

LIANA ALVES DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE POPULACIONAL DE MICROSSATÉLITES DO COMPLEXO  
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) EM POPULAÇÕES  
INDÍGENAS DO PARANÁ E DO MATO GROSSO DO SUL**

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

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

CURITIBA

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**DIVERSIDADE POPULACIONAL DE MICROSSATÉLITES DO COMPLEXO  
PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (MHC) EM POPULAÇÕES  
INDÍGENAS DO PARANÁ E DO MATO GROSSO DO SUL**

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

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

Aluna: Liana Alves de Oliveira

CURITIBA

2007

Dedico à minha família, ao amado Terror e  
aos futuros geneticistas de populações...

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para que este trabalho fosse possível.

À todos os professores do departamento de Genética da UFPR, pelos ensinamentos e pelo companheirismo. Em especial ao professor Karam, grande amigo; ao professor Gabardo, ótimo vizinho; à professora Eleidi, que está sempre disposta a ajudar e à professora Graça, pelo acompanhamento do trabalho e sugestões.

À professora Maria Luiza, minha orientadora, pelo incentivo desde o início da minha iniciação científica, pelo apoio, por muitas e muitas horas que dedicou para ler este trabalho, sentar comigo e esclarecer minhas inacabáveis dúvidas e pela grande contribuição à ciência, que nos inspira diariamente.

Aos membros da banca, Ricardo e Diogo, pelas importantes sugestões e críticas.

Aos funcionários do departamento de Genética, em especial às amigas Valéria e Luciana e à Anilda, que além de grande amiga me ajudou com as genotipagens no MegaBACE.

Aos colegas de laboratório, que tornam o dia-a-dia agradável e menos cansativo, que dão apoio nos momentos difíceis e que põe a mão na massa para ajudar sempre que possível. Em especial à Márcia, que analisou os microsatélites na população de Curitiba e à Karin, que deu uma força com HLA.

À CAPES, ao CNPq e à Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

Aos Kaingang e Guarani, que há anos contribuíram com a doação do seu precioso sangue.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado mesmo que a distância geográfica fosse grande. Em especial ao Daniel, pelos milhões de plots de desequilíbrio de ligação gerados.

À minha família, que sempre foi muito compreensiva e sempre me apoiou muito durante minha carreira acadêmica, sempre com muito amor.

Ao Terror, pela paciência, compreensão, horas de aeroporto e de estrada, ombro para as crises de choro, força nos momentos difíceis e sempre muito amor. E, é claro, pela super força com o excel! Sem você eu não teria conseguido!!!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
2.1 AMERÍNDIOS.....	2
2.1.1 O povoamento das Américas.....	2
2.1.2 Diversidade encontrada na América do Sul.....	4
2.1.3 Povos indígenas do Brasil.....	5
2.1.4 As populações deste estudo.....	7
2.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	8
2.2.1 Estrutura.....	8
2.2.2 Genes <i>HLA</i> .....	8
2.2.3 Microssatélites.....	10
<b>3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS</b> .....	17
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
4.1 AMOSTRA POPULACIONAL.....	18
4.2 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES.....	19
4.3 ANÁLISE DOS GENES DO MHC.....	25
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
<b>5 RESULTADOS</b> .....	28
5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	28
5.1.1 Microssatélites da Região de Classe II.....	28
5.1.2 Microssatélites da Região de Classe III.....	39
5.1.3 Microssatélites da Região de Classe I.....	43

5.2 DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES.....	60
5.3 HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	62
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	79
6.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	79
6.2 DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES.....	87
6.3 HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	88
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	91
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Povos indígenas dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul (FONTE: Instituto Socioambiental).....	6
<b>TABELA 2.</b> Troncos e famílias lingüísticas dos povos indígenas do Brasil (FONTE: Instituto Socioambiental).....	6
<b>TABELA 3.</b> Unidade de repetição, número de alelos e heterozigosidade dos microssatélites investigados neste trabalho.....	13
<b>TABELA 4.</b> Estudos populacionais já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho.....	13
<b>TABELA 5.</b> Estudos não populacionais que trazem dados de frequência alélica já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho.....	14
<b>TABELA 6.</b> Estudos não populacionais que não trazem dados de frequência alélica já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho.....	15
<b>TABELA 7.</b> Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos resultantes da PCR e marcação fluorescente para cada microssatélite.....	20
<b>TABELA 8.</b> Concentrações dos reagentes e temperaturas de hibridação nas PCR.....	22
<b>TABELA 9.</b> Concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) nas PCR.....	22
<b>TABELA 10.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S439</i> .....	29
<b>TABELA 11.</b> Valores de <i>p</i> nas comparações das frequências alélicas de <i>D6S439</i> entre populações.....	29
<b>TABELA 12.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S439</i> .....	30
<b>TABELA 13.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S291</i> .....	32
<b>TABELA 14.</b> Valores de <i>p</i> nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S291</i> .....	32
<b>TABELA 15.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S291</i> .....	32
<b>TABELA 16.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S2749 (RING3CA)</i> .....	33
<b>TABELA 17.</b> Valores de <i>p</i> nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S2749 (RING3CA)</i> .....	34
<b>TABELA 18.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S2749 (RING3CA)</i> .....	34
<b>TABELA 19.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S2874 (TAPICA)</i> .....	36
<b>TABELA 20.</b> Valores de <i>p</i> nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S2874 (TAPICA)</i> .....	36
<b>TABELA 21.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S2874 (TAPICA)</i> .....	36
<b>TABELA 22.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S2876 (G51152)</i> .....	37

<b>TABELA 23.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S2876 (G51152)</i> .....	37
<b>TABELA 24.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S2876 (G51152)</i> .....	38
<b>TABELA 25.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S273</i> .....	40
<b>TABELA 26.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S273</i> .....	40
<b>TABELA 27.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S273</i> .....	40
<b>TABELA 28.</b> Frequências alélicas (%) de <i>TNFD</i> .....	41
<b>TABELA 29.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>TNFD</i> .....	42
<b>TABELA 30.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>TNFD</i> .....	42
<b>TABELA 31.</b> Frequências alélicas (%) de <i>STR_MICA</i> .....	45
<b>TABELA 32.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>STR_MICA</i> .....	45
<b>TABELA 33.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>STR_MICA</i> .....	46
<b>TABELA 34.</b> Frequências alélicas (%) de <i>STR_MICA</i> em Kaingang, considerando-se a deleção do gene <i>MICA</i> .....	46
<b>TABELA 35.</b> Frequências alélicas (%) de <i>HLABC-2CA</i> .....	48
<b>TABELA 36.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>HLABC-2CA</i> .....	49
<b>TABELA 37.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>HLABC-2CA</i> .....	49
<b>TABELA 38.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S265</i> .....	51
<b>TABELA 39.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S265</i> .....	51
<b>TABELA 40.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S265</i> .....	51
<b>TABELA 41.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S2972 (MOGCA)</i> .....	52
<b>TABELA 42.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S2972 (MOGCA)</i> .....	53
<b>TABELA 43.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S2972 (MOGCA)</i> .....	53
<b>TABELA 44.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S105</i> .....	55
<b>TABELA 45.</b> Valores de $p$ nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S105</i> .....	55



<b>TABELA 46.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S105</i> .....	56
<b>TABELA 47.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S276</i> .....	57
<b>TABELA 48.</b> Valores de <i>p</i> nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S276</i> .....	57
<b>TABELA 49.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S276</i> .....	57
<b>TABELA 50.</b> Frequências alélicas (%) de <i>D6S2222</i> .....	59
<b>TABELA 51.</b> Valores de <i>p</i> nas comparações entre populações das frequências alélicas de <i>D6S2222</i> .....	59
<b>TABELA 52.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para <i>D6S2222</i> .....	59
<b>TABELA 53.</b> Distâncias genéticas entre as populações.....	61
<b>TABELA 54.</b> Frequências haplotípicas (%) para os locos <i>HLA-DPA1</i> , <i>HLA-DPB1</i> , <i>D6S2749 (RING3CA)</i> , <i>HLA-DMA</i> e <i>HLA-DMB</i> nas populações indígenas do estado do Paraná.....	76
<b>TABELA 55.</b> Frequências haplotípicas (%) para os locos <i>LMP2</i> , <i>D6S2874 (TAP1CA)</i> , <i>TAP1</i> , <i>LMP7</i> e <i>TAP2</i> nas populações indígenas do estado do Paraná.....	76
<b>TABELA 56.</b> Frequências haplotípicas (%) para os locos <i>D6S2876 (G51152)</i> , <i>HLA-DQB1</i> , <i>HLA-DQA1</i> e <i>HLA-DRB1</i> nas populações deste trabalho.....	77
<b>TABELA 57.</b> Frequências haplotípicas (%) para os locos <i>STR_MICA</i> , <i>HLA-B</i> , <i>HLABC-2CA</i> , <i>HLA-C</i> , <i>D6S265</i> , <i>HLA-A</i> e <i>D6S2972 (MOGCA)</i> nas populações deste trabalho.....	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Posição dos microssatélites no MHC.....	12
<b>FIGURA 2.</b> Picos do marcador de peso molecular ET400-R (GE Healthcare).....	23
<b>FIGURA 3.</b> Gráfico gerado pelo programa <i>Fragment Profiler version 1.2</i> (GE Healthcare) com base nos picos do marcador de peso molecular ET400-R (GE Healthcare).....	24
<b>FIGURA 4.</b> Exemplo da visualização dos resultados no programa <i>Fragment Profiler version 1.2</i> (GE Healthcare).....	25
<b>FIGURA 5.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S439</i> .....	30
<b>FIGURA 6.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S291</i> .....	33
<b>FIGURA 7.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S2749 (RING3CA)</i> .....	34
<b>FIGURA 8.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S2874 (TAP1CA)</i> .....	37
<b>FIGURA 9.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S2876 (G51152)</i> .....	38
<b>FIGURA 10.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S273</i> .....	41
<b>FIGURA 11.</b> Frequências genotípicas de <i>TNFD</i> .....	43
<b>FIGURA 12.</b> Frequências genotípicas de <i>STR_MICA</i> .....	46
<b>FIGURA 13.</b> Frequências genotípicas de <i>HLABC-2CA</i> .....	49
<b>FIGURA 14.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S265</i> .....	52
<b>FIGURA 15.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S2972 (MOGCA)</i> .....	53
<b>FIGURA 16.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S105</i> .....	56
<b>FIGURA 17.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S276</i> .....	58
<b>FIGURA 18.</b> Frequências genotípicas de <i>D6S2222</i> .....	60
<b>FIGURA 19.</b> Dendrograma não-enraizado com as populações deste estudo e uma população de Curitiba.....	61
<b>FIGURA 20.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes <i>HLA</i> de classe II observado nos Guarani M'byá.....	63
<b>FIGURA 21.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes <i>HLA</i> de classe II observado nos Guarani Kaiowá.....	64
<b>FIGURA 22.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes <i>HLA</i> de classe II observado nos Guarani Nandeva.....	65
<b>FIGURA 23.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes <i>HLA</i> de classe II observado nos Kaingang de Rio das Cobras.....	66
<b>FIGURA 24.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes <i>HLA</i> de classe II observado nos Kaingang de Ivaí.....	67
<b>FIGURA 25.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes <i>HLA</i> de classe II observado na população de Curitiba.....	68
<b>FIGURA 26.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Guarani Kaiowá.....	69

<b>FIGURA 27.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Guarani Ñandeva.....	70
<b>FIGURA 28.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Guarani M'byá.....	71
<b>FIGURA 29.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Kaingang de Rio das Cobras.....	72
<b>FIGURA 30.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Kaingang de Ivaí.....	73
<b>FIGURA 31.</b> Gráfico dos valores de $D'$ em relação à distância entre os locos.....	74

## RESUMO

Microsatélites são seqüências curtas de DNA, repetidas em *tandem*, que ocorrem em todo o genoma. Muitos apresentam alto grau de polimorfismo e são bons marcadores genéticos para estudos populacionais. A genética de populações é uma ótima ferramenta para melhorar nosso entendimento da história das populações humanas e da evolução de genes e de genomas. Neste trabalho, caracterizamos 14 microsatélites da região genômica do MHC em populações ameríndias dos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul. Foram descritas as freqüências alélicas e genotípicas, o desequilíbrio de ligação dos microsatélites com genes desta região cromossômica estudados anteriormente e as distâncias genéticas entre as populações. Foram feitas comparações das freqüências alélicas entre as populações deste estudo e com populações descritas na literatura. Além disso, foi construído um dendrograma baseado nas freqüências alélicas dos microsatélites. Os microsatélites com a maior diversidade genética estão na região do MHC de classe I, o que é consistente com um resultado anterior que encontrou maior diversidade próximo ao gene *HLA-B*. A população com maior diversidade foi Guarani Ñandeva, que também teve a menor distância genética em relação a uma população euro-brasileira. Estes resultados são consistentes com o maior fluxo gênico com populações não ameríndias observado anteriormente para essa população. Nos Kaingang, foi encontrado pela primeira vez em um estudo populacional uma alta freqüência do alelo *STR\_MICA\*A10*. Este alelo parece ter surgido associado ao *HLA-B\*3505*, que é evolutivamente novo e exclusivo de ameríndios e que teria sido favorecido pela seleção natural balanceadora e/ou por deriva genética, fazendo com que a freqüência do alelo *STR\_MICA\*A10* também aumentasse. Os resultados deste estudo evidenciam a grande distância genética entre os Kaingang e os Guarani, apesar da grande proximidade geográfica. Os resultados também confirmam o forte desequilíbrio de ligação entre genes do MHC, principalmente entre os genes *HLA* clássicos. Além disso, os resultados apontam para uma evolução mais rápida na região do MHC de classe I.

## ABSTRACT

Microsatellites are short tandem repeats (STR) found throughout the genome. Many are highly polymorphic, being good markers for genetics studies. In the present work, we analysed 14 microsatellites of the MHC region in the Brazilian Amerindian populations, Guarani and Kaingang, with the aim of characterizing the populations and improving the knowledge on MHC evolution. The allelic and genotypic frequencies of all markers are described and compared to those in the literature for other populations. The allelic frequencies were also used to estimate the genetic distances between the populations, which were then used to construct a dendrogram. The patterns of linkage disequilibrium among the microsatellites and with other MHC loci are described. Haplotypic frequencies were estimated for the loci in strong linkage disequilibrium. First, the most polymorphic loci were those located in the MHC class I region. The population found to have the greatest diversity was Guarani Ñandeva, that also has the smallest distance to an Euro-Brazilian population, what can be explained by more intense gene flow with non Amerindian populations, which was observed previously. Additionally, the allele *STR\_MICA\*A10* was observed for the first time with a significant frequency in a population, the Kaingang. It was found in a haplotype containing *HLA-B\*3505*, an allele exclusive to the Amerindians and thought to have emerged in South America. It is possible that the high frequency of *STR\_MICA\*A10* in the Kaingang is explained by the balancing selection and genetic drift that have favored the new *HLA* alleles in the Amerindians, as proposed in the turnover hypothesis. The results also highlight the great genetic distance between the Kaingang and Guarani, despite the short geographic distance. Finally, the results point to a faster evolution in the class I region, with stronger patterns of linkage disequilibrium, greater diversity and greater differentiation among populations.

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo de genes em populações é muito empregado no entendimento da evolução humana, da história demográfica de populações, da evolução de seqüências genômicas e da base genética de doenças. Como exemplo de seu potencial, pode-se reconstruir a evolução de grupos humanos a partir de dados genéticos de populações atuais. Para tal, deve-se colher o máximo de informações sobre o maior número possível de genes, especialmente em populações isoladas, como as ameríndias, que não apresentam fluxo gênico recente tão intenso quanto o que ocorre em populações urbanas (CAVALLI-SFORZA, 2003).

Nesse contexto, a caracterização de populações quanto aos genes de proteínas do sistema imune é duplamente informativa, pois estes podem estar participando da patogênese de certas doenças. Um alelo que confira susceptibilidade a uma doença pode ser raro em uma população e comum em outra, tendo impacto diferente em cada uma delas. Assim, o conhecimento das freqüências alélicas pode servir de referência para estudos de associação com doenças na população em questão e podem ajudar a compreender a susceptibilidade/resistência nela encontradas (PETZL-ERLER, 1999).

Para a caracterização de populações podem ser utilizados marcadores genéticos, como os microssatélites, os quais são seqüências curtas que se repetem em *tandem*. Encontram-se espalhados pelo genoma e alguns tem alto grau de polimorfismo, sendo muito informativos no estudo genético de populações. Além disso, muitos microssatélites estão em desequilíbrio de ligação com genes próximos a eles, podendo também trazer informações a respeito desses genes, como, por exemplo, sobre sua história evolutiva (FOISSAC *et al.*, 1997; FOISSAC *et al.*, 2000).

No presente trabalho foram caracterizados microssatélites da região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em populações indígenas. O MHC é uma região cromossômica que contém muitos genes que codificam proteínas do sistema imune, inclusive os genes das moléculas HLA (JANEWAY e TRAVERS, 1997), os quais são extensivamente estudados, tanto para caracterização de populações, quanto para estudos de associação com doenças. Sabe-se relativamente muito sobre a evolução dos genes *HLA*, mas para o restante do MHC este tipo de conhecimento é mais restrito. Um dos objetivos deste trabalho é a unificação de dados de genes e microssatélites da região do MHC.

As populações escolhidas para este trabalho são os Guarani e Kaingang dos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul. Segundo estudos anteriores estes grupos apresentam características culturais, lingüísticas e genéticas bem distintas (PETZLERLER *et al.*, 1993; TSUNETO *et al.*, 2003). O fato de estes grupos serem tão diferentes é surpreendente se levarmos em conta a proximidade geográfica existente entre eles.

O presente estudo poderá trazer maiores informações sobre a distância genética e a existência ou não de fluxo gênico entre as populações de Guarani e Kaingang. Para tal, marcadores microssatélites são úteis, pois possuem uma alta taxa de mutação (CULLEN *et al.*, 2003), sendo muito informativos mesmo quando as populações em questão divergiram há um curto período de tempo.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 AMERÍNDIOS**

#### **2.1.1 O povoamento das Américas**

Sempre houve interesse em entender a origem das populações nativas das Américas. Muitas abordagens, como arqueológica, paleontológica, lingüística e genética, foram utilizadas e muitas hipóteses já foram elaboradas a este respeito. É consenso entre os cientistas a hipótese de que o homem chegou na América, através do estreito de Bering, provindo da Sibéria, durante a última glaciação. As principais perguntas, ainda em aberto, concernem à quantidade de ondas migratórias que efetivamente ocorreram, o período de ocorrência da primeira delas e quais rotas teriam sido utilizadas (ROGERS *et al.*, 1992; WALLACE e TORRONI, 1992).

Uma hipótese afirma que houve três ondas migratórias. A primeira teria ocorrido há mais de 11.500 anos e corresponderia às populações que originaram os Ameríndios, que se espalharam por todo o continente, até a América do Sul. Esta primeira migração estaria associada ao complexo Clovis (nome dado a um estilo de ferramentas encontrado em escavações na América do Norte). Uma segunda onda teria dado origem aos Aleutas e Esquimós e uma terceira onda teria originado os Na-Dene. Esta teoria encontra suporte em dados genéticos, lingüísticos, dentários e paleobiológicos (ROGERS *et al.*, 1992; STEELE e POWELL, 1992; SARDI *et al.*, 2005).

