determinados corretamente neste tipo de estudo. (KHAKOO e CARRINGTON, 2006).

A alta similaridade de seqüência e a suposta origem destes genes por permutas desiguais têm obscurecido a distinção entre alelos de único gene e genes que ocupam uma mesma região genômica. Aparentemente, *KIR3DL1* e *KIR3DS1* ocupam a mesma região genômica em diferentes haplótipos (WILSON et al., 2000). Análises de segregação demonstram que esses se comportam de fato como alelos de um mesmo loco (VILCHES et al., 2000). Propõe-se, que *KIR3DS1* tenha surgido a partir de uma permuta desigual entre *KIR3DL1* e um gene *KIR* ativador ancestral (MARTIN et al., 2002). Porém, alguns raros haplótipos apresentam ambos os ou nenhum destes genes (CRUM et al., 2000; GARDINER et al., 2000). Assim como *KIR3DS1* e *KIR3DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3* também se comportam como alelos de um mesmo loco (CRUM et al., 2001; NORMAN et al., 2001; TONEVA et al., 2001; WITT et al., 1999).

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Apesar do crescente avanço neste campo ainda é pouco o que se sabe sobre o significado funcional da diversidade dos genes *KIR*. O conhecimento da distribuição *KIR* em diferentes grupos populacionais é uma informação valiosa para esse entendimento. Devido ao seu polimorfismo e também o de seus ligantes MHC de classe I, estudos que busquem elucidar essa interação são difíceis de executar e de interpretação igualmente complexa. Passa a ser importante a formação de um conjunto de dados consistentes, capaz de apontar novas questões e tendências. Deste modo investigações de populações isoladas fornecem uma oportunidade única para a compreensão evolutiva e funcional dos genes *KIR* e sua resposta em relação a doenças e o ambiente.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo descrever e analisar as freqüências de quatorze genes *KIR* e dois pseudogenes em amostras de duas populações ameríndias do Mato Grosso do Sul. Ainda, interpretar os perfis gênicos encontrados buscando determinar os haplótipos presentes e determinar a freqüência de *KIR1D*. Pretende-se então, conhecer a variabilidade presente nestas populações e as suas possíveis implicações em aspectos evolutivos e funcionais a ela relacionados.



### 3 MATERIAIS E METODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS

A amostra populacional é constituída de 146 indivíduos oriundos de populações ameríndias do estado do Mato Grosso do Sul. São 50 Guarani-Ñandeva (GND) e 96 Guarani-Kaiowá (GKW).

A língua guarani pertence à família lingüística tupi-guarani que por sua vez faz parte do tronco lingüístico Tupi. Os Guarani estão entre os primeiros povos a ter contato com os europeus no início do século XVI. Atualmente a população Guarani no Brasil é estimada em 35000 pessoas, vivendo nas regiões Sul, Sudeste e central. Na Argentina, Bolívia e principalmente no Paraguai também existem vilas Guarani. Guarani-Kaiowá e Guarani-Ñandeva são dois subgrupos Guarani que diferem em alguns aspectos de suas culturas e que, apesar do intenso contato com a população neo-brasileira e outros grupos indígenas, preservam muito da sua identidade cultural (TSUNETO et al., 2003).

Os Guarani-Kaiowá deste estudo vivem nas reservas de Amambai (23°06'S, 55°12'W; população de aproximadamente 4500 pessoas entre Guarani-Kaiowá e Guarani-Ñandeva) e Limão Verde (23°12'S, 55°06'W; 460 pessoas). Os Guarani-Ñandeva vivem nas reservas de Porto Lindo (23°48'S, 54°30'W; 1600 pessoas) e Amambai. Essas aldeias estão localizadas no sul do Mato Grosso do Sul.

#### 3.2 GENOTIPAGEM

A genotipagem foi realizada através do método de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos (PCR-SSP) para cada um dos 14 genes e dos 2 pseudogenes *KIR*.

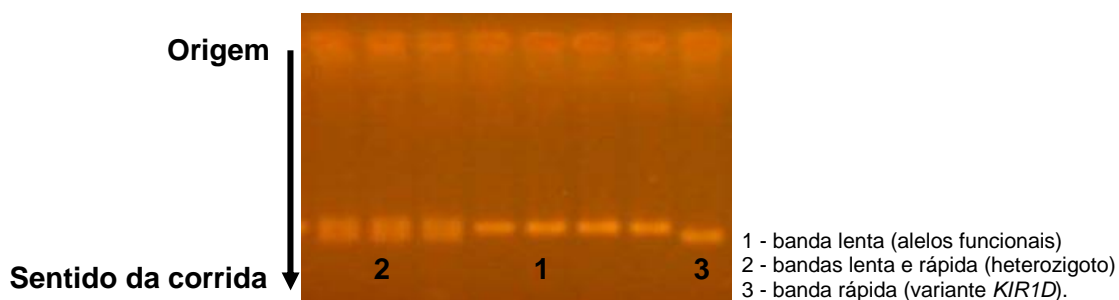
A reação em cadeia da polimerase seguiu as condições de amplificação: desnaturação a 94.º C por 180 segundos (s); Após, 4 ciclos de 94.ºC por 15s, 65.ºC por 15s e 72.ºC por 30s; Depois, 21 ciclos de 94.ºC por 15s, 60.ºC por 15s e 72.ºC por 30s; Ainda, 5 ciclos de 94.ºC por 15s, 55.ºC por 15s e 72.ºC por 30s; finalmente, 72.º.C por 720s.

Foram utilizados pelo menos dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* e um par para *KIR2DS1* e *KIR3DP1* (QUADRO 1).

Após amplificação por PCR, foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose 3,0%, a 90 Volts. A coloração foi com solução de brometo de etídio 0,7mg/ml e a fotodocumentação com utilização de luz ultravioleta e uma câmera fotográfica digital conectada a um microcomputador.

Após fotografia dos géis foi verificada a amplificação. Quando houve amplificação para os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores de um mesmo gene foi assumida a presença do mesmo no indivíduo em questão. Quando não houve amplificação para os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores de um mesmo gene foi assumida a ausência do mesmo no indivíduo em questão. Em caso de discrepâncias entre as tipagens, foram realizadas repetições para confirmação dos resultados.

O variante *KIR1D* do gene *KIR2DS4*, caracterizado por uma deleção de 22pb no exon 5, foi detectado através do padrão das bandas após corrida eletroforética realizada com o produto de PCR dos oligonucleotídeos iniciadores del.5b e del.3. (QUADRO 1).



**FIGURA 8 – *KIR2DS4* E *KIR1D*** Gel de agarose após corrida eletroforética de produtos de PCR do gene *KIR2DS4* corados com brometo de etídio. O variante *KIR1D*, caracterizado por uma deleção de 22 pares de base, pôde ser detectado pela presença de uma banda mais rápida em relação à banda dos alelos funcionais.

Gene	Primers	Seqüências	Exon	Tamanho (pb)
2DL1	KIR1.5/1.3A	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA GGT CCC TGC CAG GTC TTG CG	4 4	146
	KIR2.5/2.3A	TGG ACC AAG AGT CTG CAG GA TGT TGT CTC CCT AGA AGA CG	8 9	~330
	KIR2DL1ex4mon/jus	CCA TCA GTC GCA TGA CG TCA CTG GGA GCT GAC AC	4 4	94
2DL2	KIR3.5/3.3	CTG GCC CAC CCA GGT CG GGA CCG ATG GAG AAG TTG GCT	4 4	173
	KIRex5.5/5.3	GAG GGG GAG GCC CAT GAA T TCG AGT TTG ACC ACT CGT AT	5 5	150
	KIR2DL2ex5mon/jus	ACG GTT CTG GCA GGA GAG AG GGC CCT GCA GAG AAC CTA CA	5 5	113
2DL3	KIR5.5/5.3	CTT CAT CGC TGG TGC TG CGG CTC TTG GTC CAT TAC AA	7 8	~550
	KIR6.5/6.3	TCC TTC ATC GCT GGT GCT G GGC AGG AGA CAA ATT TGG ATC A	7 9	~800
2DL4	KIR7.5/7.3	CAG GAC AAG CCC TTC TGC CTG GGT GCC GAC CAC T	3 3	254
	KIR8.5/8.3	ACC TTC GCT TAC AGC CCG GGG TTT CCT GTG ACA GAA ACA G	5 5	288
2DL5	KIR29.5/29.3	GCG CTG TGG TGC CTC G AGC CAC TCA ATG GGG GAG C	3 3	214
	KIR30.5/30.3	TGC AGC TCC AGC AGC TCA GGG TCT GAC CAC TCA TAG GGT	5 5	194
2DS1	F1/F2/R3	CTT CTC CAT CAG TCG CAT GAA CTT CTC CAT CAG TCG CAT GAG AGA GGG TCA GTG GGA GCT GAC	4 4 4	102
2DS2	KIR11.5/11.3	TTC TGC ACA GAG AGG GGA AGT A AGG TCA CTG GGA GCT GAC AA	4 4	173
	KIR12.5/12.3	CGG GCC CCA CGG TTT GGT CAC TCG AGT TTG ACC ACT CA	5 5	240
2DS3	KIR13.5/13.3	TGG CCC ACC CAG GTC G TGA AAA CTG ATA GGG GGA GTG AGG	4 4	242
	KIR14.4/14.3	CTA TGA CAT GTA CCA TCT ATC CCA AAG CAG TGG GTC ACT TGA C	5 5	190
2DS4	9Fa/12Ra	CTG GCC CTC CCA GGT CA TCT GTA GGT TCC TGC AAG GAC AG	4 4	204
	del.5B/del.3	GTT CAG GCA GGA GAG AAT GTT TGA CCA CTC GTA GGG AGC	5 5	197/219
2DS5	13F/9R	TGA TGG GGT CTC CAA GGG TCC AGA GGG TCA CTG GGC	4 4	125
	KIR2DS5ex4mon/jus	AGA GAG GGG ACG TTT AAC GAC CGA TGG AGA AGT TGC	4 4	87
3DL1	7Fa/3Ra	CGC TGT GGT GCC TCG A GGT GTG AAC CCC GAC ATG	3 3	197
	3DS1.5a13Ra	CCC TGG TAG AAT CAG GAG AGA G TGT AGG TCC CTG CAA GGG CAA	4 4	181
3DL2	KIR19.5/19.3	CAA ACC CTT CCT GTC TGC CC GTG CCG AAA ACC CAG TGA	3 3	245
	KIR20.5/20.3	CCC ATG AAC GTA GGC TCC G CAC ACG CAG GGC AGG G	5 5	130
	KIR3DL2ex4mon/jus	CCA ACT TCT CCA TCG GTC CCT GGG AGT GAG GAA CAG AAC CAT AA	4 4	75
3DL3	KIR35.5/35.3	GTC AGA TGT CAG GTT TGA GCG CTA GGA ATA GTT GAC CTG GGA AC	4 4	112
	KIR36.5/36.3	GCA GCT CCC GGA GCT TG GGG TCT GAC CCA GCG TG	5 5	190
	KIR3DL3ex4mon/jus	GCA ATG TTG GTC AGA TGT CAG CAT GGA ATA GTT GAC CTG GGA AC	4 4	121
	KIR3DL3ex3mon/jus	CAC TGT GGT GTC TGA AGG AC GGA GTG TGG GTG TGA ACT G	3 3	199
3DS1	Ex9.1/9.3	AGC CTG CAG GGA ACA GAA G GCC TGA CTG TGG TGC TCG	8 9	~300
	KIR22.5/22.3	CCT GGT GAA ATC AGG AGA GAG GTC CCT GCA AGG GAC C	4 4	177
2DP1	KIR33.5/33.3	GTC TGC CTG GCC CAG CT GTG TGA ACC CCG ACA TCT GTA C	3 3	205
	KIR49.5/49.3	CCA TCG GTC CCA TGA TGG CAC TGG GAG CTG ACA ACT GAT G	4 4	90
3DP1	KIR3DP1ex3mon/jus	AGA GTA TTC CGA AAC ACC G TGA CCA CCC AGT GAG GA	3 3	102

QUADRO 1 – SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS

### 3.3 ANÁLISE DOS DADOS

Após a genotipagem os dados foram transferidos para um banco de dados do Microsoft Access, versão 97, e processados com o programa Convert (PROBST, 1998) para obtenção dos perfis gênicos. As frequências de presença de cada gene foram calculadas por contagem direta. As frequências gênicas foram estimadas supondo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como as frequências dos haplogrupos A e B (frequência gênica =  $1 - \sqrt{1 - \text{frequência de presença}}$ ).