A discussão mais calorosa se refere a data da primeira migração ou migrações que originaram os Ameríndios. Datas como 150.000 anos já foram propostas (IRVING, 1985 *apud* SCHANFIELD, 1992). Há evidências de que por dois períodos a faixa de terra do estreito de Bering estaria exposta e descongelada, entre 75.000 a 45.000 anos atrás e entre 25.000 e 14.000 anos atrás. Entre estes dois períodos, ou seja, de 25.000 a 45.000 anos atrás, seria possível atravessar até o Alasca de barco ou cruzando o estreito congelado (ROGERS *et al.*, 1992).

Estudos genéticos têm sido amplamente realizados e os resultados podem apoiar mais de uma teoria. Em um estudo de alótipos de imunoglobulinas conclui-se que pelo menos quatro migrações ocorreram. A primeira teria sido entre 17.000 e 25.000 anos atrás e teria originado os Ameríndios do sul. A segunda, entre 10.000 e 13.000 anos, teria originado os Ameríndios do Canadá, Estados Unidos e norte do México. As migrações seguintes originariam os Aleutas e Esquimós e depois os Na-Dene e teriam ocorrido entre 8.000 e 10.000 anos atrás (SCHANFIELD, 1992). Uma hipótese semelhante é apoiada por dados de DNA mitocondrial. A diferença seria a datação da primeira migração em 21.000 a 42.000 anos atrás (WALLACE e TORRONI, 1992). Porém, em um estudos posteriores, utilizando-se tanto alótipos de imunoglobulinas quanto DNA mitocondrial, foram obtidos resultados concordantes com as hipóteses anteriores de três migrações (DUGOUJON *et al.*, 1995; FUSELLI *et al.*, 2003). Em outro estudo com DNA mitocondrial, no qual é feita uma síntese dos dados publicados até aquela época, sugere-se apenas uma migração saindo da Ásia para a Beríngia. Nesta hipótese, a separação dos Ameríndios dos demais (Na-Dene e Esquimós) teria ocorrido na Beríngia, pelo bloqueio de uma passagem (o corredor de Alberta). Esta migração teria ocorrido entre 22.000 e 55.000 anos atrás (BONATTO e SALZANO, 1997a; BONATTO e SALZANO, 1997b). Em uma hipótese parecida propõe-se duas migrações saindo da Ásia para a Beríngia, a primeira há aproximadamente 34.000 anos atrás, e a segunda entre 16.000 e 13.000 anos atrás. Os Ameríndios teriam, em sua maioria, se originado desta primeira migração, enquanto que as demais populações teriam se diferenciado na Beríngia em diferentes refúgios no final da última glaciação (STARIKOVSKAYA *et al.*, 1998).

Em alguns estudos utilizaram-se apenas amostras de populações Ameríndias. Em um destes, que utilizou DNA mitocondrial, sugere-se quatro migrações da Ásia originando os Ameríndios, entre 14.000 e 21.000 anos atrás (HORAI *et al.*, 1993). Já



em outro, que utilizou cromossomo Y, propõe-se uma única migração e um único haplótipo fundador de cromossomo Y (PENA *et al.*, 1995).

Estudos de craniometria também são abundantes e apontam em uma outra direção. Os crânios mais antigos têm morfologia mais semelhante à de australianos e africanos do que à de asiáticos modernos. Isto poderia ser explicado por uma migração antiga, vinda da Ásia, de indivíduos com morfologia não mongolóide. Posteriormente, uma ou mais ondas migratórias teriam originado os Ameríndios, Na-Dene e Esquimós, substituindo os chamados Paleoíndios (GONZÁLEZ-JOSÉ *et al.*, 2001; GONZÁLEZ-JOSÉ *et al.*, 2005; NEVES *et al.*, 2005; NEVES e HUBBE, 2005; SARDI *et al.*, 2005).

Com a utilização de modelos matemáticos para estimar o número de indivíduos que teriam vindo da Ásia para as Américas, originando os Ameríndios, sugeriu-se um tamanho da população efetiva de fundadores em torno de 70 indivíduos. Isto representaria 1% da população asiática de origem. Se isto for real, fica evidente o efeito fundador ocorrido e o forte efeito da deriva genética nas populações Ameríndias. Além disso, nesse estudo estimou-se a data da chegada destes indivíduos entre 7.000 e 33.000 anos atrás (HEY, 2005).

Ainda estamos longe de um consenso quanto ao povoamento das Américas, principalmente no que diz respeito à data da chegada do homem no continente, ao número de migrações e às rotas utilizadas. Mais estudos, englobando um maior número de dados e integração de dados de diferentes áreas, poderão permitir uma maior compreensão desta questão.

### 2.1.2 Diversidade encontrada na América do Sul

Os indígenas da América do Sul apresentam uma grande diversidade genética e lingüística, maior que a observada na América do Norte. Em alguns estudos tentou-se relacionar esta grande diversidade genética com distribuições geográficas, mas os resultados são contraditórios. Em um estudo com genes HLA de classe I, foi encontrado um gradiente longitudinal muito claro, determinado pela variação de frequência de alguns alelos. Foram vistos também gradientes latitudinais. Estes gradientes mostram que as frequências alélicas estão relacionadas com a distribuição geográfica das populações (ROTHHAMMER *et al.*, 1997). Em outro estudo, que descreve os dados de frequência encontrados para Kaingang e Guarani e os compara com outras 7 populações Ameríndias, não foi observada nenhuma relação entre distâncias genéticas e língua ou

distância geográfica das populações (PETZL-ERLER *et al.*, 1993), assim como em um estudo no qual foram utilizados antígenos de hemáceas (O'ROURKE *et al.*, 1992). Em um estudo mais recente com genes *HLA* foi observada uma relação entre distância genética e distância cultural e lingüística (TSUNETO *et al.*, 2003).

Em um trabalho com microssatélites do cromossomo Y em várias populações foi verificada uma diferença entre as populações do leste e do oeste do continente. No oeste (populações dos Andes) a variação intra-populacional é maior que nas populações do leste. Além disso, a variação inter-populacional é menor no oeste. Estas variações foram explicadas por maiores tamanhos efetivos populacionais e maior grau de fluxo gênico nas populações dos Andes. Essas hipóteses são consistentes com a diversidade lingüística e cultural observada no continente e também com dados históricos e paleoecológicos (TARAZONA-SANTOS *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Povos indígenas do Brasil

Hoje existem aproximadamente 200 povos indígenas no Brasil, totalizando 370 mil indivíduos. Destes, 60% vivem na Amazônia legal, composta pelos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e parte oeste do Maranhão. Nos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul são encontrados nove povos (Tabela 1).

São faladas 180 línguas e dialetos pelos povos indígenas do país. Antes da colonização pelos portugueses acredita-se que este número chegava a 1.000. Das 180 línguas, 11 são faladas por mais de 5.000 pessoas: Baniwa, Guajajara, Kaingang, Kayapó, Makuxi, Sateré-mawé, Terena, Ticuna, Xavante, Yanomami e Guarani (Instituto Socioambiental). As línguas apresentam similaridades, permitindo classificá-las em famílias e troncos lingüísticos. Um tronco lingüístico é constituído por línguas que tiveram uma origem comum há milhares de anos atrás e entre as quais as semelhanças são sutis. As famílias são formadas por línguas mais próximas e mais semelhantes. As 180 línguas ou dialetos dos povos indígenas do Brasil estão distribuídas em 2 troncos lingüísticos, Tupi e Macro-Jê, e algumas famílias isoladas (que não foram classificadas em nenhum tronco lingüístico). Na tabela 2 são mostrados estes troncos com suas famílias lingüísticas e uma das línguas de cada família para exemplificar (Instituto Socioambiental). O tronco Indo-Europeu foi colocado para ilustrar melhor as semelhanças entre línguas de um mesmo tronco ou família.

**TABELA 1.** Povos indígenas dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul (FONTE: Instituto Socioambiental).

PARANÁ		
Povo	Outros nomes, grafias e/ou sub-grupos	Família/língua
Guarani	Ñandeva (Avakatueté, Chiripá), M'byá Caingangue	Tupi-Guarani
Kaingang		Jê
Xetá		Tupi-Guarani
MATO GROSSO DO SUL		
Povo	Outros nomes, grafias e/ou sub-grupos	Família/língua
Chamacoco		Samuko
Guarani	Kaiowá (Pãi Tavyterã), Ñandeva (Avakatueté, Chiripá)	Tupi-Guarani
Guató		Guató
Kadiweu	Caduveo, Cadiuéu	Guaikuru
Kamba	Camba	?
Ofaié	Ofayé-Xavante	Ofaié
Terena		Aruák

**TABELA 2.** Troncos e famílias lingüísticas dos povos indígenas do Brasil (FONTE: Instituto Socioambiental).

TRONCO	FAMÍLIA	Exemplo de LÍNGUA	TRONCO	FAMÍLIA	Exemplo de LÍNGUA
Indo-Europeu	Latina	Português	Tupi	Tupi-Guarani	Guarani*
	Celta	Bretão		Arikém	Karitiana
	Eslava	Russo		Aweti	Aweti
	Germânica	Inglês		Juruna	Juruna
Macro-Jê	Boróro	Boróro		Mawé	Mawé
	Krenák	Krenák		Mondé	Arua
	Guató	Guató		Purobora	Purobora
	Jê	Kaingang*		Mundurukú	Kuruayá
	Karajá	Karajá		Ramarama	Káro
	Maxakali	Maxakali Pataxó		Tupari	Aruju
	Ofayé	Ofayé			
	Rikbaktsa	Rikbaktsa			
Yatê	Yatê				

\*Línguas com dialeto. O Tronco Indo-Europeu foi incluído para efeito de comparação.

#### 2.1.4 As populações deste estudo

Neste trabalho estão sendo estudadas populações Guarani e Kaingang dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul. Os Guarani estão entre as populações que tiveram os primeiros contatos com os colonizadores. Mesmo assim, parte da população continuou isolada e manteve boa parte de sua identidade cultural, principalmente os M'byá e Kaiowá. Sua língua é o Guarani, da família Tupi-Guarani, tronco Tupi, sendo que Kaiowá, Ñandeva e M'byá são dialetos. Atualmente, existem no Brasil 6 mil Guarani M'byá, 18 mil a 20 mil Guarani Kaiowá e 8 mil a 10 mil Guarani Ñandeva, distribuídos nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Eles também são encontrados na Argentina, no Paraguai, no Uruguai e na Bolívia. A agricultura é sua principal atividade econômica, mas apreciam a caça e a pesca. Para os Guarani M'byá, o artesanato é a principal fonte de renda (Instituto Socioambiental).

Já os Kaingang (ou Caingangue) encontram-se nos estados do Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em número de 25 mil. Sua língua é o Kaingang, da família Jê (ou Gê), do tronco Macro-Jê, com 4 dialetos: Kaingang do Paraná, Kaingang Central, Kaingang do Sudoeste e Kaingang do Sudeste. A agricultura é sua principal fonte de subsistência, mas a caça e coleta de frutos também são importantes. Além disso, hoje em dia a venda de produtos artesanais adquiriu grande importância (Instituto Socioambiental).

Os Guarani e Kaingang convivem intimamente por muitos séculos e apesar disso possuem línguas e culturas distintas. Os estudos genéticos destes povos com genes da região do MHC e polimorfismos de proteína demonstram que estas populações diferem entre si geneticamente (BELICH *et al.*, 1992; PETZL-ERLER *et al.*, 1993; WEG-REMERS *et al.*, 1997; PARHAM *et al.*, 1997; SALZANO *et al.*, 1997; SOTOMAIOR *et al.*, 1998; FAUCZ *et al.*, 2000; TSUNETO *et al.*, 2003). Outro dado importante dos estudos com genes *HLA* é a taxa de miscigenação dessas populações com populações não indígenas, calculada em torno de 4% para os Guarani M'byá, 14% para os Guarani Ñandeva e 7% para os Kaingang, para os Guarani Kaiowá não foi detectada nenhuma evidência de fluxo gênico (SOTOMAIOR *et al.*, 1998; TSUNETO *et al.*, 2003). Dessa forma, essas populações fornecem um material singular extremamente interessante para estudos genéticos, evolutivos e antropológicos já que, embora apresentem uma relação de convivência espaço-temporal íntima, divergem geneticamente e culturalmente.

## 2.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

### 2.2.1 Estrutura

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (ou MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) é uma região cromossômica que, em humanos, possui 4 Mb e mais de 200 genes conhecidos. Está localizado no cromossomo 6 (6p21.31) e cerca de 40% de seus genes codificam proteínas envolvidas na resposta imune, o que pode refletir co-evolução de funções ou co-expressão de transcritos relacionados. Historicamente foi dividido em três regiões: classe II (centromérica), classe III e classe I (telomérica). Uma parte da região de classe III, contendo um grupo de genes envolvidos em respostas inflamatórias, incluindo membros da superfamília de fatores de necrose tumoral (TNF), é às vezes chamada de classe IV. A densidade gênica estimada no MHC é de um gene ou pseudogene a cada 16 kb, existindo diferença na proporção entre genes expressos e pseudogenes entre as regiões, sendo que a região de classe III possui um número muito baixo de pseudogenes em relação às outras (The MHC Sequencing Consortium, 1999).

### 2.2.2 Genes *HLA*

Dentre os genes do MHC estão aqueles que codificam as moléculas MHC clássicas, responsáveis pela apresentação de antígenos a células T (JANEWAY e TRAVERS, 1997). Estas moléculas recebem, em humanos, o nome de HLA e são referenciadas em duas classes: I e II. Seus genes apresentam o maior grau de polimorfismo entre os genes humanos, sendo que para classe I o gene mais polimórfico é o *HLA-B* e para classe II é o *HLA-DRB1*. Este alto polimorfismo indica que esses genes estão sofrendo algum tipo de seleção, provavelmente seleção balanceadora, dependente de frequência e/ou favorável aos heterozigotos, modelada pela co-evolução do sistema imune e patógenos humanos (BLACK e SALZANO, 1981; MEYER e THOMSON, 2001).

Os genes *HLA-B* e *HLA-DRB1* também são os mais polialélicos, com 850 e 545 alelos conhecidos, respectivamente (IMGT/HLA Sequence Database). Porém, a maior parte desses alelos é muito rara e alguns são exclusivos de certas populações. Um

estudo de genes *HLA* de classe I com uma população brasileira encontrou 74 alelos de *HLA-B* (BRAUN-PRADO *et al.*, 2000). Populações isoladas, como os Ameríndios, têm um número ainda menor de alelos. Por exemplo, foram encontrados apenas seis alelos de *HLA-DRB1* nos Aché (TSUNETO *et al.*, 2003). A presença de poucos alelos em Ameríndios, somada ao fato dos alelos Ameríndios serem um subconjunto dos alelos encontrados no leste asiático ou serem derivados de alelos deste subconjunto, está de acordo com a hipótese de que estas populações foram formadas a partir de um pequeno número de indivíduos vindos da Ásia. Populações com grande número de alelos são populações urbanas, que resultam da mistura de diferentes sub-populações, o que explica sua grande diversidade.

Outra peculiaridade de populações Ameríndias quanto aos genes *HLA* é a grande proporção de alelos novos encontrados. Quatro a seis alelos de *HLA-A*, oito a quatorze alelos de *HLA-B* e sete a nove alelos de *HLA-C* são hipoteticamente considerados como sendo os alelos fundadores das populações das Américas. Os alelos novos diferem destes por um evento de conversão gênica interalélica, ou ainda por uma mutação de ponto ou por recombinação (PARHAM *et al.*, 1997). Existe uma grande diferença na composição alélica entre as populações da América do Norte comparadas com as Américas Central e do Sul, sendo que um único alelo novo, isto é, diferente dos considerados fundadores, foi encontrado nos Ameríndios do Norte, enquanto que nas Américas Central e do Sul muitos dos alelos são novos e exclusivos destas populações, apesar do número de alelos nestas populações continuar constante. Este processo é conhecido por *turnover* de alelos, com alelos novos substituindo alelos antigos (BELICH *et al.*, 1992; PARHAM *et al.*, 1997).

Foi observado também um gradiente de frequências alélicas para genes *HLA* nos povos da América do Sul, com as frequências de alguns alelos sendo altas em certas regiões e decrescendo nas outras, de acordo com a distribuição geográfica das populações (ROTHHAMMER *et al.*, 1997). Por tudo isso, genes do MHC tem grande importância nos estudos de genética de população e evolução, podendo contribuir para o entendimento da história demográfica das populações e seu grau de miscigenação (CADAVID e WATKINS, 1997; MEYER e THOMSON, 2001).

### 2.2.3 Microssatélites

No genoma humano existem vários trechos de DNA repetitivo. Dentre eles, estão os VNTR (repetições em *tandem* de número variável), que são separados em classes de acordo com seu tamanho: minissatélites e microssatélites. Os microssatélites possuem motivos base com um a seis pares de base (pb), ou seja, uma seqüência com 1 a 6 pb se repete em *tandem* por diversas vezes. São abundantes em todo o genoma, seguem o padrão mendeliano de herança e alguns possuem alto polimorfismo, o que os torna bons marcadores genéticos. Por isso, são muito usados como ferramenta para estudos de doenças genéticas multifatoriais, transplantes, medicina forense, genética de populações e evolução (FOISSAC *et al.*, 1997; FOISSAC *et al.*, 2000).

Os microssatélites possuem uma elevada taxa de mutação, que varia entre  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  por *locus* por geração. Estas mutações ocorrem durante a replicação, na qual ocorre ganho ou perda de repetições, geralmente apenas uma repetição por vez, por um mecanismo de deslizamento da DNA polimerase. Com isso, cada alelo de um microssatélite se refere ao número de repetições encontradas (FOISSAC *et al.*, 1997; CAVALLI-SFORZA, 2003; CULLEN *et al.*, 2003).

Já foram descritos mais de 270 microssatélites na região do MHC (GOURRAUD *et al.*, 2004). Nesta região predominam microssatélites dinucleotídeos (CA)<sub>n</sub>, que são observados a cada 30-60 Kb. Sua importância é aumentada pela localização, pois já foi descrito desequilíbrio de ligação entre alelos de vários genes do MHC e de microssatélites, como por exemplo alelos de genes *HLA* de classe I e de *MOGc* (*D6S2972*) e *D6S265* em haplótipos finlandeses (KARELL *et al.*, 2000).