As comparações entre populações foram realizadas com o auxílio do programa RxC (MILLER, 1997) que utiliza o algoritmo metropolis para obtenção do valor estimado de P.

Os haplótipos foram inferidos com base num processo iterativo, envolvendo os perfis obtidos, os haplótipos já descritos anteriormente na literatura e informações sobre desequilíbrio de ligação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 FREQUENCIA DOS GENES KIR

A TABELA 1 aponta as frequências de presença observadas e frequências gênicas calculadas para as duas populações analisadas e outras três populações também analisadas em nosso grupo de pesquisa (AUGUSTO, 2006).

**TABELA 1 – FREQUÊNCIA DOS GENES KIR**

Gene	G. Ñandeva		G. Kaiowá		G. M'Byá*		Kaingang*		Curitiba*		
	FP	FG	FP	FG	FP	FG	FP	FG	FP	FG	
		n=50		n=96		n=80		n=81		n=164	
KIR	<b>2DL1</b>	98	86	98	86	72	48	78	53	99	92
de cauda	<b>2DL2</b>	32	18	21	11	59	36	61	38	56	34
longa	<b>2DL3</b>	98	86	98	86	65	41	66	42	80	55
	<b>2DL4</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<b>2DL5</b>	58	35	71	46	67	42	62	38	44	25
	<b>3DL1</b>	86	63	81	57	59	36	80	55	93	74
	<b>3DL2</b>	98	86	100	100	100	100	100	100	100	100
	<b>3DL3</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KIR	<b>2DS1</b>	56	34	71	46	71	46	69	44	36	20
de cauda	<b>2DS2</b>	32	18	20	10	54	32	56	33	56	33
curta	<b>2DS3</b>	4	2	3	2	15	8	3	2	30	17
	<b>2DS4</b>	86	63	81	57	71	46	74	49	95	77
	<b>2DS5</b>	58	35	71	46	62	38	66	42	30	16
	<b>3DS1</b>	56	34	71	46	78	53	65	41	35	19
	<b>2DP1</b>	98	86	98	86	82	58	84	61	93	74
	<b>3DP1</b>	100	100	100	100	NT	NT	NT	NT	NT	NT

FP= Frequência de presença (%)  
 FG= Frequência gênica (%)  
 NT= Não Tipado

\* AUGUSTO, 2006

Como já bem estabelecido na literatura os genes de moldura (*KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2*) estão presentes em todos os indivíduos, exceto *KIR3DL2* que foi ausente para apenas um indivíduo, Guarani-Ñandeva (GND834).

Já houve registro de alguns poucos indivíduos nos quais *KIR3DL2* é ausente, como em ameríndios da Amazônia (EWERTON et al., 2007), japoneses (MIYASHITA et al., 2006) e chineses, condizentes com as evidências de pequena distância genética entre essas populações. Entretanto quaisquer comparações interpopulacionais devem ser realizadas com extrema cautela dada à heterogeneidade dos métodos de tipagem e tamanho das amostras, o que pode conduzir a erros na interpretação dos dados (CONTRERAS et al., 2007). Existe a possibilidade de alelos ainda não descritos não serem detectados pelo método de PCR-SSP utilizado para este loco (EWERTON et al., 2007). Em nosso estudo utilizamos dois pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene. Preferencialmente estes hibridam em seqüências distintas em diferentes exons, no intuito de minimizar a possibilidade de que um mau pareamento que impeça a amplificação por PCR afete os dois oligonucleotídeos e conduza a um resultado falso negativo. No caso de *KIR3DL2* um terceiro par de oligonucleotídeos iniciadores foi utilizado e novamente o resultado foi negativo para o indivíduo GND834, ao contrario dos demais indivíduos testados. Isso praticamente excluiu a possibilidade deste padrão ser decorrente de uma falha metodológica ou da presença de alelos desconhecidos com variações de seqüência na região em que os oligonucleotídeos iniciadores específicos se hibridam. Este resultado negativo reflete existência, em GND, de um ou mais haplótipos em que *KIR3DL2* é ausente.

Desconsiderando os genes moldura, *KIR2DL1*, *KIR2DL3* e *KIR2DP1* apresentaram as freqüências mais elevadas, enquanto *KIR2DS3* a mais baixa. Dentre os genes inibidores *KIR2DL2*, que segrega como um alelo de *KIR2DL3*, só esteve presente em 32% dos GND e 21% dos GWK. Os demais genes inibidores estão presentes entre 58% e 100% dos indivíduos. Já os genes ativadores foram menos presentes, variando entre 20% e 86% a não ser por *KIR2DS3* que esteve presente em 4% dos GND e 3% dos GWK.