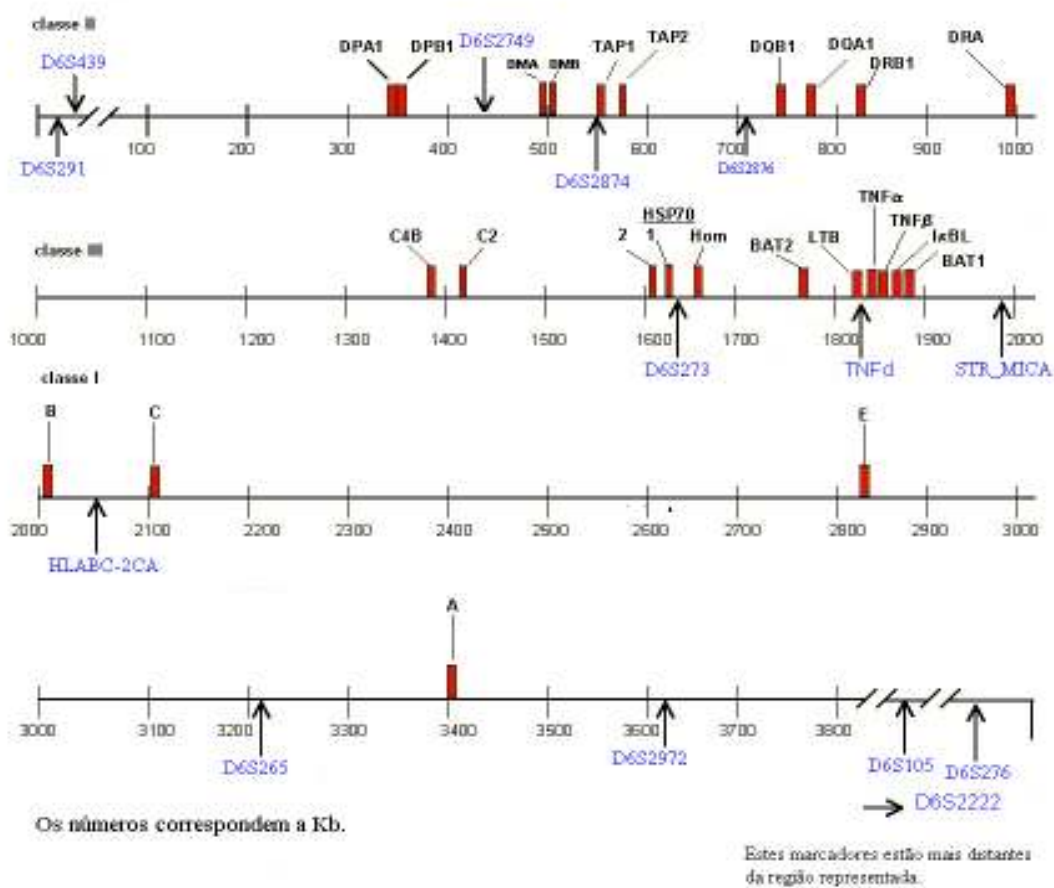
Portanto, microssatélites do MHC são informativos no estudo de genética de populações e já são muito usados para definir grupos, reconstruir migrações e investigar a estrutura genética de populações (PENA *et al.*, 2002). Além disso, são importantes e largamente utilizados na localização de genes de susceptibilidade a doenças, como, por exemplo, diabetes, esclerose múltipla (YU *et al.*, 1999; RUBIO *et al.*, 2002; ver também Tabelas 5 e 6) e pênfigo foliáceo endêmico (PEREIRA *et al.*, dados ainda não publicados do Laboratório de Genética Molecular Humana - UFPR). Existem poucos estudos de microssatélites em populações Ameríndias, mas em um destes estudos percebeu-se uma influência da distribuição geográfica das populações na diversidade destes marcadores, sendo que as populações estudadas tinham diferenças marcantes nas frequências alélicas (KOHLRAUSCH *et al.*, 2005).

Para este estudo, foram selecionados os seguintes microssatélites: *D6S291*, *D6S2749* (*RING3CA*), *D6S2874* (*TAP1CA*), *D6S2876* (*G51152*), *D6S273*, *D6S265*, *D6S2972* (*MOGCA*), *D6S276*, *D6S105*, *D6S2222*, *D6S439*, *HLABC-2CA*, *TNFD* e *STR\_MICA* (Figura 1), dos quais sabe-se que três estão dentro de genes (*STR\_MICA* - éxon 5 do gene *MICA*, região que codifica o domínio transmembrana da proteína MIC-A - *D6S2874* - íntron 3 do gene *TAP1* - *D6S273* - região do gene *G6D*). Estes microssatélites são, na sua maioria, dinucleotídeos, mas o tamanho da unidade de repetição varia (Tabela 3). Para alguns deles, há vários trabalhos, com diversos objetivos, enquanto para outros os estudos anteriores são raros. A maioria desses trabalhos refere-se a estudos de doenças complexas, sendo que destes apenas alguns trazem dados de frequência alélica (Tabelas 4 e 5). Mesmo quando esses dados existem para mais de uma população, nem sempre uma comparação é possível, pois às vezes não se pode estabelecer relação entre os alelos encontrados nos diferentes estudos. Este problema decorre da falta de padronização para estudos de microssatélites, tanto no que se refere aos oligonucleotídeos utilizados na amplificação quanto à nomenclatura dos marcadores e dos alelos. Está sendo adotada neste trabalho a nomenclatura proposta por GOURRAUD *et al.* (2004).

Até o momento, estudos de genética de populações com estes microssatélites (Tabela 4) existem apenas para: *D6S291*, *D6S2876* (*G51152*), *D6S273*, *D6S265*, *D6S2972* (*MOGCA*) e *D6S276* em finlandeses; *D6S2876* (*G51152*) no Japão, Noruega e Nova Guiné; *TNFD* em coreanos; *STR\_MICA* no Japão, Indonésia, Coréia, China, Cazaquistão, Irã, Arábia Saudita, Grécia e Itália; *D6S105* e *D6S265* em Bascos da Espanha (KARELL *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2000; NISHIYAMA *et al.*, 2004; PYO *et al.*, 2003; OTA *et al.*, 1997; PENA *et al.*, 2002).



**FIGURA 1.** Posição dos microssatélites no MHC.



NOTA: Em azul estão os 14 microssatélites que foram analisados neste trabalho.

**TABELA 3.** Unidade de repetição, número de alelos e heterozigidade dos microssatélites investigados neste trabalho.

Loco	UR	NA	H	Loco	UR	NA	H
<i>D6S265</i>	CA	8	0,7939	<i>D6S105</i>	CA	10-12	0,77-0,79
<i>D6S439</i>	CA	8	0,6001	<i>STR_MICA</i>	GCT	5	0,629-0,759
<i>D6S276</i>	CA	10	0,839	<i>D6S2222</i>	di	5	0,6004
<i>D6S291</i>	CA	7	0,7245	<i>TNFd*</i>	TC	6	
<i>D6S2874</i> ( <i>TAPICA</i> )	CA	7	0,62	<i>D6S2876*</i> ( <i>G51152</i> )	CA	9	
<i>D6S2972</i> ( <i>MOGCA</i> )	CA	11	0,81	<i>D6S2749*</i> ( <i>RING3CA</i> )	CA		
<i>D6S273</i>	CA	6	0,7664	<i>HLABC-2CA*</i>	CA		

UR: unidade de repetição; NA: número de alelos de acordo com FOISSAC *et al.* (2000); H: heterozigidade de acordo com FOISSAC *et al.* (2000); di: dinucleotídeo; \*para estes marcadores, as informações não colocadas na tabela não estão disponíveis.

**TABELA 4.** Estudos populacionais já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho.

Loco	Estudos	Loco	Estudos
<i>D6S276</i>	Finlandeses (1).	<i>D6S291</i>	Finlandeses (1).
<i>D6S265</i>	Bascos (2); finlandeses (1).	<i>D6S105</i>	Bascos (2).
<i>D6S2972</i> ( <i>MOGCA</i> )	Finlandeses (1).	<i>D6S273</i>	Finlandeses (1).
<i>STR_MICA</i>	Toba, Wichi e Terena (3); chineses (4, 5); coreanos (6); japoneses e indonésios (7); italianos (8); croatas (9); nove populações: Japão, Indonésia, Coréia, China, Cazaquistão, Irã, Arábia Saudita, Grécia e Itália (10).	<i>TNFd</i>	Croatas (9); coreanos (11).
		<i>D6S2876</i> ( <i>G51152</i> )	Três grupos étnicos: Japão, Noruega e Nova Guiné (12); finlandeses (1).

Para os microssatélites não citados nesta tabela não foram encontrados estudos deste tipo. (1) KARELL *et al.*, 2000; (2) PENA *et al.*, 2002; (3) ZHANG *et al.*, 2002; (4) FENG *et al.*, 2004; (5) TIAN *et al.*, 2006; (6) PYO *et al.*, 2003; (7) NISHIYAMA *et al.*, 2004; (8) BOLOGNESI *et al.*, 2001; (9) GRUBIC *et al.*, 2006; (10) OTA *et al.*, 1997; (11) KIM *et al.*, 2000; (12) LIN *et al.*, 1997.

**TABELA 5.** Estudos não populacionais que trazem dados de frequência alélica já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho.

Loco	Estudos	Loco	Estudos
<i>STR_MICA</i>	Artrite (1, 2, 3); câncer cervical (4); carcinoma oral (5); colite ulcerativa (6); diabetes (7, 8, 9); doença de Addison (10, 11); doença de Behçet (12, 13, 14, 15, 16); doença celíaca (17); doença mista do tecido conjuntivo (18); espondilite anquilosante (19); fibrose oral submucosa (20); japoneses e indonésios (21); neoplasia cervical (22); método de tipagem (23); psoríasis (24); uveítis (25).	<i>D6S2874</i> ( <i>TAP1CA</i> )	Diabetes (26).
		<i>D6S273</i>	Diabetes (26).
		<i>D6S105</i>	Artrite juvenil (27); descrição (28); haplótipos (29); hemocromatose (30, 31).
		<i>D6S265</i>	Haplótipos (29); hemocromatose (31).
		<i>D6S276</i>	Haplótipos (29).
		<i>TNFd</i>	Artrite juvenil (27); doença de Crohn's (32); esclerose múltipla (33, 34); metodologia de tipagem (35); nefropatia de IgA (36); sensibilidade à UVB (37); transplante renal (38).

Para os microssatélites não citados nesta tabela não foram encontrados estudos deste tipo. (1) GONZALEZ *et al.*, 2001; (2) NIKITINA-ZAKE *et al.*, 2002; (3) MOK *et al.*, 2003; (4) GHADERI *et al.*, 2001; (5) CHUNG-JI *et al.*, 2002; (6) FDEZ-MORERA *et al.*, 2003; (7) GAMBELUNGHE *et al.*, 2000; (8) KAWABATA *et al.*, 2000; (9) PARK *et al.*, 2001; (10) PARK *et al.*, 2002b; (11) GAMBELUNGHE *et al.*, 1999; (12) MIZUKI *et al.*, 1997; (13) GONZALEZ-ESCRIBANO *et al.*, 1999; (14) WALLACE *et al.*, 1999; (15) YABUKI *et al.*, 1999a; (16) PARK *et al.*, 2002a; (17) FERNANDEZ *et al.*, 2002; (18) HASSAN *et al.*, 2003; (19) YABUKI *et al.*, 1999b; (20) LIU *et al.*, 2004; (21) NISHIYAMA *et al.*, 2004; (22) GHADERI *et al.*, 1999; (23) NOVOTA *et al.*, 2004; (24) CHOI *et al.*, 2000; (25) GOTO *et al.*, 1998; (26) YU *et al.*, 1999; (27) FEICHTBAUER *et al.*, 1998; (28) WEBER *et al.*, 1991; (29) WORWOOD *et al.*, 1997; (30) JAZWINSKA *et al.*, 1993; (31) RAHA-CHOWDHURY *et al.*, 1995; (32) PLEVY *et al.*, 1996; (33) KIRK *et al.*, 1997; (34) McDONNELL *et al.*, 1999; (35) SPINK *et al.*, 2004; (36) TUGLULAR *et al.*, 2003; (37) NIIZEKI *et al.*, 2001; (38) ASANO *et al.*, 1997.

**TABELA 6.** Estudos não populacionais que não trazem dados de frequência alélica já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho.

Loco	Estudos
<i>D6S265</i>	Artrite juvenil (1); caracterização em linhagens celulares de referência (2); diabetes (3); esclerose múltipla (4); evolução de <i>HLA-G</i> (5); hemocromatose (6-8); mapa meiótico (9); padronização de dados (10); pênfigo vulgar (11); psoríasis (12); recombinação (13); revisão (14, 15); transplante (16, 17).
<i>D6S2876</i> ( <i>G51152</i> )	Caracterização em linhagens celulares de referência (2); evolução de microssatélites (18); esclerose múltipla (4); haplótipos (19); narcolepsia (20); padronização de dados (10); pênfigo vulgar (11); recombinação (21); revisão (14, 15).
<i>D6S276</i>	Azoospermia (22); caracterização em linhagens celulares de referência (2); esclerose múltipla (4, 23, 24); hemocromatose (8); mapa meiótico (9); mapeamento por desequilíbrio de ligação (25); pênfigo vulgar (11); recombinação (13); revisão (14).
<i>D6S291</i>	Caracterização em linhagens celulares de referência (2); diabetes (3); esclerose múltipla (24); mapa (26); mapeamento por desequilíbrio de ligação (25); padronização de dados (10); pênfigo vulgar (11); revisão (14).
<i>D6S2749</i> ( <i>RING3CA</i> )	Caracterização em linhagens celulares de referência (2); esclerose múltipla (4); haplótipos (19); padronização de dados (10); pênfigo vulgar (11); recombinação (21); revisão (15); transplante (16).
<i>D6S2874</i> ( <i>TAPICA</i> )	Artrite reumatóide (27); azoospermia (22); caracterização em linhagens celulares de referência (2); haplótipos (19); padronização de dados (10); pênfigo vulgar (11); recombinação (21); revisão (14, 15); transplante (16).
<i>D6S2972</i> ( <i>MOGCA</i> )	Caracterização em linhagens celulares de referência (2); descrição (28); esclerose múltipla (4, 29); evolução de <i>HLA-G</i> (5); hemocromatose (6, 8); padronização de dados (10); pênfigo vulgar (11); revisão (14, 15); recombinação (13); transplante (16).
<i>D6S273</i>	Artrite reumatóide (27); azoospermia (22); caracterização em linhagens celulares de referência (2); diabetes (3, 30); doença de Addison (31); esclerose múltipla (4, 23, 24, 32); haplótipos (19); mapa (26); mapeamento por desequilíbrio de ligação (25); padronização de dados (10); pênfigo vulgar (11); psoríasis (12); revisão (14, 15); transplante (16, 17).
<i>D6S105</i>	Caracterização em linhagens celulares de referência (2); esclerose múltipla (4); hemocromatose (6-8); psoríasis (12); recombinação (13); revisão (14).
<i>TNFd</i>	Artrite reumatóide (27); azoospermia (22); esclerose múltipla (4); padronização de dados (10); padronização de tipagem (33); revisão (14); transplante (17, 34, 35).

Continua

**TABELA 6.** Estudos não populacionais que não trazem dados de frequência alélica já realizados com os microssatélites investigados neste trabalho.

Loco	Estudos	Conclusão
<i>STR_MICA</i>	Artrite (36); azoospermia (22); haplótipos (19); novo alelo (37); doença de Behçet (38); padronização de dados (10); psoríasis (12); revisão (14); transplante (17).	
<i>D6S439</i>	Azoospermia (22); esclerose múltipla (4); mapa (26); padronização de dados (10); revisão (14).	
<i>D6S2222</i>	Artrite reumatóide (27); diabetes (3); hemocromatose (8); revisão (14).	
<i>HLABC-2CA</i>	Pênfigo vulgar (11); revisão (15).	

(1) SMERDEL *et al.*, 2003; (2) MARTIN *et al.*, 1998; (3) LIE *et al.*, 1999; (4) RUBIO *et al.*, 2002; (5) ALDRICH *et al.*, 2002; (6) BURT *et al.*, 1996; (7) CAMASCHELLA *et al.*, 1996; (8) THOMAS *et al.*, 1998; (9) BOUISSOU *et al.*, 1995; (10) GOURRAUD *et al.*, 2004; (11) SLOMOV *et al.*, 2003; (12) NAIR *et al.*, 2000; (13) MALFROY *et al.*, 1997; (14) FOISSAC *et al.*, 2000; (15) CULLEN *et al.*, 2003; (16) CARRINGTON *et al.*, 1996; (17) LI *et al.*, 2004; (18) LIN *et al.*, 1998; (19) VORECHOVSKY *et al.*, 2001; (20) MIGNOT *et al.*, 1997; (21) CULLEN *et al.*, 1997; (22) TSUJIMURA *et al.*, 2002; (23) EBERS *et al.*, 1996; (24) SAWCER *et al.*, 1996; (25) COLLINS-SCHRAMM *et al.*, 2002; (26) TRIPODIS *et al.*, 1998; (27) YU *et al.*, 2003; (28) ROTH *et al.*, 1995a; (29) ROTH *et al.*, 1995b; (30) CHEONG *et al.*, 2001; (31) PARK *et al.*, 2002b; (32) HAINES *et al.*, 1996; (33) UDALOVA *et al.*, 1993; (34) MIDDLETON *et al.*, 1998; (35) CAVET *et al.*, 1999; (36) GRUBIC *et al.*, 2004; (37) PÉREZ-RODRIGUÉZ *et al.*, 2000; (38) MIZUKI *et al.*, 2000.

### 3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Estudos de microssatélites em Ameríndios são raros, apesar de serem de grande importância para melhor compreensão da história demográfica e evolutiva destas populações. Temos conhecimento de apenas um trabalho com microssatélites do MHC em Ameríndios (ZHANG *et al.*, 2002). Mais estudos como esse podem ajudar também na compreensão da evolução haplotípica desta região.

O objetivo geral deste trabalho é o de caracterizar as populações Ameríndias de Guarani e Kaingang quanto aos seguintes microssatélites: *D6S291*, *D6S2749*, *D6S2874*, *D6S2876*, *D6S273*, *D6S265*, *D6S2972*, *D6S276*, *D6S105*, *D6S2222*, *D6S439*, *HLABC-2CA*, *TNFD* e *STR\_MICA*. Os objetivos específicos são:

- Estimar as frequências alélicas e genotípicas e medidas de diversidade genética para os microssatélites nestas populações;
- Verificar se as frequências genotípicas dos locos estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Comparar as frequências encontradas entre as populações analisadas e destas com outras populações quando possível;
- Estimar frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre os microssatélites e também com genes do MHC já analisados para estas populações.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA POPULACIONAL

Os Guarani Kaiowá (n=168) são das aldeias Amambai (23°06'S; 55°12'W) e Limão Verde (23°12'S; 55°06'W), no município de Amambai, no Mato Grosso do Sul, nas quais habitam, respectivamente, 4.500 e 460 indivíduos, sendo que Guarani Ñandeva também estão em Amambai. Os Guarani Ñandeva (n=87) são de Amambai e também Porto Lindo (23°48'S; 54°30'W) que tem 1.600 indivíduos e fica também no Mato Grosso do Sul. Os Guarani M'byá (n=93) são da reserva de Rio das Cobras (25°18'S, 52°32'W), no município de Nova Laranjeiras, no estado do Paraná. Nesta reserva encontram-se cerca de 1.600 indivíduos, sendo que aproximadamente dois terços são Kaingang. Os Kaingang (n=235) são da reserva de Rio das Cobras e também da reserva de Ivaí (24°30'S, 51°40'W), município de Manoel Ribas, também no estado do Paraná, na qual vivem 700 pessoas.

Este trabalho é parte do projeto de pesquisa “Análise de Genes do MHC e de Outros Genes Relacionados à Resposta Imune em Populações”, que atende aos requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 e 304/00 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, tendo sido aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa – MS, registro CONEP 2046, parecer 332/2001.