A freqüência do gene *KIR2DS3* varia entre populações. Em europeus e euro-descendentes *KIR2DS3* está presente entre 20% e 40% da população, em africanos entre 24% e 34% e em asiáticos 8% e 18%. Entretanto, nas populações ameríndias a distribuição é curiosa. Há registros de populações em que *KIR2DS3* é completamente ausente, como em Tarahumara, do México (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2006) e Yucpa e Bari, da Venezuela (GENDZEKHADZE et al., 2006). Em outras populações sua freqüência é relativamente baixa: 3% e 6% para

Wichis e Chiriguano da Argentina (FLORES et al., 2007), 4% Purepecha do México (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2006), e 3% em Kaingang do Brasil (AUGUSTO, 2006). Ou ainda podem se equiparar às freqüências das populações não ameríndias: 15% em Guarani M'Byá do Brasil (AUGUSTO, 2006), 16% em Huichol do México (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2006) e 20% em Warao da Venezuela (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2006). Dentro desse cenário algumas hipóteses podem ser levantadas. Primeiramente podemos considerar estas diferenças como resultado de deriva genética ou outros eventos demográficos, como efeito do fundador ou gargalo de garrafa, elevando a freqüência de *KIR2DS3* em alguns grupos e/ou reduzindo ou até eliminando este gene em outros. Outra possibilidade seria a dessas diferenças resultarem de seleção natural. Logo de início percebemos que tal explicação parece pouco provável. As diferenças de distribuição de *KIR2DS3* observadas ocorrem mesmo entre populações que habitam regiões geograficamente próximas e semelhantes e que, portanto poderiam estar sujeitas as mesmas pressões seletivas impostas pelo ambiente. Neste caso as freqüências de *KIR2DS3* deveriam ser semelhantes, e não distintas.

No caso de GND e GKW existe a possibilidade de *KIR2DS3* ter sido introduzido por fluxo gênico. Estas duas populações conhecidamente têm algum grau de miscigenação (TSUNETO et al., 2003). Na amostra estudada dez indivíduos apresentam alelos HLA que não são característicos de ameríndios (TSUNETO et al., 2003), sendo um GND e nove GKW, o que é indicativo de fluxo gênico. Dos cinco indivíduos *KIR2DS3* positivos (dois GND e três GKW), dois apresentam alelos HLA não ameríndios (os dois GKW). Os outros três não apresentam genótipos HLA informativos, podendo ou não ter algum ancestral não ameríndio. Baseados nestes dados, e considerando que a ausência completa de *KIR2DS3* já reportada em outras populações ameríndias, é de fato possível que *KIR2DS3* não seja um gene típico de GND e GKW. Neste caso, a análise dos alelos de *KIR2DS3*, assim como dos outros genes do haplótipo, pode ser esclarecedora.

Quando comparadas às freqüências individuais dos genes *KIR* entre GND e GKW não houve diferença estatisticamente significativa. O mesmo ocorreu quando foram comparados o conjunto dos genes inibidores, ativadores e o conjunto total dos genes *KIR*. Entretanto, quando essas populações foram comparadas a população de Curitiba, cujas freqüências dos genes *KIR* se aproximam das européias, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas demonstradas na TABELA 2.

A exceção de *KIR2DS4*, quando comparado Curitiba e GND ( $p=0,058800$ ), todos os genes *KIR* de cauda curta diferem entre as populações deste estudo e a de Curitiba. Na comparação do conjunto dos genes inibidores, ativadores e do conjunto total dos genes *KIR*, GND e GWK sempre diferiram de Curitiba ( $p<10^{-6}$ ).

**TABELA 2 – COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS DE GENES *KIR*** Estão demonstrados os valores de p para as comparações entre GND/GKW e Curitiba. Valores estatisticamente significativos em vermelho ( $p<0,05$ ).

	Gene	G. Ñandeva X Curitiba*	G. Kaiowá X Curitiba*
KIR inibidores	2DL1	0,435820	0,559720
	2DL2	0,005100	0,000000
	2DL3	0,000860	0,000060
	2DL5	0,145980	0,000000
	3DL1	0,142720	0,559720
KIR não inibidores	2DS1	0,015660	0,000000
	2DS2	0,004060	0,000000
	2DS3	0,000080	0,000000
	2DS4	0,058800	0,000340
	2DS5	0,000400	0,000000
	3DS1	0,000000	0,000000
	2DP1	0,303460	0,137720

\*AUGUSTO, 2006

#### 4.2 PRESENÇA DE KIR1D

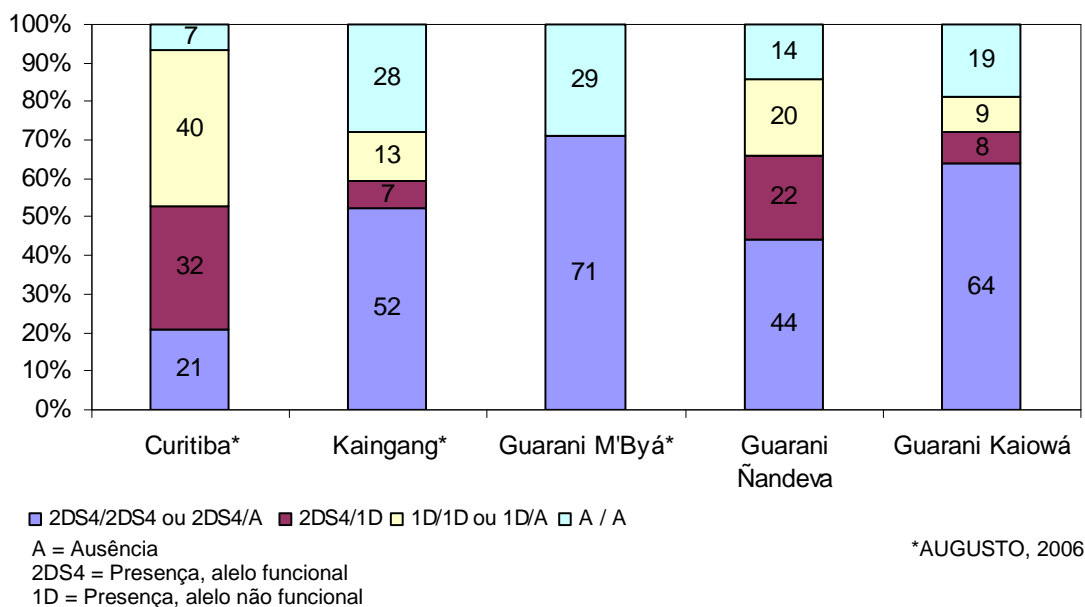
A presença do variante *KIR1D* do gene *KIR2DS4* foi de 20% em GND e 9% em GWK. Assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculada a frequência alélica de *KIR1D* (TABELA 3). Os genótipos encontrados estão representados na FIGURA 9.