A coleta de sangue e a extração de DNA foram realizadas para projetos anteriores do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR (PETZL-ERLER *et al.*, 1993; PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; TSUNETO *et al.*, 2003). Para as amostras de Guarani M'byá e Kaingang, a extração do DNA foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio (MANIATS *et al.*, 1982, com modificações). Para as amostras de Guarani Kaiowá e Ñandeva, a extração de DNA seguiu o método de *salting-out*, com modificações (LAHIRI e NURNBERG, 1991).

## 4.2 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES

A tipagem dos microsatélites foi feita com base em um método semi-automatizado, no qual foram amplificadas as regiões de microsatélites selecionadas por PCR com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) marcados com fluorescência. Os segmentos amplificados, depois de desnaturados, foram submetidos à corrida eletroforética, juntamente com um marcador de peso molecular, no aparelho seqüenciador MegaBACE 1000, no qual foram separados por tamanho. Os alelos foram designados com o uso do programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare).

A amplificação foi realizada através de reações *multiplex* para cada amostra. Neste tipo de PCR, várias regiões são amplificadas simultaneamente pela adição de diversos pares de oligonucleotídeos iniciadores (que deste ponto em diante serão designados oligos). Foram formados os seguintes grupos de microsatélites para amplificação simultânea:

GRUPO I: *D6S273*, *D6S291*, *D6S276* e *D6S2874*;

GRUPO II a: *D6S265*, *D6S2876* e *D6S2749*;

GRUPO II b: *D6S2972*;

GRUPO III: *TNFd*, *STR\_MICA* e *D6S2222*;

GRUPO IVa: *HLABC-CA2*;

GRUPO IVb: *D6S439*;

GRUPO IVc: *D6S105*.

Os grupos IIa e IIb; IVa, IVb e IVc foram aplicados juntos na corrida eletroforética.

A marcação fluorescente dos oligos foi escolhida de maneira que permitisse que produtos amplificados de diferentes *loci*, com sobreposição de tamanho, fossem aplicados juntos para corrida eletroforética. A seqüência e cor de marcação dos *primers* e os tamanhos de fragmentos gerados na PCR estão descritos na Tabela 7.

As condições de PCR variaram para cada reação (Tabelas 8 e 9). A ciclagem foi de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54,5-64°C (Tabela 8) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com 72°C por 10 (grupo IV) ou 40 minutos (grupos I, II e III).



**TABELA 7.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos resultantes da PCR e marcação fluorescente para cada microsatélite.

Continua			
<b>Grupo I</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i> 5'- 3' (marcação)</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i> 3'- 5'</b>	<b>Tamanho dos fragmentos (pb)</b>
<i>D6S276</i>	5'tcaatcaaatcatccccagaag (NED – amarelo ou FAM - azul)	5'ccttctttgcagactgtcacc	63-151
<i>D6S273</i>	5'ggagaagttgagtattctgc (VIC - verde)	5'accaaacttcaaatttcgg	139-163
<i>D6S2874</i>	5'gctttgatctccccctc (FAM - azul)	5'ggacaatatttgctcctgagg	185-215
<i>D6S291</i>	5'ggcattcaggcatgcctggc (NED - amarelo)	5'gggatgacgaattattcactaact	166-186
<b>Grupo II</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i> 5'- 3' (marcação)</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i> 3'- 5'</b>	<b>Tamanho dos fragmentos (pb)</b>
<i>D6S2972</i>	5'gaaatgtgagaataaaggaga (NED – amarelo ou FAM - azul)	5'gataaaggggaactactaca	122-160
<i>D6S265</i>	5'agtcaccctactgtgctatc (VIC - verde)	5'atcgaggtaaacagcagaaag	176-218
<i>D6S2749</i>	5'tgcttatagggagactaccg (FAM - azul)	5'gaggtaatgtcacaggatggg	221-243
<i>D6S2876</i>	5'ggtaaaattcctgactggcc (NED - amarelo)	5'gacagctcttcttaacctgc	193-251

**TABELA 7.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos resultantes da PCR e marcação fluorescente para cada microssatélite.

			Conclusão
<b>Grupo III</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i> 5'- 3'</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i></b>	<b>Tamanho dos</b>
<b>Loco</b>	<b>(marcação)</b>	<b>3'- 5'</b>	<b>fragmentos (pb)</b>
<i>TNFd</i>	5' catagtgggactctgtctccaaag (NED - amarelo)	5' agatccttcctgtgagttctgct	124 - 134
<i>D6S2222</i>	5' agtcatctgaagagttgg (FAM - azul)	5' gcatgtcttctttgtaagg	230 - 250
<i>STR_MICA</i>	5' ccttttttcagggaaagtgc (VIC - verde)	5' ccttaccatctccagaaactgc	180 - 200
<b>Grupo IV</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i> 5'- 3'</b>	<b>Seqüência do <i>primer</i></b>	<b>Tamanho dos</b>
<b>Loco</b>	<b>(marcação)</b>	<b>3'- 5'</b>	<b>fragmentos (pb)</b>
<i>HLABC-2CA</i>	5' tgggcaatgagtcctatgac (VIC - verde)	5' tgccattggccctaaatgc	90 - 130
<i>D6S439</i>	5' ttcaaggacagcctcaggg (NED - amarelo ou FAM - azul)	5' gatgatttaagttcctgtggacc	270 - 300
<i>D6S105</i>	5' gggattacaggcaggagccac (FAM - azul)	5' gaaggagaattgtaattccg	144 - 164

**TABELA 8.** Concentrações dos reagentes e temperaturas de hibridação nas PCR.

Reagente (concentração inicial)	Concentração final / Quantidade				
	Grupos I, IIa e IIb	Grupo III	Grupo IVa	Grupo IVb	Grupo IVc*
dNTP (2 mM)	0,2 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
Taq Pol. (5 U/μl)	0,25 U	0,25 U	0,25 U	0,25 U	0,25 U
Tampão (10 X)**	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
DNA (20 μg/ml)	6 μg/ml	5 μg/ml	4 μg/ml	6 μg/ml	4 μg/ml
TA	55°C	54,5°C	60°C	60°C	60°C

O volume final para todas as reações é de 10 μl.

Taq Pol. – Taq DNA Polymerase *Platinum* (Invitrogen); TA – temperatura de anelamento.

\*Nesta reação é acrescentado Dimetil Sulfoxido (DMSO) 0,5%.

\*\*Na maior parte dos casos é utilizado o Tampão da Invitrogen (20 mM Tris HCl pH=8, 40 mM NaCl, 2 mM Sulfato de Sódio, 0,1 mM DTT, glicerol 50%), mas para o grupo IVb o tampão utilizado é feito no laboratório (600 mM Tris HCl pH=9, 150 mM Sulfato de Amônia, Tween 20 0,1%).

**TABELA 9.** Concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) nas PCR.

<i>Primer</i> do GRUPO I*	Concentração	<i>Primer</i> do GRUPO III*	Concentração
<i>D6S276</i>	0,56μM	<i>TNFd</i>	0,2μM
<i>D6S273</i>	0,68μM	<i>D6S2222</i>	0,2μM
<i>D6S2874</i>	0,22μM	<i>STR_MICA</i>	0,2μM
<i>D6S291</i>	0,26μM	<i>Primer</i> do GRUPO IV*	Concentração
<i>Primer</i> do GRUPO II*	Concentração	<i>HLABC-2CA</i>	2μM
<i>D6S2972</i>	0,3μM	<i>D6S439</i>	2μM
<i>D6S265</i>	0,4μM	<i>D6S105</i>	2μM
<i>D6S2749</i>	0,3μM		
<i>D6S2876</i>	0,3μM		

\*A concentração é sempre a mesma para os *primers* 5' e 3'.

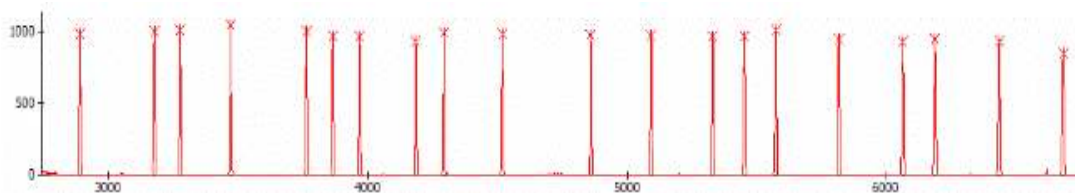
Após a amplificação, os produtos de PCR foram diluídos em água ultrapura. Nesta etapa, produtos de diferentes PCR foram unidos para corrida eletroforética. As condições de diluição foram as seguintes:

- GRUPO I: 2 µl de produto de PCR em 8 µl de água;
- GRUPO II: 2 µl de produto de PCR de IIa, 7 µl de produto de PCR de IIb, 15 µl de água;
- GRUPO III: 2 µl de produto de PCR em 8 µl de água;
- GRUPO IV: 4 µl de produto de PCR de IVa, 2 µl de produto de PCR de IVb e 4 µl de produto de PCR de IVc (neste grupo, como o volume final já somou 10 µl, não foi adicionado água).

Após a diluição, os produtos de PCR foram preparados para injeção no aparelho seqüenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Uma solução era preparada com tween e o marcador de peso molecular ET400-R (GE Healthcare). Para cada amostra eram colocados 0,3 µl do marcador, 6,7 µl de tween 0,02X e 2 µl do produto de PCR diluído. Os produtos eram então desnaturados por 3 minutos a 94°C e colocados diretamente no gelo para manter a desnaturação. A injeção no MegaBACE era feita a 3KV por 80 segundos e a corrida se dava a 8KV por 80 minutos.

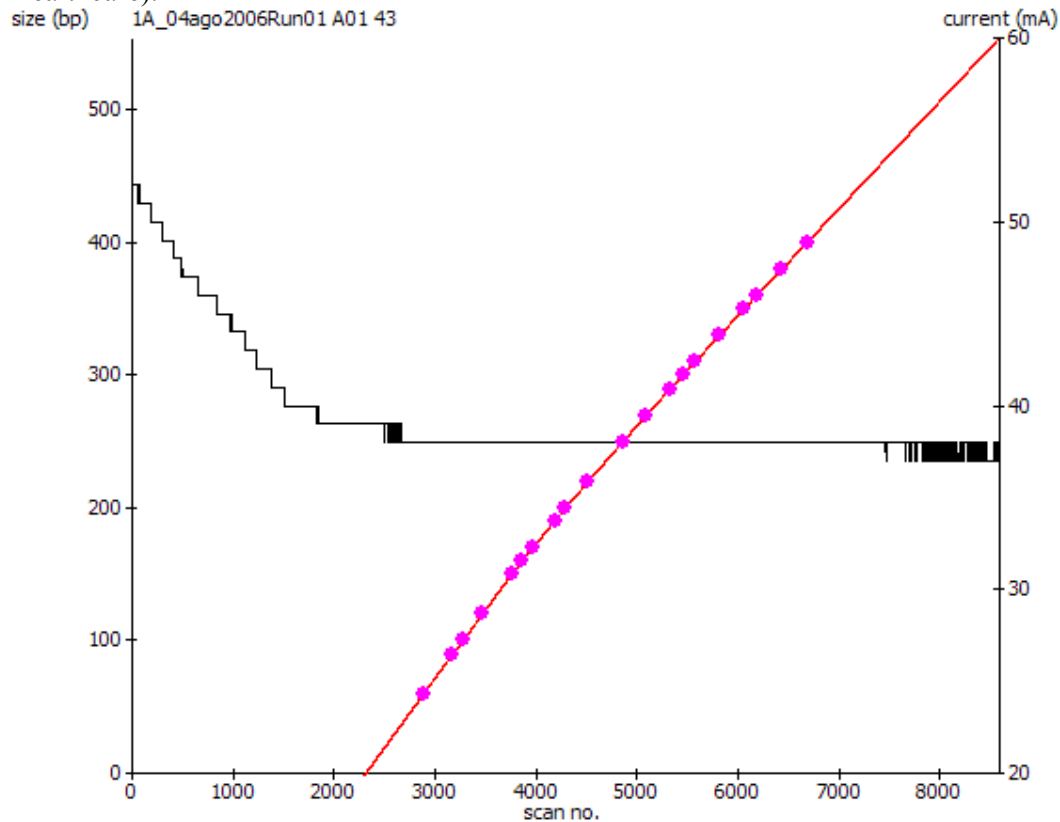
O programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare) utiliza os picos do marcador de peso molecular como referência para calcular o tamanho em pares de base (pb) dos produtos de PCR. O marcador contém fragmentos com tamanhos conhecidos: 60, 90, 100, 120, 150, 160, 170, 190, 200, 220, 250, 270, 290, 300, 310, 330, 350, 360, 380 e 400 bases (Figura 2). O programa constrói uma curva baseada nestes tamanhos e no tempo de corrida em que cada um desses fragmentos foi detectado (Figura 3). Para inferir o tamanho dos produtos de PCR, seu tempo decorrida é colocado na curva. A visualização do resultado está representada com um exemplo na figura 4.

**FIGURA 2.** Picos do marcador de peso molecular ET400-R (GE Healthcare).



NOTA: Os picos representam oligonucleotídeos de tamanho conhecido: 60, 90, 100, 120, 150, 160, 170, 190, 200, 220, 250, 270, 290, 300, 310, 330, 350, 360, 380 e 400 bases.

**FIGURA 3.** Gráfico gerado pelo programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare) com base nos picos do marcador de peso molecular ET400-R (GE Healthcare).



NOTA: No eixo x está o tempo de corrida, representado pelo número de vezes em que o laser, que faz a leitura da fluorescência no seqüenciador MegaBACE, leu os capilares. No eixo y à esquerda está o tamanho dos fragmentos em pares de base. Os pontos em cor de rosa representam a posição dos picos do marcador de peso molecular ET400-R (GE Healthcare). A curva em vermelho é construída para plotagem dos dados dos produtos de PCR e inferência de seus tamanhos. A linha em preto representa a variação da corrente durante a corrida eletroforética (os valores de corrente estão no eixo y à direita).

**FIGURA 4.** Exemplo da visualização dos resultados no programa *Fragment Profiler version 1.2* (GE Healthcare).



NOTA: No eixo x está o tamanho em pares de base. No eixo y está a intensidade de fluorescência. Estão representados indivíduos com os seguintes genótipos: *D6S273\*153/155*, *D6S273\*147/147* e *D6S273\*151/153*.

### 4.3 ANÁLISE DOS GENES DO MHC

Para análise de haplótipos e de desequilíbrio de ligação com genes do MHC foram utilizados resultados de tipagens anteriores. Na região de classe II, foram utilizados os genes *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DMA*, *HLA-DMB* (dados não publicados); *LMP2*, *TAP1*, *LMP7*, *TAP2* (FAUCZ *et al.*, 2000); *HLA-DQB1* e *HLA-DQA1* (SOTOMAIOR *et al.*, 1998; TSUNETO *et al.*, 2003); *HLA-DRB1*, *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* e *HLA-DRB5* (PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; TSUNETO *et al.*, 2003); *HLA-DRA* (dados não publicados). Na região de classe III, foram utilizados os genes *C4B*, *C4A* e *BF* (GUERRA *et al.*, 1992; WEG-REMERS *et al.*, 1997). Na região de classe I, foram utilizados os genes *HLA-B*, *HLA-C* e *HLA-A* (BELICH *et al.*, 1992; PETZL-ERLER *et al.*, 1993; dados não publicados).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genóticas foram obtidas por contagem utilizando o programa Convert (PROBST, 1998). As frequências alélicas também foram obtidas por contagem a partir das frequências genóticas, utilizando o pacote de programas Arlequin v. 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A frequência de um alelo (FA) é obtida somando-se o número de indivíduos heterozigotos para aquele alelo (het) mais duas vezes o número de indivíduos homozigotos (hom) e dividindo-se o resultado pelo dobro do número total de indivíduos (n):  $FA = (het + 2 \text{ hom})/2n$ .

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feita pela comparação da frequência observada dos genótipos com aquela esperada em equilíbrio com o teste de GUO e THOMPSON (1992), utilizando-se também o pacote de programas Arlequin v. 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) e adotando-se como limite de significância  $p=0,05$ . Foram utilizados 100.000 passos na cadeia de Markov e 1.000 passos de desmemorização.

A diversidade do loco em cada população foi quantificada pelo número de alelos observado, pela heterozigosidade observada (porcentagem de indivíduos heterozigotos) e pela diversidade gênica (heterozigosidade esperada), que consiste na proporção esperada de indivíduos heterozigotos para as frequências alélicas observadas. Foram considerados mais diversos os locos e as populações com valores altos para todos estes parâmetros, principalmente a diversidade gênica, que indica o grau de polimorfismo. Estes parâmetros também foram calculados utilizando-se o pacote de programas Arlequin v. 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

Comparações entre frequências alélicas absolutas das diferentes populações foram feitas pelo teste exato de Fisher, que é baseado em tabelas de contingência. Estes testes foram feitos com auxílio do programa RXC (MILLER, 1997) e foi adotado como limite de significância  $p=0,05$ . As frequências utilizadas nas comparações podem apresentar desvios com relação à frequência real do alelo na população, especialmente no caso de alelos com frequências baixas. Por isso, alelos com frequência absoluta menor ou igual a 5 (no total dos cromossomos) foram excluídos nas comparações. Porém, isso só ocorreu se o alelo apresentasse frequência baixa ou nula nas duas populações que estavam sendo comparadas; em uma comparação com uma população que possui uma frequência alta daquele mesmo alelo, ele era mantido. Por exemplo, o alelo *STR\_MICA\*A10* foi incluído nas comparações dos Kaingang com as demais

populações, mas não foi incluído nas comparações dos Guarani M'byá (GRC) com as demais populações (ver Tabela 24).

As distâncias genéticas entre as populações foram calculadas com o método de Cavalli-Sforza e Edwards (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1967), com o pacote de programas PHYLIP (FELSENSTEIN, 2004). As distâncias genéticas foram utilizadas para a construção de um dendrograma utilizando o método Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), também com o pacote de programas PHYLIP (FELSENSTEIN, 2004). O dendrograma foi visualizado com o programa TreeView 1.6.6 (PAGE, 1996). Para estas análises foi utilizada uma amostra populacional de Curitiba, analisada anteriormente para os microssatélites, para servir de grupo de fora. Para esta amostra, não foi analisado o marcador *D6S2876(G51152)*, que portanto foi excluído dessas análises.

As frequências haplotípicas foram obtidas por máxima verossimilhança, com o algoritmo EM, incluído no pacote de programas Arlequin v. 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Este método foi adotado por não conhecermos a fase dos alelos em cada genótipo. Consiste em estimar frequências haplotípicas aleatórias e a partir delas computar a verossimilhança de obter as frequências genotípicas esperadas assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir das frequências haplotípicas geradas. Posteriormente, as frequências genotípicas são utilizadas para estimar novas frequências haplotípicas. A cada passo do procedimento a verossimilhança aumenta. Este procedimento é repetido até se alcançar uma estabilidade, ou seja, não haver mais aumento da verossimilhança. O desvio padrão das frequências é obtido pelo método de *bootstrap*, no qual várias amostras aleatórias são retiradas, e depois repostas, da amostra total e testadas pelo mesmo algoritmo. O número de réplicas utilizadas para o *bootstrap* foi 1.000.

Quando a frequência haplotípica observada difere da esperada, ou seja, do produto das frequências alélicas individuais, diz-se que os locos estão em desequilíbrio de ligação. O cálculo de desequilíbrio de ligação (valores de  $D'$  e  $p$ ) foi feito com o pacote de programas PyPop (LANCASTER *et al.*, 2003), adotando como limite de significância  $p=0,05$ . Para melhor visualização dos resultados foram confeccionados gráficos atribuindo-se cores aos diferentes valores de  $p$  e de  $D'$  para cada par de locos, utilizando o programa MATLAB (The MathWorks). O cálculo de  $D'$  usou a seguinte fórmula (HEDRICK, 2005):

$$D' = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k-1} p_i q_j |D'_{ij}|}{\sum_{i=1}^k p_i \sum_{j=1}^{k-1} q_j}$$



## 5 RESULTADOS

### 5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Os resultados de frequências alélicas e genotípicas, as heterozigosidades e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg são mostrados para cada microssatélite. Os microssatélites são comentados na ordem em que se encontram no cromossomo.

Foram feitas comparações entre as frequências alélicas das populações deste estudo e destas com uma população de Curitiba (BRA). Esta população de Curitiba é de origem predominantemente européia. Além disso, os dados foram comparados com dados de populações disponíveis na literatura sempre que possível.

#### 5.1.1 Microssatélites da Região de Classe II

Para o microssatélite *D6S439*, que é centromérico à região de classe II, o alelo *D6S439\*280* foi o mais comum nas 5 populações Ameríndias estudadas, atingindo uma frequência de até 83% nos Guarani Kaiowá (GKW), seguido pelo alelo *D6S439\*274*, que teve frequência muito próxima ao *D6S439\*282* em Guarani Kaiowá (Tabela 10). O alelo *D6S439\*270* só foi observado nos Guarani, com uma frequência relativamente alta nos Guarani Ñandeva (GND). O alelo *D6S439\*268* só foi encontrado nos Kaingang de Ivaí (KIV). Na comparação das frequências alélicas entre populações a diferença foi significativa em todos os casos. O único valor de  $p$  que foi maior que  $10^{-6}$  foi na comparação entre as populações de Kaingang (Tabela 11).

As frequências genotípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações, exceto Guarani M'byá (GRC), para a qual o valor de  $p$  ( $p=0,04056$ ) foi muito próximo ao limiar de 5% (Tabela 12). Os genótipos mais frequentes foram *D6S439\*280/280* e *D6S439\*274/280* (Figura 5). A heterozigosidade observada e a diversidade gênica tiveram uma grande variação entre populações, com valores mínimos de 25,8% e 30% nos Guarani Kaiowá e máximos de 71,7% e 66% nos Guarani M'byá, respectivamente (Tabela 12).

**TABELA 10.** Frequências alélicas (%) de *D6S439*.

<i>D6S439</i>	População					
	GND (n=83)	GKW (n=155)	GRC (n=92)	KRC (n=109)	KIV (n=126)	BRA (n=144)
266						<b>0,3</b>
268					<b>0,4</b>	
270	10,2	0,3	1,6			0,7
272	0,6	0,3	1,1	0,5	0,4	3,1
274	12,7	6,8	21,2	33,9	37,3	2,4
276						<b>2,8</b>
278	1,2		17,9	1,4		10,8
280	<b>68,1</b>	<b>82,9</b>	<b>51,1</b>	<b>47,7</b>	<b>51,2</b>	<b>51,4</b>
282	4,2	6,1	6,5	12,4	10,7	10,4
284		0,6	0,5			11,8
286	3,0	2,9				1,7
288				4,1		2,8
294						<b>0,3</b>
296						<b>1,0</b>
298						<b>0,3</b>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 11.** Valores de *p* nas comparações das frequências alélicas de *D6S439* entre populações.

<i>D6S439</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<10 <sup>-6</sup>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	0,004440	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; BRA: população euro-brasileira.

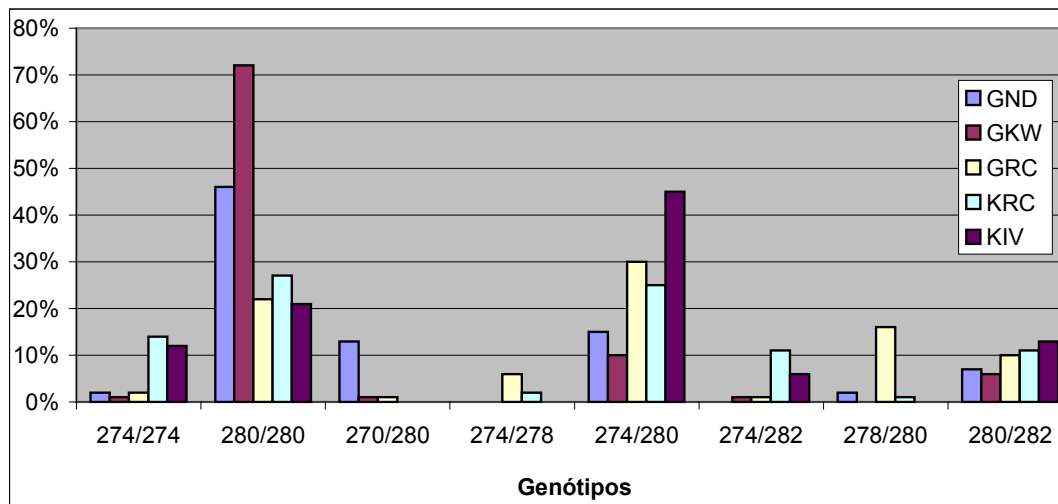
**TABELA 12.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S439*.

<i>D6S439</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,93002	<b>0,04056</b>	0,48397	0,25225	0,29157
Heterozigosidade*	49,4%	25,8%	71,7%	58,7%	67,5%
Diversidade**	51%	30%	66%	64%	59%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

■ Desvio significativo.

**FIGURA 5.** Frequências genótípicas de *D6S439*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

O microssatélite *D6S291* também se localiza centromérico à região de classe II. O alelo *D6S291\*170* foi o mais comum, seguido por *D6S291\*176* nos Ameríndios (Tabela 13). O alelo *D6S291\*172* só foi observado nos Guarani do Mato Grosso do Sul (GKW e GND) e na população de Curitiba e o alelo *D6S291\*186* só foi observado nos Guarani M'byá (GRC). Na comparação das frequências alélicas entre populações só não foi observada diferença significativa entre os Guarani do Mato Grosso do Sul (GKW e GND) e entre os Kaingang de Ivaí e os Guarani M'byá (Tabela 14). O valor de *p* da comparação entre Kaingang de Rio das Cobras e Guarani Kaiowá foi próximo ao limiar de 5% e não é significativo no nível de 1%.

As frequências genotípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 15). Os genótipos mais frequentes foram *D6S291\*170/170* e *D6S291\*170/176* (Figura 6). A heterozigosidade variou de 34,8% nos Guarani M'byá, a 44% nos Guarani Ñandeva (Tabela 15).

Para o microssatélite *D6S2749* (*RING3CA*) os alelos mais frequentes foram *D6S2749\*233* e *D6S2749\*235*, respectivamente, em todas as populações (Tabela 16). Nos Kaingang de Rio das Cobras (KRC) as frequências destes alelos são praticamente idênticas. O alelo *D6S2749\*227* só foi encontrado nos Kaingang de Ivaí (KIV) com uma frequência muito baixa. Houve diferença significativa em todas as comparações entre populações (Tabela 17). O maior valor de *p* observado foi de 1% entre os Guarani do Mato Grosso do Sul (GKW e GND).

As frequências genotípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 18). O genótipo mais frequente foi *D6S2749\*233/235* nas 5 amostras (Figura 7). A heterozigosidade observada variou de 50%, em Guarani Ñandeva, a 67,4%, em Guarani M'byá. Já a diversidade gênica foi de 59% em Guarani Ñandeva a 65% em Kaingang de Ivaí (Tabela 18).

**TABELA 13.** Frequências alélicas (%) de *D6S291*.

<i>D6S291</i>	População					
	GND (n=84)	GKW (n=156)	GRC (n=92)	KRC (n=109)	KIV (n=129)	BRA (n=118)
168	11,3	7,1		5,5	0,4	23,3
170	<b>70,2</b>	<b>73,1</b>	<b>80,4</b>	<b>65,1</b>	<b>78,3</b>	<b>45,3</b>
172	1,8	4,2				5,5
174	1,2			3,2		7,6
176	13,1	15,1	18,5	24,8	20,9	5,9
178	1,2	0,3		1,4		11,9
180	1,2					0,4
182		0,3			0,4	
186			<b>1,1</b>			

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 14.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S291*.

<i>D6S291</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<b>0,244860</b>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	0,003220	<b>0,025620</b>	0,000020		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<b>0,548360</b>	0,000080	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

■ Diferença não significativa considerando limite  $p=0,05$ .

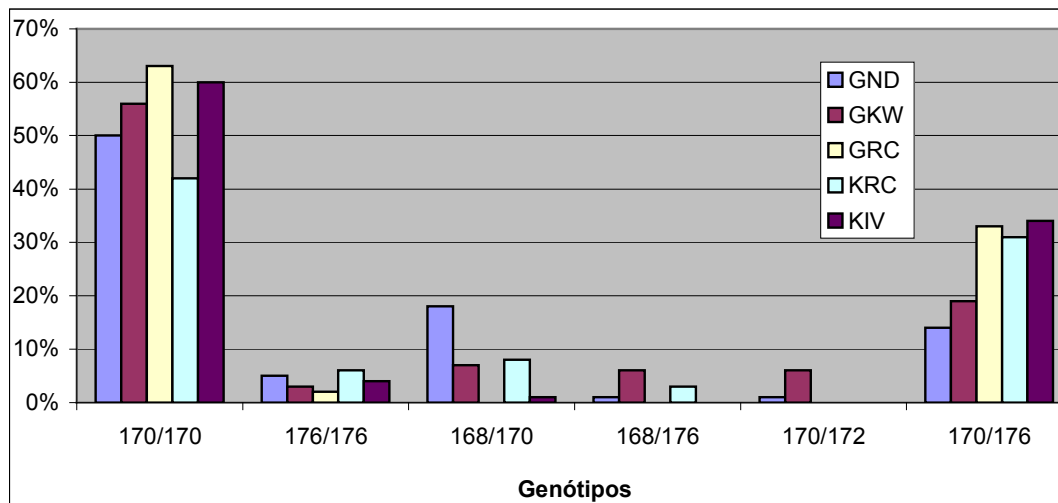
■ Diferença não significativa considerando limite  $p=0,01$ .

**TABELA 15.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S291*.

<i>D6S291</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,40657	0,09553	0,83068	0,92238	≅ 1
Heterozigosidade*	44,0%	39,8%	34,8%	51,4%	35,7%
Diversidade**	48%	44%	32%	51%	34%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 6.** Frequências genotípicas de *D6S291*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

**TABELA 16.** Frequências alélicas (%) de *D6S2749* (*RING3CA*).

<i>D6S2749</i>	População					
	GND (n=84)	GWK (n=156)	GRC (n=92)	KRC (n=110)	KIV (n=130)	BRA (n=117)
223						0,4
227					0,4	
229	3,0	2,6	11,4	4,5	2,7	41,0
231	1,8			6,8	14,2	11,5
233	49,4	48,4	47,3	44,1	50,4	19,7
235	40,5	34,9	40,2	43,6	28,1	20,9
237	5,4	14,1	1,2	0,9	4,2	6,0
239						0,4

GND: Guarani Nãndeva; GWK: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais frequente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 17.** Valores de  $p$  nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S2749* (*RING3CA*).

<i>D6S2749</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<b>0,010000</b>				
GRC	0,002700	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	0,004320	<10 <sup>-6</sup>	0,000020		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	0,000120	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

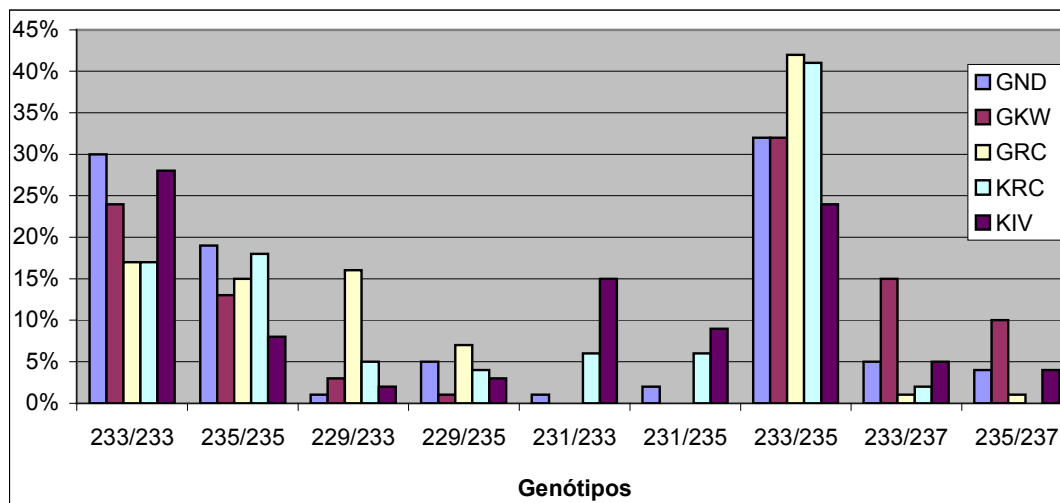
■ No limite de significância de 1%.

**TABELA 18.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S2749* (*RING3CA*).

<i>D6S2749</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
$p$ HW	0,27291	0,87905	0,30472	0,90633	0,58811
Heterozigosidade*	50,0%	61,5%	67,4%	64,5%	63,1%
Diversidade**	59%	63%	60%	61%	65%

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí;  $p$  HW: valor de  $p$  no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 7.** Frequências genotípicas de *D6S2749* (*RING3CA*).

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

Para o microssatélite *D6S2874 (TAPICA)*, o alelo mais freqüente foi o *D6S2874\*193* nos Kaingang (KIV e KRC), o *D6S2874\*201* nos Guarani (GKW, GND e GRC) e o *D6S2874\*201* na população de Curitiba. Entre os ameríndios, o alelo *D6S2874\*203* só foi observado nos Guarani Kaiowá (GKW) e os alelos *D6S2874\*205* e *D6S2874\*207* nos Kaingang de Ivaí (KIV), nos três casos com freqüências bem baixas (Tabela 19). Nas comparações das freqüências alélicas entre populações a diferença não foi significativa apenas entre os Kaingang (Tabela 20).

Para este microssatélite, as freqüências genotípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 21). O genótipo mais freqüente foi *D6S2874\*201/201* nas 3 populações de Guarani, *D6S2874\*193/201* nos Kaingang de Rio das Cobras e *D6S2874\*193/201* e *D6S2874\*193/193* nos Kaingang de Ivaí (Figura 8). A heterozigosidade observada variou de 50%, em Guarani Kaiowá, a 64,2%, em Kaingang de Rio das Cobras. A diversidade gênica variou de 54% em Guarani Kaiowá e M'byá a 64% em Kaingang de Ivaí (Tabela 21).

Para *D6S2876 (G51152)*, o alelo mais freqüente entre os Guarani foi o *D6S2876\*215* e entre os Kaingang foi o *D6S2876\*223* (Tabela 22). O alelo *D6S2876\*221* só foi observado nos Guarani M'byá e o alelo *D6S2876\*225* nos Guarani Ñandeva. Para este marcador não foi feita a comparação com a população de Curitiba, pois as tipagens para esta população apresentaram problemas. Nas comparações entre as populações indígenas (Tabela 23), os Kaingang diferiram significativamente entre si e dos Guarani. Não houve diferença significativa entre os Guarani.

As freqüências genotípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 24). O genótipo mais freqüente foi *D6S2876\*223/223* nos Kaingang, *D6S2876\*215/223* nos Guarani M'byá e *D6S2876\*215/223* e *D6S2876\*215/215* nos Guarani Kaiowá e Ñandeva (Figura 9). A heterozigosidade e a diversidade variaram de 27,7% e 27% em Kaingang de Rio das Cobras, a 59,8% e 52% em Guarani M'byá, respectivamente (Tabela 24).



**TABELA 19.** Frequências alélicas (%) de *D6S2874* (*TAPICA*).

<i>D6S2874</i>	População					
	GND (n=84)	GKW (n=156)	GRC (n=93)	KRC (n=109)	KIV (n=129)	BRA (n=117)
191	16,1	9,9	26,3	25,2	29,5	<b>44,4</b>
193	38,7	28,5	12,4	<b>51,8</b>	<b>47,7</b>	41
201	<b>45,2</b>	<b>60,9</b>	<b>61,3</b>	22,9	22,1	1,3
203		0,6				6,8
205					0,4	2,5
207					0,4	3,8

GND: Guarani Ñandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

**TABELA 20.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S2874* (*TAPICA*).

<i>D6S2874</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	0,004300				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<b>0,533660</b>	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Ñandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; BRA: população euro-brasileira.

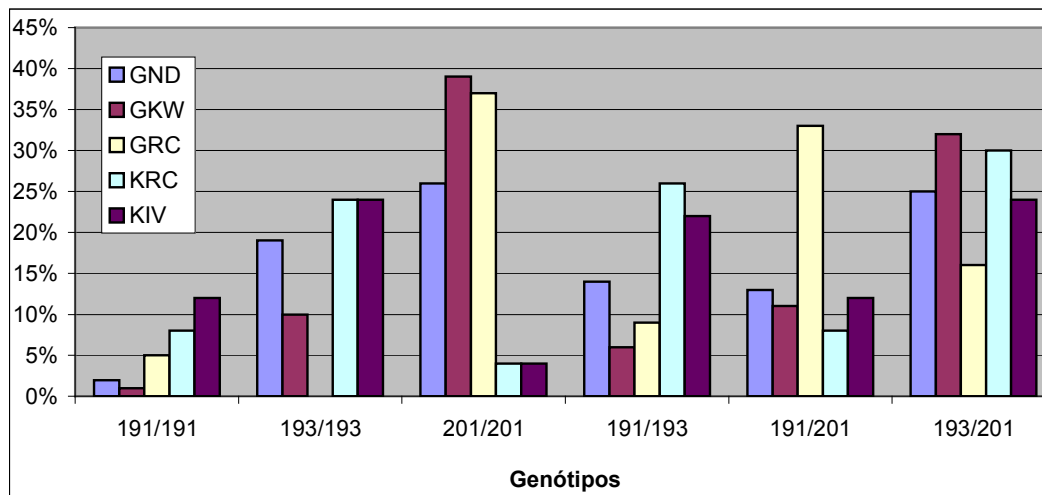
■ Diferença não significativa.

**TABELA 21.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S2874* (*TAPICA*).

<i>D6S2874</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,12533	0,43271	0,60324	0,23915	0,39223
Heterozigosidade*	52,4%	50,0%	58,1%	64,2%	60,5%
Diversidade**	62%	54%	54%	62%	64%

GND: Guarani Ñandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 8.** Frequências genotípicas de *D6S2874* (*TAPICA*).