**TABELA 3 – FREQUÊNCIA DE *KIR2DS4/1D*** 1D para alelos não funcionais e 2DS4 para os funcionais

		1D	2DS4
GND	FA	20%	39%
	FP	24%	66%
GWK	FA	8%	49%
	FP	9%	72%

FP= Frequência de presença  
FG= Frequência gênica





**FIGURA 9 - GENÓTIPOS PARA O LOCO *KIR2DS4***

O sub-conjunto de alelos do gene *KIR2DS4* denominado *KIR1D* é caracterizado por uma deleção de 22pb no exon 5, o que resulta numa mudança na matriz de leitura codificando uma proteína sem função. O gene *KIR2DS4* é o único gene ativador de cauda curta do haplogrupo A. Deste modo, indivíduos homocigotos para o haplogrupo A e para *KIR1D* não apresentam nenhum gene *KIR* ativador de cauda curta funcional. Em populações europeias muitas pessoas se encontram nessa situação, uma vez que o haplogrupo A é comum e a frequência populacional de *KIR1D* varia entre 78% e 98% (BONTADINI et al., 2006). Em GND também foram observados indivíduos que não tem o gene *KIR2DS4* funcional e sem qualquer outro gene *KIR* ativador de cauda curta. Dos dez indivíduos portadores de *KIR1D*, três não têm nenhum gene ativador de cauda curta funcional. Diferentemente, em GKW, o variante *KIR1D* não foi encontrado em homocigose. Apesar da pequena diferença de frequência de presença de *KIR2DS4* entre GND (86%) e GKW (81%), a proporção de indivíduos com *KIR1D* é maior na primeira. Portanto, a diferença na frequência de *KIR2DS4* não é suficiente para explicar a diferença de frequência de *KIR1D*, o que pode demonstrar algum grau de divergência entre essas populações.

Há algumas evidências de que *KIR2DS4* se ligue a algumas moléculas HLA-C (KATZ et al., 2001), e outras que apontam para ligantes não MHC de classe I (KATZ et al., 2004). Entretanto seu papel funcional, assim como seu ligante, ainda não está bem caracterizado. Sendo assim, permanecem obscuras as implicações da sua

distribuição e de seus alelos não funcionais. Vale ressaltar que a função de *KIR2DS4* como receptor ativador da célula NK é redundante. Tanto outros receptores KIR como NKG2D compartilham essa função, mas não necessariamente os mesmos ligantes, o que pode resultar em diferenças relevantes quanto à resposta imune.

#### 4.3 HAPLÓTIPOS KIR

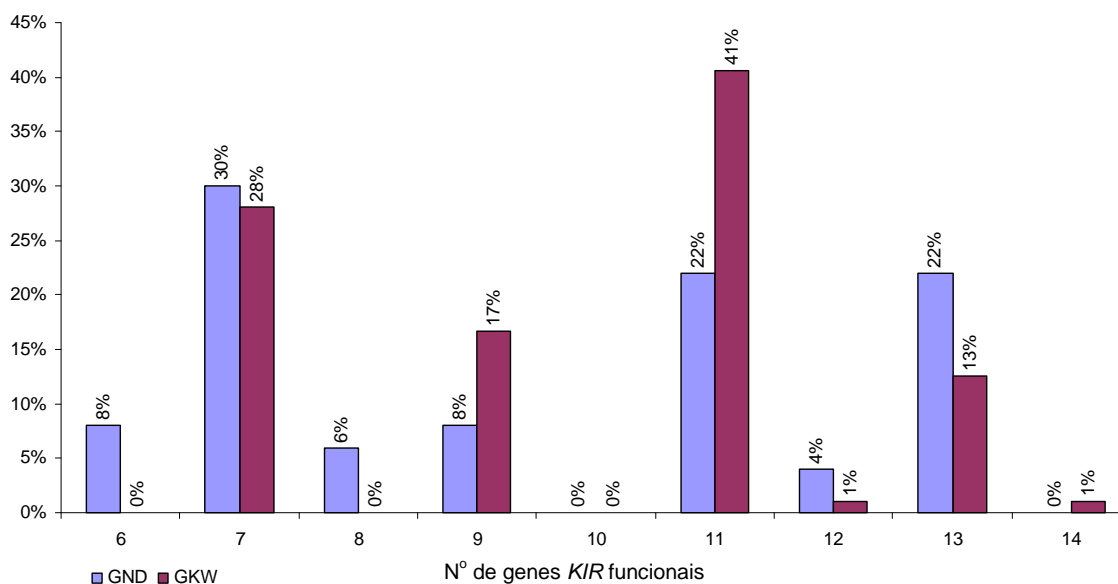
Foram encontrados 17 perfis genéticos diferentes. Destes, 6 são exclusivos de GND, 5 são exclusivos de GKW e 6 são compartilhados pelas duas populações (FIGURA 10). Os perfis exclusivos se encontram em baixa frequência não sendo possível afirmar se de fato eles são exclusivos ou se apenas não foram encontrados na amostra populacional. Já os perfis compartilhados respondem por 88% do total de perfis em GND e por 94% em GKW. O haplogrupo A teve sua frequência estimada em 62% em GND e 52% em GKW.

Como não há consenso na nomenclatura dos haplótipos *KIR* foi então adotada nomenclatura utilizada por Marry Carrington e Salim Khakoo (2006), que consiste simplesmente na numeração dos haplótipos.