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

**TABELA 22.** Frequências alélicas (%) de *D6S2876* (*G51152*).

<i>D6S2876</i>	População				
	GND (n=84)	GKW (n=156)	GRC (n=92)	KRC (n=110)	KIV (n=130)
215	65,5	65,7	57,1	27,3	16,2
217		0,3	1,6		
221			1,1		
223	30,9	33,3	40,2	70,9	83,8
225	1,2				
239	2,4	0,6		1,8	

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais frequente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 23.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S2876* (*G51152*).

<i>D6S2876</i>	GND	GKW	GRC	KRC
GKW	0,754620			
GRC	0,109840	0,108340		
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	0,001960

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí.

■ Diferença não significativa.

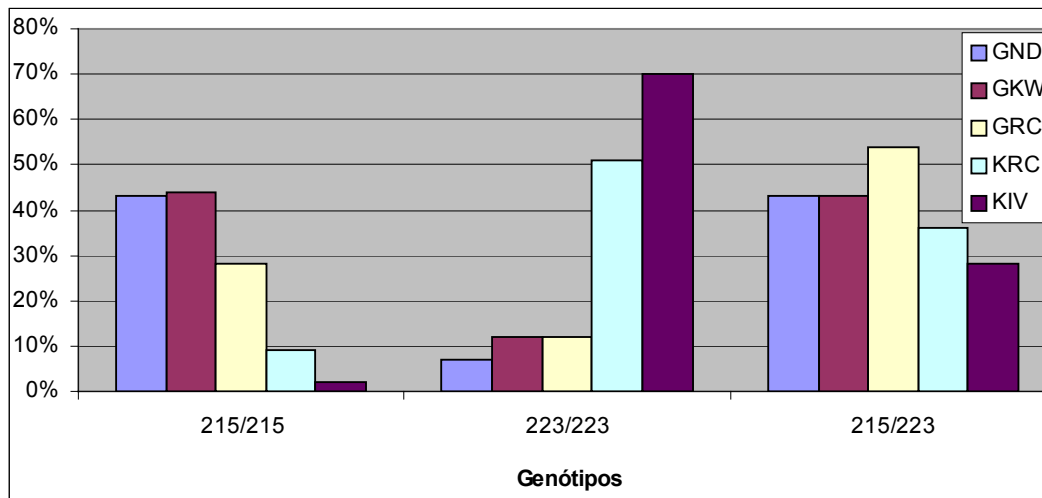
**TABELA 24.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S2876 (G51152)*.

<i>D6S2876</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,29497	0,95569	0,36731	0,40632	$\cong 1$
Heterozigosidade*	50,0%	44,9%	59,8%	40,0%	27,7%
Diversidade**	48%	46%	52%	42%	27%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 9.** Frequências genotípicas de *D6S2876 (G51152)*.



NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

### 5.1.2 Microssatélites da Região de Classe III

Para o microssatélite *D6S273* (Tabela 25), o alelo mais freqüente nos Kaingang e na população de Curitiba foi o *D6S273\*153*. Nos Guarani, o alelo *D6S273\*147* foi o mais comum, juntamente com *D6S273\*153* nos Guarani Ñandeva. Houve diferença significativa em todas as comparações. Entre os Guarani do Mato Grosso do Sul (GKW e GND) e entre os Kaingang (KIV e KRC) as diferenças não são significativas se considerarmos o limite de significância de 1% (Tabela 26).

As freqüências genótípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 27) em todas as populações, exceto Guarani Ñandeva ( $p=0,01195$ ). O genótipo mais freqüente foi *D6S273\*147/153* nos Guarani Kaiowá e M'byá, *D6S273\*151/153* nos Guarani Ñandeva e nos Kaingang de Ivaí e *D6S273\*153/153* e *D6S273\*151/153* nos Kaingang de Rio das Cobras (Figura 10). A heterozigosidade variou de 55%, em Kaingang de Rio das Cobras, a 74,4%, em Guarani Kaiowá e a diversidade gênica, de 54%, também em Kaingang de Rio das Cobras, a 72%, em Guarani Kaiowá e Ñandeva (Tabela 27).

Para o microssatélite *TNFD* (Tabela 28), nos Guarani do Mato Grosso do Sul (GKW e GND) e nos Kaingang (KIV e KRC), os alelos mais freqüentes foram *TNFD\*130* e *TNFD\*134*, respectivamente. Já nos Guarani M'byá, estes dois alelos também tiveram as maiores freqüências, porém na ordem inversa. Para este marcador foi possível a comparação com populações de origem européia e uma população coreana. Na literatura, os alelos são denominados d1 a d7 e foi possível estabelecer a equivalência desta nomenclatura com o tamanho dos alelos em pares de base encontrados neste trabalho (Tabela 28). As diferenças não foram significativas apenas nas comparações entre os Guarani do Mato Grosso do Sul (GND e GKW) e entre os Guarani Ñandeva e M'byá (Tabela 29).

As freqüências genótípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 30). Nos Kaingang, os genótipos mais freqüentes foram *TNFD\*130/130* e *TNFD\*130/134* (Figura 11). Nos Guarani do Mato Grosso do Sul (GKW e GND), *TNFD\*130/132* e *TNFD\*130/134*. Já nos Guarani M'byá, foram *TNFD\*130/134* e *TNFD\*132/134* (Figura 11). A heterozigosidade variou de aproximadamente 50% em Kaingang a 74% em Guarani M'byá, com valores próximos aos da diversidade gênica (Tabela 30).

**TABELA 25.** Frequências alélicas (%) de *D6S273*.

<i>D6S273</i>	População					
	GND (n=84)	GKW (n=156)	GRC (n=92)	KRC (n=109)	KIV (n=130)	BRA (n=118)
147	<b>33,3</b>	<b>38,1</b>	<b>57,1</b>	1,4	5,8	7,6
149	0,6					6,8
151	22,0	16,0	12,5	26,1	28,5	19,1
153	<b>33,3</b>	28,2	29,3	<b>61,9</b>	<b>51,9</b>	<b>32,6</b>
155	9,5	17,3	1,1	10,5	10,8	24,6
157		0,3			0,8	3,0
159	1,2				2,3	6,3

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

**TABELA 26.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S273*.

<i>D6S273</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<b>0,034400</b>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<b>0,047880</b>	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

■ Diferença não significativa considerando limite *p*=0,01.

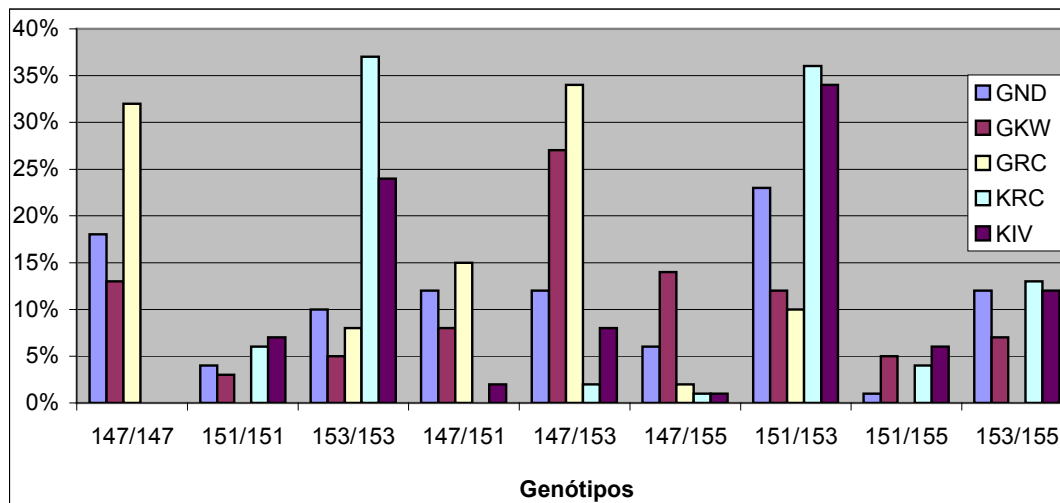
**TABELA 27.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigidades para *D6S273*.

<i>D6S273</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	<b>0,01195</b>	0,09496	0,75426	0,45303	0,18764
Heterozigidade*	69,0%	74,4%	60,9%	55,0%	66,9%
Diversidade**	72%	72%	58%	54%	64%

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigidade esperada.

■ Desvio significativo.

**FIGURA 10.** Frequências genotípicas de *D6S273*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

**TABELA 28.** Frequências alélicas (%) de *TNFd*.

<i>TNFd</i>		GND	GKW	GRC	KRC	KIV
126	d1		0,6			0,4
128	d2	0,6		1,6		
130	d3	<b>41,6</b>	<b>48,1</b>	32,6	<b>70,2</b>	<b>65,9</b>
132	d4	27,1	21,0	26,6	7,8	0,4
134	d5	30,7	30,3	<b>39,1</b>	22,0	33,3
<i>TNFd</i>	COR <sup>1</sup>	BRA	ING <sup>2</sup>	FRA <sup>3</sup>	IRL <sup>4</sup>	NAC <sup>5</sup>
d1	7,5	6,3	0,1	5,7	17,5	6,3
d2	1,5	2,4	1,5	0,5	3,4	7,3
d3	<b>34,6</b>	<b>52,4</b>	<b>54,5</b>	<b>57,4</b>	<b>48,5</b>	<b>41,7</b>
d4	19,9	25,9	29,5	26,9	25,2	28,1
d5	29,3	11,5	6,0	8,3	4,6	13,5
d7	6,4		0,5	1,2		1,0

Apenas alelos com frequência de no mínimo 5% em pelo menos uma população.

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; COR: Coreanos (<sup>1</sup>KIM *et al.*, 2000); BRA: população euro-brasileira; ING: ingleses (<sup>2</sup>SPINK *et al.*, 2004); FRA: franceses (<sup>3</sup>TUGLULAR *et al.*, 2003); IRL: irlandeses (<sup>4</sup>McDONNELL *et al.*, 1999 e KIRK *et al.*, 1997); NAC: estado-unidenses de origem predominantemente européia (<sup>5</sup>PLEVY *et al.*, 1996).

■ Alelo mais frequente em cada população.

**TABELA 29.** Valores de  $p$  nas comparações entre populações das frequências alélicas de *TNFD*.

<i>TNFD</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<b>0,228700</b>				
GRC	<b>0,145340</b>	0,004160			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	
COR <sup>1</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
ING <sup>2</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
FRA <sup>3</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
IRL <sup>4</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
NAC <sup>5</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Ñandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; COR: Coreanos (<sup>1</sup>KIM *et al.*, 2000); BRA: população euro-brasileira; ING: ingleses (<sup>2</sup>SPINK *et al.*, 2004); FRA: franceses (<sup>3</sup>TUGLULAR *et al.*, 2003); IRL: irlandeses (<sup>4</sup>McDONNELL *et al.*, 1999 e KIRK *et al.*, 1997); NAC: estado-unidenses de origem predominantemente européia (<sup>5</sup>PLEVY *et al.*, 1996).

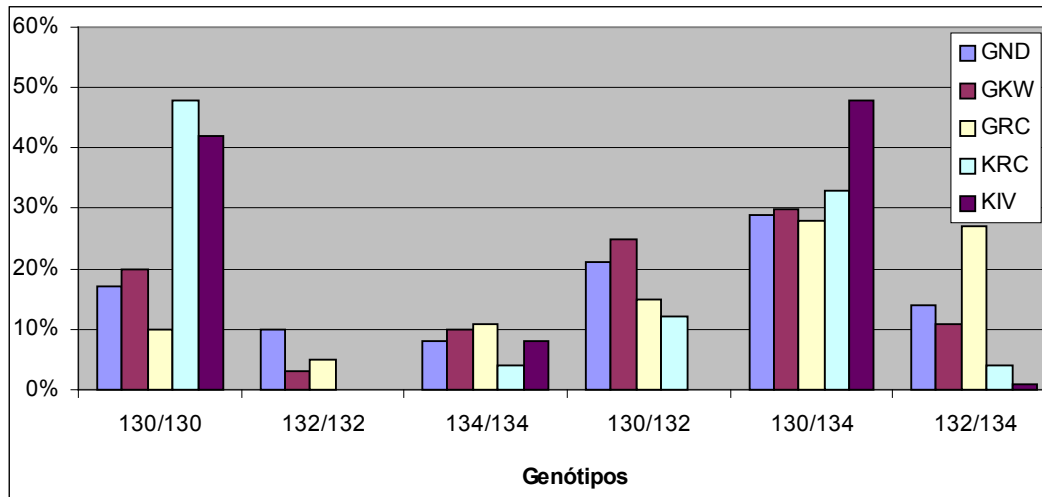
■ Diferença não significativa.

**TABELA 30.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *TNFD*.

<i>TNFD</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
$p$ HW	0,66040	0,45608	0,39511	0,92371	0,31118
Heterozigosidade*	65,1%	67,1%	73,9%	48,6%	50,0%
Diversidade**	66%	64%	67%	45%	45%

GND: Guarani Ñandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai;  $p$  HW: valor de  $p$  no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 11.** Frequências genotípicas de *TNFd*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

### 5.1.3 Microssatélites da Região de Classe I

O microssatélite *STR\_MICA* já foi estudado em diversas populações (Tabela 4), sendo que geralmente são encontrados 5 alelos: A4, A5, A5.1, A6 e A9. Este microssatélite está localizado em um éxon e as repetições codificam alaninas na proteína MICA. A nomenclatura dos alelos se refere ao número de repetições do microssatélite, que determina o número de alaninas codificadas (4, 5, 6 ou 9). No caso do alelo 5.1, há uma inserção, e uma das repetições GCT passa a ser GGCT (OTA *et al.*, 1997), causando uma alteração na matriz de leitura e gerando uma proteína solúvel. Os alelos A7 e A10 já foram descritos (RUEDA *et al.*, 2002; PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2000), mas são raros, sendo que o A10 havia sido observado apenas em chineses, em um único haplótipo com *HLA-B\*5801* (TIAN *et al.*, 2006).

No presente estudo, o alelo *STR\_MICA*\*A10 foi encontrado em Kaingang com uma frequência alta e nos Guarani M'byá (GRC) com frequência baixa (Tabela 31). O alelo mais comum foi o *STR\_MICA*\*A9 para os Kaingang (KIV e KRC) e para os Guarani Kaiowá (GKW) e o *STR\_MICA*\*A5 para os Guarani Ñandeva e M'byá. O alelo *STR\_MICA*\*A4 só foi observado nos Guarani Ñandeva (GND) e nos Kaingang de Ivaí, nestes últimos com uma frequência muito baixa.

Como já existem diversos trabalhos para este marcador, foram selecionadas algumas populações descritas na literatura para comparações estatísticas das frequências alélicas com as populações do presente estudo. Nas comparações, as diferenças foram



sempre significativas. Porém, o valor de  $p$  na comparação entre os Guarani Ñandeva e os Wichí, da Argentina (ZHANG *et al.*, 2002), foi muito próximo ao limiar (Tabela 32).

As frequências genotípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 33) em todas as populações. Os genótipos mais frequentes foram *STR\_MICA*\*A5/A5, *STR\_MICA*\*A9/A9 e *STR\_MICA*\*A5/A9 (Figura 12). A heterozigotidade variou de 41%, em Guarani M'byá, a 59%, em Guarani Ñandeva e a diversidade gênica foi de 40%, também em Guarani M'byá, a 67%, em Kaingang de Ivaí (Tabela 33).

Além disso, foi descrita uma deleção de um segmento contendo o gene *MICA* inteiro, que ocorre normalmente com o alelo *HLA-B*\*4801 (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999). A metodologia utilizada no presente trabalho não permite a detecção desta deleção, mas é possível inferir sua existência utilizando-se conjuntamente a informação do genótipo do indivíduo para *HLA-B* e para *STR\_MICA*. É praticamente certo que indivíduos portadores do alelo *HLA-B*\*48 tenham a deleção. Isto se refletiria como um genótipo homocigoto para o loco *STR\_MICA*, com a deleção se comportando como um “alelo recessivo”. Portanto, admitiu-se que indivíduos portadores de *HLA-B*\*48 e homocigotos para *STR\_MICA* seriam, na verdade, heterocigotos, com a deleção em um dos cromossomos, e que indivíduos homocigotos para *HLA-B*\*48 que não obtiveram amplificação para o microssatélite seriam, na verdade, homocigotos para a deleção. A partir desta inferência percebeu-se que a deleção tem uma frequência alta em Kaingang. Por isso, as frequências alélicas para *STR\_MICA* foram re-calculadas nos Kaingang, inferindo-se a frequência da deleção como explicado acima (Tabela 34).

**TABELA 31.** Frequências alélicas (%) de *STR MICA*.

<i>STR MICA</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV	WIC <sup>1</sup>
A4	7,2				0,8	1,2
A5	<b>48,8</b>	27,1	<b>74,5</b>	29,4	34,5	<b>50,0</b>
A5.1	3,0	0,6	1,6	4,6		
A6	2,4	10,0	2,2	3,7	2,4	1,2
A9	38,6	<b>62,3</b>	21,2	<b>49,5</b>	<b>40,1</b>	47,6
A10			0,5	12,8	22,2	

<i>STR MICA</i>	TER <sup>1</sup>	TOBA <sup>1</sup>	JAP <sup>2</sup>	IND <sup>2</sup>	BRA	NAC <sup>1</sup>
A4		0,5	21,0	15,4	11,0	17,5
A5	<b>52,4</b>	<b>58,6</b>	<b>27,6</b>	26,0	11,7	15,4
A5.1	0,8	1,0	11,2	16,5	27,0	<b>37,7</b>
A6	2,3	4,3	27,0	5,5	<b>28,0</b>	14,1
A9	44,5	35,1	13,2	<b>36,6</b>	22,3	20,8
A10						

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; WIC: Wichi; TER: Terena; JAP: japoneses; IND: indonésios; BRA: população euro-brasileira; NAC: estado-unidenses de origem predominantemente européia.

<sup>1</sup>ZHANG *et al.*, 2002. <sup>2</sup>NISHIYAMA *et al.*, 2004.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

**TABELA 32.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *STR MICA*.

<i>STR MICA</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<10 <sup>-6</sup>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	
TER <sup>1</sup>	0,004460	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
WIC <sup>1</sup>	<b>0,048000</b>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
TOBA <sup>1</sup>	0,002100	<10 <sup>-6</sup>	0,001460	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
JAP <sup>2</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
IND <sup>2</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
NAC <sup>1</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; TER: Terena; WIC: Wichi; JAP: japoneses; IND: indonésios; BRA: população euro-brasileira; NAC: estado-unidenses de origem predominantemente européia.

<sup>1</sup>ZHANG *et al.*, 2002. <sup>2</sup>NISHIYAMA *et al.*, 2004.

■ Diferença não significativa considerando limite *p*=0,01.

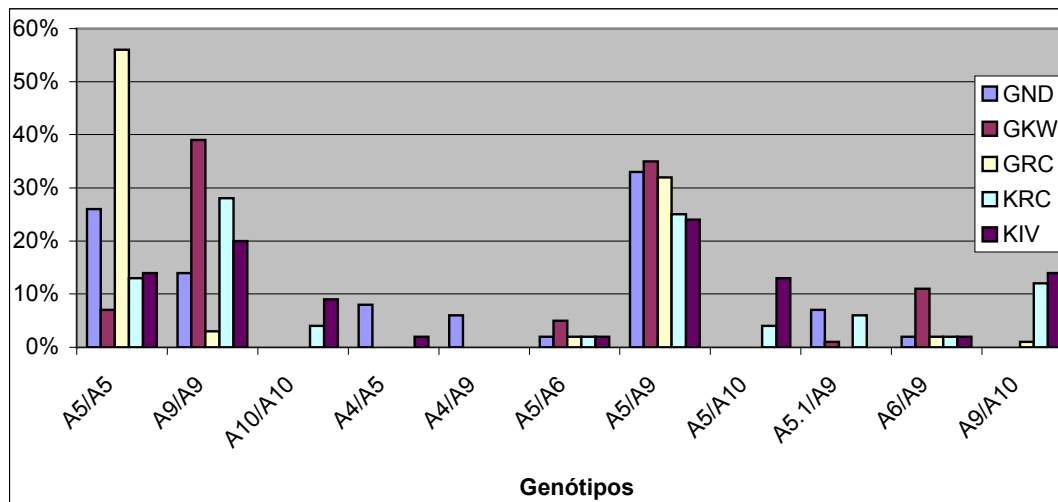
**TABELA 33.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *STR\_MICA*.

<i>STR_MICA</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,39211	0,72701	0,30134	0,08388	0,10972
Heterozigosidade*	59,0%	52,3%	41,3%	55,0%	56,3%
Diversidade**	61%	53%	40%	65%	67%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 12.** Frequências genotípicas de *STR\_MICA*.



NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

**TABELA 34.** Frequências alélicas (%) de *STR\_MICA* em Kaingang, considerando-se a deleção do gene *MICA*.

<i>STR_MICA</i>	A4	A5	A5.1	A6	A9	A10	del
KRC		26,8	4,5	3,6	<b>46,4</b>	12,3	6,3
KIV	0,8	31,9		2	<b>35,8</b>	20,9	8,7

KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; del: deleção do gene *MICA*.

■ Alelo mais frequente em cada população.

Para o microssatélite *HLABC-2CA* o alelo mais comum variou entre as populações, sendo que para os Kaingang foi o *HLABC-2CA\*125*, para os Guarani Kaiowá foi o *HLABC-2CA\*109*, para os Guarani Ñandeva foi o *HLABC-2CA\*91*, para os Guarani M'byá foi o *HLABC-2CA\*111* e para a população de Curitiba foi o *HLABC-2CA\*113* (Tabela 35). Entre os ameríndios, os alelos *HLABC-2CA\*103*, *HLABC-2CA\*107* e *HLABC-2CA\*115* só foram observados nos Guarani Ñandeva, o alelo *HLABC-2CA\*133* só foi observado em Guarani Kaiowá e o *HLABC-2CA\*135* nos Kaingang de Rio das Cobras. Todas as comparações mostraram diferenças significativas, sendo que o único valor de  $p$  maior que  $10^{-6}$  foi entre os Kaingang (Tabela 36).

Para este microssatélite, as freqüências genóticas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 37) nos Guarani M'byá e Ñandeva e nos Kaingang de Rio das Cobras. Nas demais populações (Guarani Kaiowá e Kaingang de Ivaí), foi observado um desvio do equilíbrio significativo ( $p=0,0095$  e  $p<10^{-6}$ , respectivamente). Com exceção dos Guarani M'byá, que tem genótipos com freqüências acima de 25% (*HLABC-2CA\*111/111* e *HLABC-2CA\*111/117*), as demais populações têm vários genótipos com freqüências baixas (Figura 13). Nos Guarani Ñandeva, apenas dois genótipos (*HLABC-2CA\*91/109* e *HLABC-2CA\*91/111*) têm freqüências maiores que 5%, sendo que a soma das freqüências dos genótipos representados na figura 13 para esta população é de apenas 48%. A heterozigidade observada variou de 61,9%, em Kaingang do Ivaí, a 90,4%, em Guarani Ñandeva e a diversidade de 64%, em Guarani M'byá, a 89%, em Guarani Ñandeva (Tabela 37).

**TABELA 35.** Frequências alélicas (%) de *HLABC-2CA*.

<i>HLABC-2CA</i>	População					
	GND (n=83)	GKW (n=155)	GRC (n=92)	KRC (n=109)	KIV (n=126)	BRA (n=143)
91	<b>18,1</b>	17,4	7,1	1,4	0,4	0,4
95						<b>3,8</b>
97						<b>0,4</b>
101	1,2	0,3	1,6		0,4	3,8
103	1,2					1,7
105	0,6	0,6		1,8	0,4	6,3
107	1,8					1,4
109	13,9	<b>36,1</b>	2,2	21,6	20,2	11,2
111	15,1	21,3	<b>53,8</b>	11,0	19,0	5,9
113	7,2	1,0	2,2	0,4		<b>12,9</b>
115	0,6					5,6
117	12,7	6,1	26,1	0,9	2,4	3,5
119				0,4	2,8	2,1
121	9,0	1,0	2,2	2,3	3,2	7,0
123	10,2			21,1	11,1	9,4
125	4,2	6,5	1,6	<b>31,2</b>	<b>36,9</b>	6,6
127	0,6			0,4	2,8	8,7
129	3,6	9,4	3,3	6,0	0,4	3,1
131						<b>2,4</b>
133		0,3				1,7
135				1,4		0,7
137						<b>0,4</b>
141						<b>0,4</b>
151						<b>0,4</b>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 36.** Valores de  $p$  nas comparações entre populações das frequências alélicas de *HLABC-2CA*.

<i>HLABC2CA</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<10 <sup>-6</sup>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	0,000020	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: População euro-brasileira.

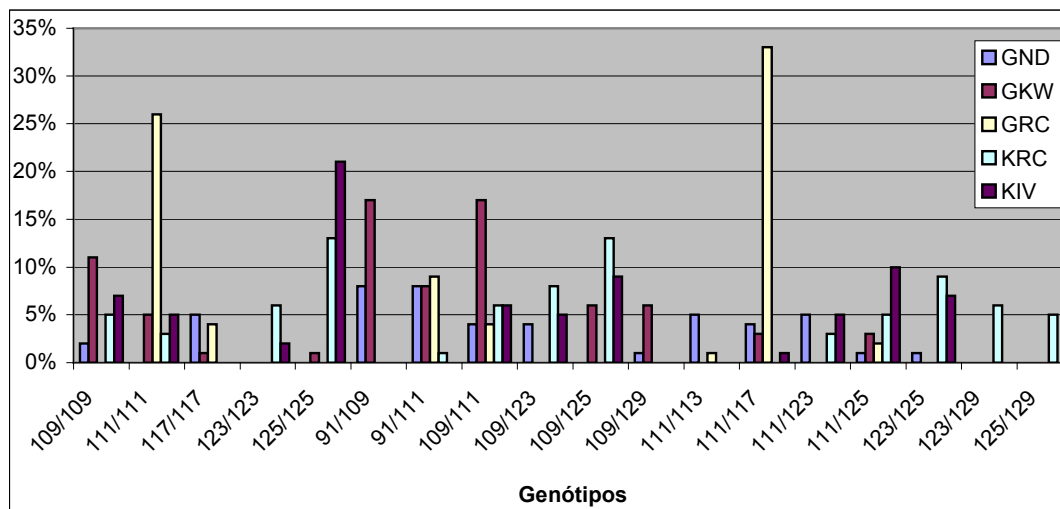
**TABELA 37.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *HLABC-2CA*.

<i>HLABC-2CA</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
$p$ HW	0,33677	0,00950	0,47689	0,11516	<10 <sup>-6</sup>
Heterozigosidade*	90,4%	76,8%	69,6%	70,6%	61,9%
Diversidade**	89%	78%	64%	80%	78%

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí;  $p$  HW: valor de  $p$  no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

■ Desvio significativo.

**FIGURA 13.** Frequências genotípicas de *HLABC-2CA*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

Para o microssatélite *D6S265* o alelo mais comum foi o *D6S265\*186* para os Kaingang, Guarani M'byá e Guarani Kaiowá, *D6S265\*184* nos Guarani Ñandeva e *D6S265\*180* nas demais populações (Tabela 38). Em Guarani Ñandeva e M'byá, os alelos *D6S265\*184* e *D6S265\*186* tiveram frequências bem próximas. Para este marcador foram possíveis comparações com frequências alélicas observadas em populações européias. Só não houve diferença significativa na comparação entre Guarani Ñandeva e Kaingang de Rio das Cobras (Tabela 39).

As frequências genótípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 40) em todas as populações, exceto Guarani Ñandeva ( $p=0,02518$ ). Com exceção dos Guarani M'byá, que tem um genótipo com frequência de 47% (*D6S265\*184/186*), as demais populações têm vários genótipos com frequências relativamente baixas (Figura 14). A heterozigosidade variou de 60,9%, em Guarani M'byá, a 84,5%, em Guarani Ñandeva e a diversidade, de 58%, também em Guarani M'byá, a 76%, em Guarani Ñandeva e em Kaingang de Rio das Cobras (Tabela 40).

Para o microssatélite *D6S2972* (*MOGCA*), as populações apresentaram um grande número de alelos em frequências relativamente baixas (Tabela 41), com exceção dos Kaingang de Ivaí, que apresentaram um alelo com frequência de 47,7% (*D6S2972\*134*). O alelo *D6S2972\*154* só foi observado nos Guarani Ñandeva. Para este marcador todas as comparações apresentaram diferenças altamente significativas, com valores de  $p$  menores que  $10^{-4}$  (Tabela 42).

As frequências genótípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 43). Todas as populações têm vários genótipos com frequências relativamente baixas (Figura 15). A heterozigosidade observada e a diversidade gênica variaram de 73,1% e 70%, em Kaingang do Ivaí, a 86,9% e 86%, em Guarani Ñandeva, respectivamente (Tabela 43).

**TABELA 38.** Frequências alélicas (%) de *D6S265*.

<i>D6S265</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV	BRA	GAL <sup>1</sup>	BRI <sup>2</sup>	BAS <sup>3</sup>
176	0,6			0,9	2,7	9,6	10,0	11,9	10,9
180	8,3	0,6	3,8	5,4	4,2	<b>29,5</b>	<b>35,8</b>	<b>38,1</b>	<b>34,4</b>
182	14,9	26,4	3,3	15,9	21,2	11,3	5,0	6,8	6,3
184	<b>33,3</b>	28,0	45,6	26,8	15,8	23,8	31,7	28,4	17,7
186	31,0	<b>43,9</b>	<b>46,2</b>	<b>33,6</b>	<b>44,6</b>	18,3	15,8	13,1	27,1
190	10,1			16,4	9,6			0,6	

Apenas alelos com frequência de no mínimo 5% em pelo menos uma população.

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; GAL: galeses (<sup>1</sup>WORWOOD *et al.*, 1997); BRI: britânicos (<sup>2</sup>RAHA-CHOWDHURY *et al.*, 1995); BAS: bascos (<sup>3</sup>PENA *et al.*, 2002).

■ Alelo mais freqüente em cada população.

**TABELA 39.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S265*.

<i>D6S265</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<10 <sup>-6</sup>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<b>0,238640</b>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	0,002360	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
GAL <sup>1</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
BRI <sup>2</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>
BAS <sup>3</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; GAL: galeses (<sup>1</sup>WORWOOD *et al.*, 1997); BRI: britânicos (<sup>2</sup>RAHA-CHOWDHURY *et al.*, 1995); BAS: bascos (<sup>3</sup>PENA *et al.*, 2002).

■ Diferença não significativa.

**TABELA 40.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S265*.

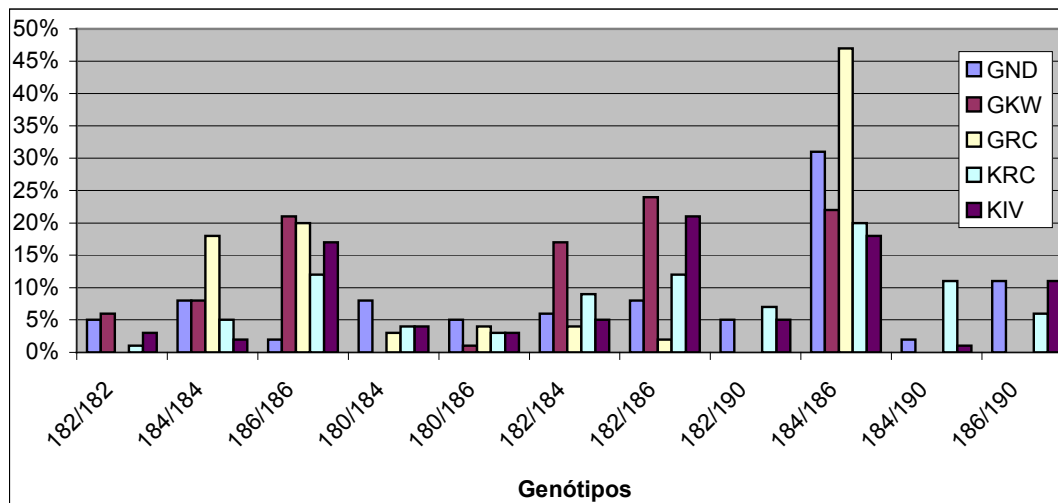
<i>D6S265</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	<b>0,02518</b>	0,84888	0,10976	0,88036	0,35919
Heterozigosidade*	84,5%	65,6%	60,9%	80,0%	77,7%
Diversidade**	76%	66%	58%	76%	72%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

■ Desvio significativo.



**FIGURA 14.** Frequências genotípicas de *D6S265*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

**TABELA 41.** Frequências alélicas (%) de *D6S2972* (*MOGCA*).

<i>D6S2972</i>	População					
	GND (n=84)	GWK (n=156)	GRC (n=93)	KRC (n=110)	KIV (n=129)	BRA (n=119)
122	9,5	12,5	<b>36,6</b>	2,7	0,8	23,3
126						<b>0,4</b>
130	1,2		1,6	0,4		15,8
132	<b>22,6</b>	14,1	33,9	17,7	14,6	<b>23,8</b>
134	15,5	16,0	3,2	<b>31,4</b>	<b>47,7</b>	3,8
136	10,7	5,4		18,6	9,6	8,3
138	1,2	0,3	0,5	3,2	1,9	5,8
140				4,1	0,4	0,4
142						<b>0,8</b>
144				0,4		5,0
146	11,3	9,6	12,9	1,4	0,4	0,8
148	16,1	16,0	8,6	6,4	3,5	9,6
150	10,7	<b>26,0</b>	2,7	13,6	21,1	1,7
154	<b>1,2</b>					

GND: Guarani Nãndeva; GWK: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 42.** Valores de  $p$  nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S2972* (MOGCA).

<i>D6S2972</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	$<10^{-6}$				
GRC	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$			
KRC	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$		
KIV	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	0,000020	
BRA	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$

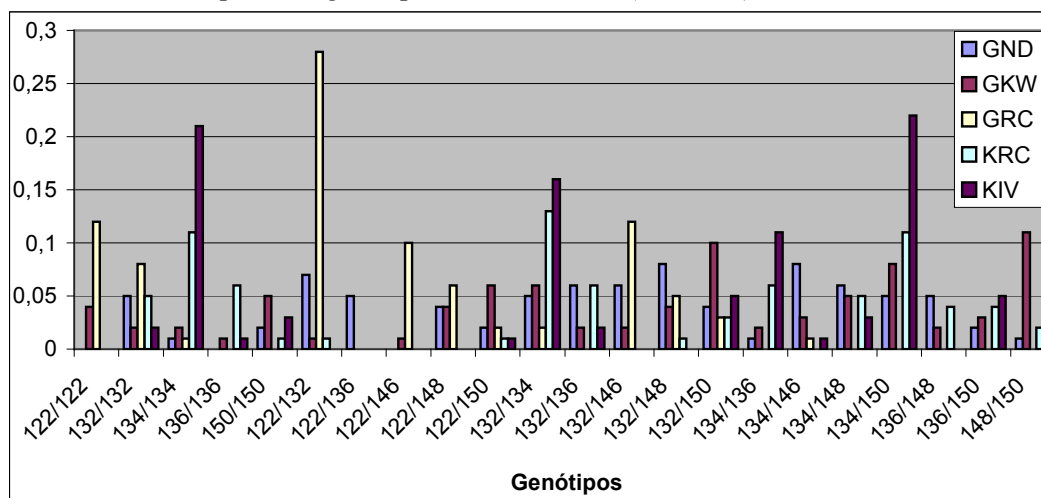
GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; BRA: População euro-brasileira.

**TABELA 43.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S2972* (MOGCA).

<i>D6S2972</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
$p$ HW	0,17068	0,52243	0,74616	0,33936	0,19990
Heterozigosidade*	86,9%	83,3%	78,5%	77,3%	73,1%
Diversidade**	86%	84%	73%	81%	70%

GND: Guarani Nãndeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai;  $p$  HW: valor de  $p$  no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 15.** Frequências genotípicas de *D6S2972* (MOGCA).

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

O microssatélite *D6S105* é telomérico à região de classe I. Para este microssatélite o alelo mais comum foi o *D6S105\*155* para todas as populações, atingindo uma frequência de até 80% em Guarani Kaiowá (Tabela 44). O alelo *D6S105\*169* foi observado apenas em Guarani M'byá, com uma frequência alta (12,5%). As diferenças entre as populações foram altamente significativas, com valores de  $p$  menores que  $10^{-6}$  (Tabela 45). Para este marcador foram encontrados alguns trabalhos na literatura (Tabelas 4 e 5), porém não foi possível fazer a correspondência dos alelos descritos com os alelos encontrados no presente estudo.

As frequências genótípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 46). O genótipo mais frequente foi o *D6S105\*155/155* em todas as populações (Figura 16), atingindo uma frequência de 64% em Guarani Kaiowá. A heterozigosidade observada e a diversidade gênica variaram de 33% e 34%, em Guarani Kaiowá, a 75% e 68%, em Guarani M'byá (Tabela 46).

O microssatélite *D6S276* também se encontra telomérico à região de classe I. Para este microssatélite o alelo mais comum foi o *D6S276\*143* nos Guarani e na população de Curitiba e o *D6S276\*131* nos Kaingang. O alelo *D6S276\*147* só foi observado em Guarani, com uma frequência relativamente alta nos Guarani M'byá (Tabela 47). As populações apresentaram diferenças altamente significativas, sendo que a diferença menos pronunciada foi observada entre as populações de Kaingang (Tabela 48).

Para este microssatélite, as frequências genótípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 49). Todas as populações têm vários genótipos com frequências relativamente baixas (Figura 17), sendo que o genótipo com maior frequência é o *D6S276\*131/143* em Kaingang do Ivaí. A heterozigosidade variou de 53,2%, em Kaingang de Rio das Cobras, a 92,4%, em Guarani M'byá e a diversidade gênica, de 60% em Kaingang do Ivaí, a 85%, também em Guarani M'byá (Tabela 49).

**TABELA 44.** Frequências alélicas (%) de *D6S105*.

<i>D6S105</i>	População					
	GND (n=83)	GKW (n=155)	GRC (n=92)	KRC (n=109)	KIV (n=126)	BRA (n=145)
143	2,4	3,2	7,1	1,4		1,4
145	1,2		1,6	0,5	5,1	2,4
147	0,6					0,7
149					2,4	3,1
151	9,0	13,9	0,5	6,4	1,6	13,4
153		0,6		2,8		13,1
155	<b>72,3</b>	<b>80,0</b>	<b>52,7</b>	<b>72,9</b>	<b>68,6</b>	<b>33,4</b>
157	3,6	1,9	11,4	0,9	0,4	14,1
159			1,1	2,3	1,6	13,1
161	6,6	0,3	11,4	0,9	4,8	2,8
163						<b>2,1</b>
165	4,2		1,6	11,9	15,5	
167						<b>0,3</b>
169			<b>12,5</b>			

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 45.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S105*.