Haplótipos	Genes														GND		GKW			
	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DS1	2DS4	3DL2	n	%	n	%
	A1/A1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	19	38%	26
A1/B10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11	22%	12	13%
A1/B3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8	16%	34	35%
B3/B3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3	6%	14	15%
B3/B10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2	4%	3	3%
B10/B10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1	2%	1	1%
A/B?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1	2%	0	0%
A/B?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1	2%	0	0%
A/B?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1	2%	0	0%
A/B?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1	2%	0	0%
B?/B?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1	2%	0	0%
A/?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1	2%	0	0%
A/?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0	0%	2	2%
A/?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0	0%	1	1%
A/?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0	0%	1	1%
?/?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0	0%	1	1%
?/?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0	0%	1	1%

**FIGURA 10 – PERFIS GENÉTICOS ENCONTRADOS** Perfis genéticos encontrados e haplótipos supostos.

O número de genes funcionais variou de 6 a 14 entre os perfis. Os perfis de 6 genes funcionais correspondem a três indivíduos homocigotos para o haplogrupo A e *KIR1D* e o perfil de 14 genes funcionais corresponde a um indivíduo que apresentou todos os genes *KIR* (FIGURA 11).



**FIGURA 11 – FREQUÊNCIAS DE PERFIS EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE GENES *KIR* FUNCIONAIS**

Com base nos perfis encontrados e descrições prévias na literatura foram inferidos três haplótipos. Esses e suas respectivas combinações compõem justamente os perfis compartilhados por GND e GKW (FIGURA 10) e correspondem a maior parte dos haplótipos encontrados. Um desses haplótipos corresponde ao haplótipo A típico, A1, encontrado em todas as populações. Os outros dois são haplótipos pertencentes ao Haplogrupo B: B3 e B10. B3 e B10 já foram descritos anteriormente em outros estudos (GOMEZ-LOZANO et al., 2002; HSU et al., 2002; URHBERG et al., 2002). Em ameríndios B3 já foi identificado em Bari, Huicholes, Purepechas e Chiriguanos. B10 foi encontrado em Yucpa, Bari, Warao, Wichis e Chiriguanos. Quando comparadas às frequências de A, B3 e B10 entre GND e GKW foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas para B3 ( $p=0.003400$ ).

O indivíduo GND834 apresentou um perfil único, no qual *KIR3DL2* é ausente. Trata-se de um perfil semelhante a B3, sendo a ausência de *KIR3DL2* a única diferença. Comparações entre seqüências de genes e haplótipos *KIR* evidenciam uma evolução rápida desta família gênica (GUETHLEIN et al., 2002; KHAKOO et al., 2000; RAJALINGAM et al., 2001). A alta similaridade de seqüência entre os genes *KIR* e a sua disposição seqüencial, facilitam a eventos de permuta desigual, ajudando a explicar as expansões e retração do loco *KIR* e a filogenia dos haplótipos existentes (MARTIN et al., 2003). Excluída a possibilidade de falha técnica, consideramos que o haplótipo sem *KIR3DL2* de fato existe em GND, compondo a variabilidade normal desta população. *A priori*, a ausência de um gene *KIR* não é incomum, dado o polimorfismo de ausência e presença. Entretanto, algumas características, como o distanciamento entre os genes e a presença dos genes de moldura e um segmento de 14kb a montante de *KIR2DL4*, são muito conservadas (WILSON et al., 2004). São raros os haplótipos em que um gene de moldura é ausente, embora já tenham sido registrados (CARRINGTON e NORMAN, 2003).

Já foi seqüenciado um haplótipo em que na região em que era esperado *KIR3DL2* na verdade existia um gene quimérico, codificando uma proteína com a porção extracelular da molécula de *KIR3DL1* e a porção intracelular de *KIR3DL2* (SHILLING et al., 2002). O haplótipo contendo esse gene quimérico não apresenta os genes *KIR3DL2* e *KIR3DL1* convencionais, indicando uma permuta desigual que resultou na perda da região entre esses genes. Essa perda não é compatível com o haplótipo *KIR3DL2* negativo aqui encontrado, uma vez que genes que se localizam justamente nesta região são presentes no haplótipo *KIR3DL2* negativo. No entanto, pode ser considerada a possibilidade de existência de um gene quimérico e não somente a de ausência completa de *KIR3DL2*. Mas independentemente do gene ter sido perdido completamente ou não, o fato é que essa recombinação desigual implica em alterações nos dois haplótipos envolvidos. Seria de interesse verificar a existência do outro haplótipo recombinante tanto nas populações desse estudo quanto na população geral e em outras populações ameríndias, pois sua distribuição pode ser esclarecedora para a compreensão da evolução dos haplótipos *KIR*.

Dada a incapacidade da técnica de PRC-SSP em diferenciar homozigotos de heterozigotos, é difícil afirmar se o haplótipo *KIR3DL2* negativo está presente também em GKW, ou estimar sua freqüência populacional. A situação fica ainda mais complicada, pois esse haplótipo compartilha todos os outros genes com B3.

Como *KIR3DL2* é presente em todo o resto da população é impossível distinguir o haplótipo *KIR3DL2* negativo de B3 com a técnica aqui utilizada, uma vez que quando combinados com outros haplótipos resultarão no mesmo perfil gênico, só sendo possível identificar o haplótipo *KIR3DL2* negativo quando em homozigose. Com um cálculo simples, supondo o equilíbrio de Hardy-Weiberg, chegamos a uma estimativa da frequência deste haplótipo de cerca de 10%, o que seria um número expressivo que não nos permite desconsiderá-lo na análise dessas populações. Por ora sua frequência real permanece incerta, mas a simples presença de um haplótipo *KIR3DL2* negativo já é por si só intrigante, além de apontar novas perspectivas no estudo dos genes *KIR* nestas populações, com a utilização de outras abordagens mais apropriadas ao caso.

## 5. CONCLUSOES

As duas populações estudadas, GND e GKW não diferem entre si quanto a frequência dos genes *KIR*. Já a distribuição do haplótipo B3 diferiu significativamente entre GND e GKW.

Apenas três indivíduos não apresentaram nenhum gene *KIR* ativador de cauda curta funcional. Os três pertencem a GND. Os alelos não funcionais de *KIR2DS4* são cerca de duas vezes mais frequentes em GND do que em GKW, apesar da pequena diferença na frequência de presença deste gene entre as duas populações.

Quando a frequência dos genes *KIR* de GND e GKW foi comparada com a frequência da população de Curitiba (que é semelhante à população europeia quanto aos genes *KIR*) foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre essas populações.

O gene *KIR2DS3* em GND e GKW tem uma distribuição semelhante à de outros grupos ameríndios já estudados, mas difere de Guarani M'Byá. Não está descartada a possibilidade de que *KIR2DS3* tenha sido introduzido em GND e GKW por fluxo gênico e outras abordagens devem ser avaliadas para que tenhamos resultados mais conclusivos.

O haplogrupo A foi mais frequente que o haplogrupo B nas duas populações, e sua frequência não apresenta diferença significativa entre GND e GKW.

Três haplótipos compartilhados por GND e GKW respondem por cerca de 90% dos perfis genéticos encontrados. Seis perfis foram encontrados apenas em GND e cinco apenas em GKW.

Os genes de moldura estão presentes em todos os indivíduos, exceto por GND834 que não apresenta nenhuma cópia do gene *KIR3DL2*. Essa ausência resulta num haplótipo semelhante a B3, diferindo deste apenas pela ausência de *KIR3DL2*. Com a técnica utilizada não é possível identificar sua presença em GKW ou estimar com precisão sua frequência populacional. Mais estudos, envolvendo diferentes abordagens são necessários para uma compreensão precisa da distribuição e origem deste haplótipo.

## REFERÊNCIAS

- AUGUSTO, D.G.; **Genes *KIR* no Brasil: caracterização de três populações**. Monografia de conclusão de curso, - Setor de Ciências Biológicas, UFPR, 2006.
- BONTADINI, A.; TESTI, M.; CUCCIA, M.C.; MARTINETTI, M.; CARCASSI, C.; CHIESA, A.; COSENTINI, E.; DAMETTO, E.; FRISON, S.; IANNONE, A.M.; LOMBARDO, C.; MALAGOLI, A.; MARIANI, M.; MARIOTTI, L.; MASCARETTI, L.; MELE, L.; MIOTTI, V.; NESCI, S.; OZZELLA, G.; PIANCATELLI, D.; ROMEO, G.; TAGLIAFERRI, C.; VATTA, S.; ANDREANI, M.; CONTE, R. **Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population**. *J Transl Med.* 27;4-44, 2006.
- BROWN, M.G.; SCALZO, A.A.; YOKOYAMA, W.M. **The NKC and regulation of natural killer cell mediated immunity**. In *MHC-Evolution Structure and Function*, ed M. Kasahara; Tokyo:Springer, 287-304, 2000.
- CARRINGTON, M.; NORMAN, P. **The *KIR* gene cluster**. 2003. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono\\_003.chapter.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mono_003.chapter.1) em 17/06/2006 às 22h.
- CHANG, C.; RODRÍGUEZ, A.; CARRETERO, M.; LÓPEZ-BOTET, M.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L. **Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily**. *Eur J Immunol.* 1995.
- CONTRERAS, G.; ALÁEZ, C.; MURGUÍA, A.; GARCÍA, D.; FLORES, H.; GORODEZKY C. **Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptor in Mexican Mestizos**. *Tissue Antigens* 69:125-129, 2007.
- CRUM, K.A.; LOGUE, S.E.; CURRAN, M.D.; MIDDLETON D. **Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (*KIR*) gene sequence repertoires**. *Tissue Antigens* 56:313-326, 2000.
- EWERTON, D.P.; LEITE, M.M.; MAGALHÃES, M.; SENA, L.; SANTOS, E.J.M. **Amazonian Amerindians exhibit high variability of *KIR* profiles**. *Immunogenetics*, 2007.
- GOMEZ-LOZANO, N.; GARDINER, C.M.; PARHAM, P.; VILCHES, C. **Some human *KIR* haplotypes contain two *KIR2DL5* genes: *KIR2DL5A* and *KIR2DL5B***. *Immunogenetics* 54:314, 2002.
- GUTIERREZ-RODRIGUEZ, ME.; SANDOVAL-RAMIREZ, L.; DIAZ-FLORES, M.; MARSH, SG.; VALLADARES-SALGADO, A.; MADRIGAL, JA.; MEJIA-ARANGURE, JM.; GARCIA, CA.; HUERTA-ZEPEDA, A.; IBARRA-CORTES, B.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; CRUZ, M. ***KIR* Gene in Ethnic and Mestizo Populations from Mexico**. *Hum Immunol* 67:85-93; 2006.
- HSU, K.C.; LIU, X.R.; SELVAKUMAR, A.; MICKELSON, E.; O'REILLY, R.J.; DUPONT, B. **Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets**. *J Immunol* 169:5118-5129, 2002.

- JIANG, K.; ZHU, F.M.; LV, Q.F.; YAN, L.X. **Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population.** *Tissue Antigens* 65:556-63, 2005.
- KATZ, G.; MARKEL, G.; MIZRAHI, S.; ARNON, T.I.; MANDELBOIM, O. **Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4.** *J Immunol.* 166:7260-7, 2001.
- KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. **Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters.** *PLoS Genet*:1:129–39, 2005.
- KIKUCHI-MAKI, A.; YUSA, S.; CATINA, T.L.; CAMPBELL, K.S. **KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production.** *J Immunol* 171:3415-25, 2003.
- KHAKOO, S.I.; RAJALINGAM, R.; SHUM, B.P.; WEIDENBACH, K.; FLODIN, L.; MUIR, D.G.; CANAVEZ, F.; COOPER, S.L.; VALIANTE, N.M.; LANIER, L.L.; PARHAM, P. **Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans.** *Immunity* 12:687-98, 2000.
- KHAKOO, S.I. et al. **HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection.** *Science* 305:872-874, 2004.
- KHAKOO, S.I.; CARRINGTON M. **KIR and disease: a model system or system of models?** *Immunol Rev.* 214:186-201, 2006.
- LJUNGGREN, H.G.; KARRE, K. **In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.** *Immunol Today* 12:95; 1991.
- LONG, E.O.; COLONNA, M.; LANNIER, L.L. **Inhibitory MHC Class I receptors on NK and T Cells: a standard nomenclature.** *Immunol Today*; 17: 100-100; 1996.
- MARSH SGE, PARHAM P, DUPONT B, GERAGHTY DE, TROWSDALE J, MIDDLETON D, VILCHES C, CARRINGTON M, WITT C, GUETHLEIN LA, SHILLING HG, GARCIA CA, HSU KC, WAIN H. **Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002.** *Tissue Antigens* 62:79-86, 2003.
- MARTIN A.M.; FREITAS, E.M.; WITT, C.S.; CHRISTIANSEN, F.T. **The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster.** *Immunogenetics* 51:268-280, 2000.
- MARTIN, M.P.; GAO, X.; LEE, J.H.; NELSON, G.W.; DETELS, R.; GOEDERT, J.J.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K.; VLAHOV, D.; TROWSDALE, J.; WILSON, M.; O'BRIEN, S.J.; CARRINGTON, M. **Epistatic interaction between *KIR3DS1* and HLA-B delays the progression to AIDS.** *Nat Genet Aug* 31:429-34, 2002.
- MARTIN, M.P.; BASHIROVA, A.; TRATHERNE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. **Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over.** *J Immunol* 171:2192-5, 2003.
- MAXWELL, L.D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D.; CURRAN, M.D. **A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey.** *Tissue Antigens* 60:254-8, 2002.
- MILLER, M. P. **RXC: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer.** Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.



MIYASHITA, R.; TSUCHIYA, N.; YABE, T.; KOBAYASHI, S.; HASHIMOTO, H.; OZAKI, S.; TOKUNAGA, K. **Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with microscopic polyangiitis.** *Arthritis Rheum.* 54:992-7, 2006.

NATARAJAN, K.; DIMASI, N.; WANG, J.; MARIUZZA, R.A.; MARGULIES, D.H. **Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination.** *Annu Rev Immunol* 20:853-85, 2002.

NORMAN, P.J.; STEPHENS, H.A.; VERITY, D.H.; CHANDANAYINGYONG, D.; VAUGHAN, R.W. **Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups.** *Immunogenetics* 52:195, 2001.

NORMAN, P.J.; CARRINGTON, C.V.; BYNG, M.; MAXWELL, L.D.; CURRAN, M.D.; STEPHENS, H.A.; CHANDANAYINGYONG, D.; VERITY, D.H.; HAMEED, K.; RAMDATH, D.D.; VAUGHAN, R.W. **Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations.** *Genes Immun* Apr 3:86-95, 2002.

PARHAM, P. **Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors.** *Molecular Immunology* 42:459-462, 2005.

PROBST, C.M. **CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos e genética de populações.** Programa distribuído pelo autor. Curitiba, 1998.

RAULET, D.H. **Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells.** *Semin Immunol* 18:145-50, 2006.

RAYES, R.; BAZARBACHI, A.; KHAZEN, G.; SABBAGH, A.; ZAATARI, G.; MAHFOUZ, R. **Natural Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Genotypes in two Arab Populations: Will KIR become a genetic landmark between nations?** *Mol Biol Rep* 17385087, 2007.

ROBINSON, J.; WALLER, M.J.; PARHAM, P.; DE GROOT N, BONTROP R, KENNEDY LJ, STOEHR P, MARSH SGE. **IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex.** *Nucleic Acids Research* 31:311-314, 2003.

SHILLING, H.G.; GUETHLEIN, L.A.; CHENG, N.W.; GARDINER, C.M.; RODRIGUEZ, R.; TYAN, D.; PARHAM, P. **Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype.** *J Immunol* 168: 2307-15, 2002.

TONEVA, M.; LEPAGE, V.; LAFAY, G.; DULPHY, N.; BUSSON, M.; LESTER, S.; VU-TRIEN, A.; MICHAYLOVA, A.; NAUMOVA, E.; MCCLUSKEY, J.; *et al.* **Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations.** *Tissue Antigens* 57:358, 2001.

TROWSDALE, J. **Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes.** *Immunity* 15:363-74, 2001.

UHRBERG, M.; VALIANTE, N.M.; SHUM, B.P.; SHILLING, H.G.; LIENERT-WEIDENBACH, K.; CORLISS, B.; TYAN, D.; LANIER, L.L.; PARHAM, P. **Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes.** *Immunity* 7:753-763; 1997

UHRBERG, M., PARHAM, P. e WERNET P. **Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes.** *Immunogenetics* 54:221; 2002.

VILCHES, C.; PARHAM, P. **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** *Annu Rev Immunol* 20:217-51, 2002.

WENDE, H.; COLONNA, M.; ZIEGLER, A.; VOLZ, A. **Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4.** *Mamm Genome* 10: 154–60, 1999.

WILSON M.J.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; MILNE, S.; JONES, T.; SHEER, D.; BECK, S.; TROWSDALE, J. **Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families.** *Proc Natl Acad Sci* 97:4778-4783, 2000.

WITT, C.S.; MARTIN, A.; CHRISTIANSEN, F.T. **Detection of KIR2DL4 alleles by sequencing and SSCP reveals a common allele with a shortened cytoplasmic tail.** *Tissue Antigens* 56:248-57, 2000.

YAWATA, M.; YAWATA, N.; MCQUEEN, K.L.; CHENG, N.W.; GUETHLEIN, L.A.; RAJALINGAM, R.; SHILLING, H.G.; PARHAM, P. **Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression.** *Immunogenetics* 54:543; 2002.

YOUNG NT, CANAVEZ F, UHRBERG M, SHUM BP, PARHAM P. **Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex.** *Immunogenetics* 53:270, 2001.