<i>D6S105</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<10 <sup>-6</sup>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

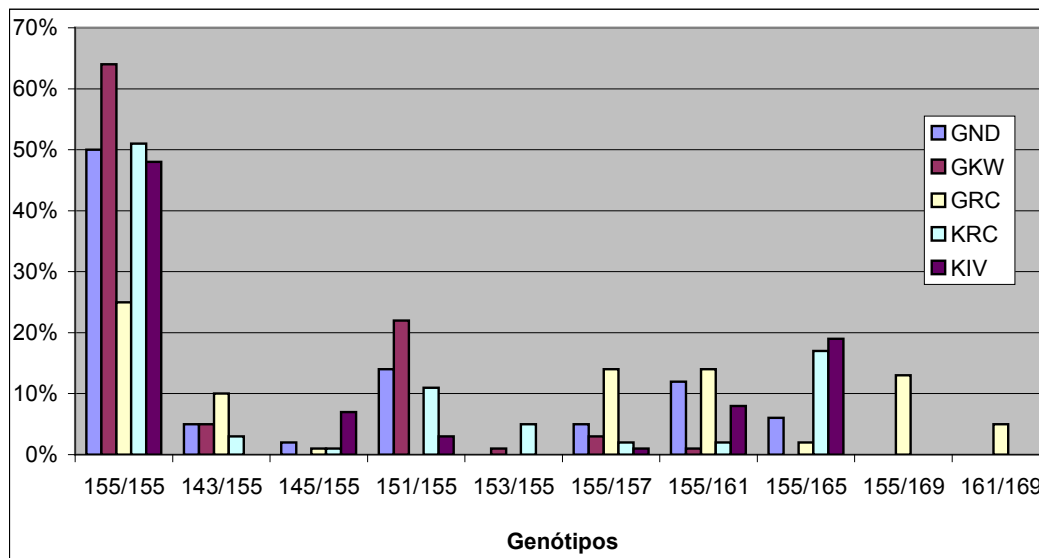
GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

**TABELA 46.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S105*.

<i>D6S105</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,86629	0,49360	0,59996	0,87073	0,23306
Heterozigosidade*	48,2%	32,9%	75,0%	47,7%	48,4%
Diversidade**	46%	34%	68%	45%	49%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 16.** Frequências genotípicas de *D6S105*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

**TABELA 47.** Frequências alélicas (%) de *D6S276*.

<i>D6S276</i>	População					
	GND (n=84)	GKW (n=156)	GRC (n=92)	KRC (n=109)	KIV (n=129)	BRA (n=120)
119	2,4	16,3	6,0	1,8		9,6
127	0,6	1,0				9,6
129	1,2	0,3	15,2	0,5	5,4	1,7
131	14,9	14,1	17,4	<b>45,4</b>	<b>49,2</b>	12,6
133	0,6	0,3		0,5		3,5
135			2,2			1,7
137				4,1		8,7
139	20,8	26,0	9,8	2,3	5,4	3,0
141	11,9	7,0	13,0	3,2	0,8	10,4
143	<b>46,4</b>	<b>34,3</b>	<b>22,3</b>	42,2	39,1	<b>32,2</b>
145	0,6					6,1
147	0,6	0,6	14,1			
149						<b>0,4</b>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

■ Alelo mais freqüente em cada população.

■ Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 48.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S276*.

<i>D6S276</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<10 <sup>-6</sup>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	0,007620	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

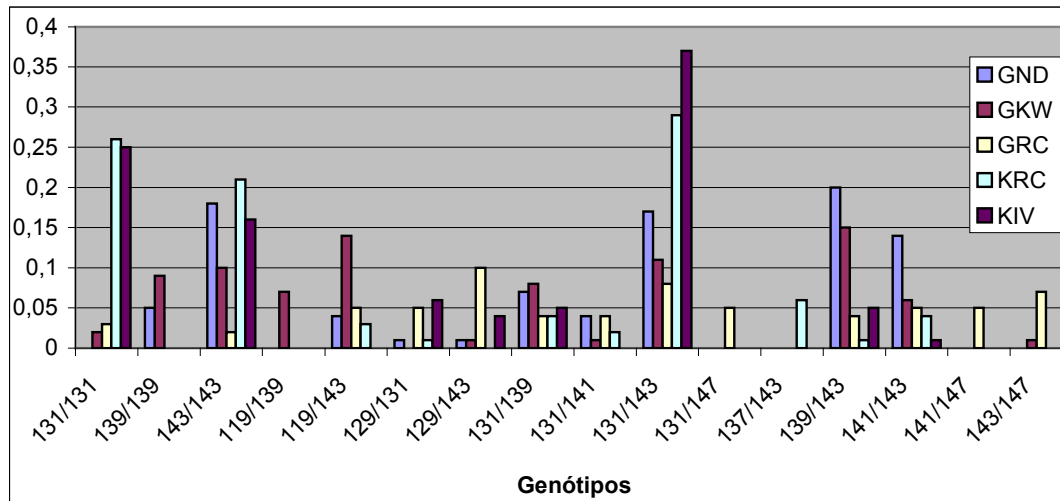
GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

**TABELA 49.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S276*.

<i>D6S276</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,48783	0,60871	0,83580	0,21519	0,60958
Heterozigosidade*	77,4%	77,6%	92,4%	53,2%	59,7%
Diversidade**	71%	77%	85%	61%	60%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.

**FIGURA 17.** Frequências genótípicas de *D6S276*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

Ainda mais telomérico à região de classe I está o microssatélite *D6S2222*, para o qual o alelo mais comum foi o *D6S2222\*240* nos Guarani e na população de Curitiba e o *D6S2222\*250* nos Kaingang (Tabela 50). O alelo *D6S2222\*243* só foi observado nos Guarani, com uma frequência relativamente alta nos Guarani M'byá. As comparações entre populações revelaram diferenças altamente significativas, sendo que a diferença menos pronunciada foi observada entre as populações de Kaingang (Tabela 51).

Para este microssatélite, as frequências genótípicas observadas estavam de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações (Tabela 52). Todas as populações têm vários genótipos com frequências relativamente baixas (Figura 18), sendo que o genótipo com maior frequência é o *D6S2222\*240/240* em Guarani M'byá (37%). A heterozigosidade variou de 58%, em Guarani Kaiowá, a 74%, em Kaingang de Rio das Cobras e a diversidade gênica de 59%, em Guarani M'byá, a 74% em Kaingang de Rio das Cobras (Tabela 52).

**TABELA 50.** Frequências alélicas (%) de *D6S2222*.

<i>D6S2222</i>	População					
	GND (n=83)	GKW (n=155)	GRC (n=92)	KRC (n=109)	KIV (n=126)	BRA (n=142)
236				4,1		0,7
238	7,2	7,7				1,0
240	<b>52,4</b>	<b>49,0</b>	<b>58,7</b>	19,7	19,8	<b>47,9</b>
241				2,3		1,4
242	6,0	1,3	3,8	19,3	17,1	38,4
243	4,8	0,3	11,4			
244	6,6	4,2	21,2	14,7	21,8	7,4
246						<b>0,4</b>
250	21,7	37,4	4,9	<b>39,9</b>	<b>41,3</b>	2,1
252	1,2					0,7

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira; n: número de indivíduos.

- Alelo mais freqüente em cada população.
- Alelos exclusivos de uma população.

**TABELA 51.** Valores de *p* nas comparações entre populações das frequências alélicas de *D6S2222*.

<i>D6S2222</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	<10 <sup>-6</sup>				
GRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>			
KRC	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>		
KIV	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	0,003620	
BRA	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>	<10 <sup>-6</sup>

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

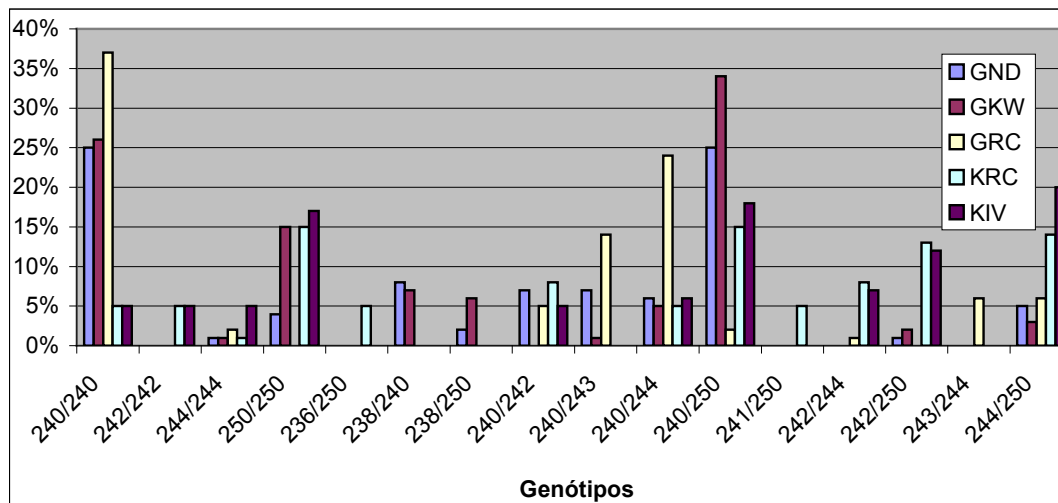
**TABELA 52.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidades para *D6S2222*.

<i>D6S2222</i>	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
<i>p</i> HW	0,35595	0,34548	0,19830	0,63804	0,64567
Heterozigosidade*	68,7%	58,1%	61,9%	74,3%	69,8%
Diversidade**	67%	61%	59%	74%	71%

GND: Guarani Nandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; *p* HW: valor de *p* no cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

\*Heterozigosidade observada; \*\*Diversidade gênica ou heterozigosidade esperada.



**FIGURA 18.** Frequências genótípicas de *D6S2222*.

NOTA: Apenas genótipos com no mínimo 5% de frequência em pelo menos uma população são mostrados.

## 5.2 DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES

Os microssatélites foram utilizados como marcadores para o cálculo da distância genética entre as populações. Para que fosse utilizada a população euro-brasileira de Curitiba (ver item 5.1) foi excluído o microssatélite *D6S2876* (*G51152*). Não foram adicionadas outras populações, pois para nenhuma outra população há dados de todos os microssatélites analisados.

As maiores distâncias foram observadas entre a população de Curitiba e os Guarani M'byá e Kaiowá. Entre os indígenas, as maiores distâncias foram entre os Kaingang (KRC e KIV) e os Guarani M'byá (Tabela 66). A menor distância foi observada entre os Kaingang de Rio das Cobras e os Kaingang de Ivaí. Também foi pequena a distância entre os Guarani Kaiowá e Nandeva, ambos do Mato Grosso do Sul (Tabela 53).

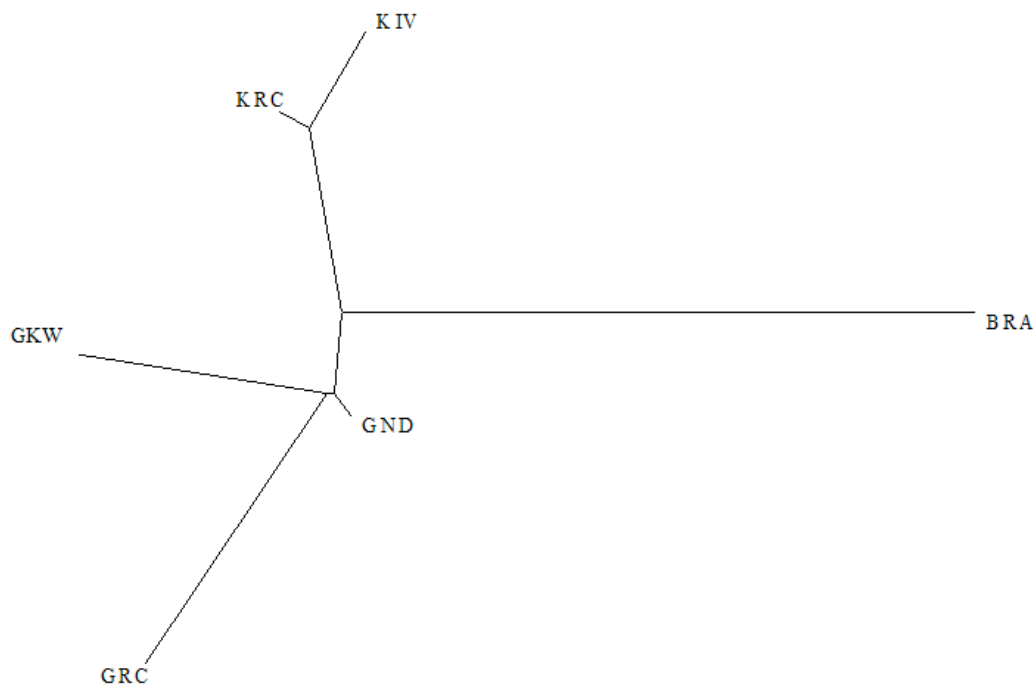
O dendrograma mostrou que a população mais distante das outras é a população de Curitiba. Além disso, o dendrograma agrupou os três grupos de Guarani e também agrupou os Kaingang (Figura 19).

**TABELA 53.** Distâncias genéticas entre as populações.

	GND	GKW	GRC	KRC	KIV
GKW	0.027883				
GRC	0.037045	0.058099			
KRC	0.037497	0.053501	0.073865		
KIV	0.044331	0.058874	0.074426	0.014764	
BRA	0.067050	0.095406	0.097677	0.074385	0.094958

Distâncias genéticas estimadas com o método de Cavalli-Sforza e Edwards (1967).

GND: Guarani Ñandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

**FIGURA 19.** Dendrograma não-enraizado com as populações deste estudo e uma população de Curitiba.

NOTA: Dendrograma obtido pelo método Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987).

GND: Guarani Ñandeva; GKW: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivaí; BRA: população euro-brasileira.

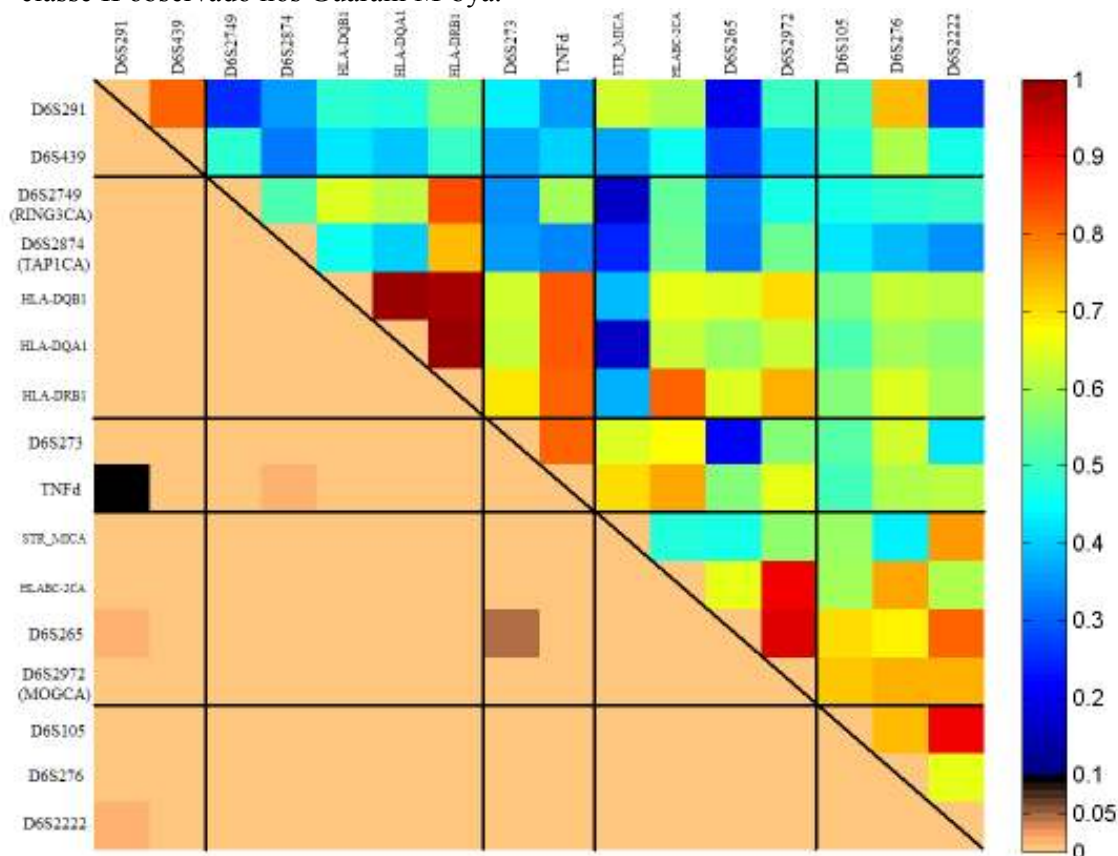
### 5.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Foi estimado o desequilíbrio de ligação com base nos dados dos microssatélites deste trabalho e também de genes do MHC analisados em estudos anteriores (ver item 4.3). No cálculo também foi utilizada a população euro-brasileira da região metropolitana de Curitiba (ver item 5.1). Para os genes do MHC incluídos na análise nem sempre há dados para todas as populações. Por isso, foram feitos dois conjuntos de figuras de padrões de desequilíbrio de ligação. O primeiro conjunto mostra todos os locos que têm dados para todas as populações. O segundo conjunto mostra todos os locos analisados em cada população, portanto os locos apresentados nas figuras deste conjunto diferem entre as populações.

Para os genes *HLA*, pelo fato das metodologias de tipagem nem sempre permitirem a distinção entre todos os alelos, alguns resultados foram mantidos em baixa resolução, agrupando alelos. Este foi o caso dos grupos alélicos *HLA-DQB1\*02*, *HLA-DQB1\*06*, *HLA-DQA1\*03* e *HLA-DRB1\*03*. Em um grupo, *HLA-DQA1\*01*, apenas dois alelos foram agrupados, *HLA-DQA1\*0101* e *HLA-DQA1\*0104*. Para os genes de classe I, foi utilizada a tipagem sorológica, pois para apenas duas populações há dados moleculares. Esta baixa resolução utilizada nas análises pode afetar os padrões de desequilíbrio de ligação encontrados. Por exemplo, se dois alelos diferentes que foram agrupados estiverem em desequilíbrio de ligação com alelos diferentes de outro loco, o desequilíbrio do grupo deve ficar menor do que seria sem o agrupamento. Já se os alelos agrupados estiverem em desequilíbrio com o mesmo alelo de outro loco, o padrão deve ser mantido.

O desequilíbrio de ligação é visivelmente menos pronunciado na população de Curitiba (Figuras 20 a 25). Entre os ameríndios, os Guarani Ñandeva são os que apresentam desequilíbrio menos intenso e os Guarani M'byá mais intenso.

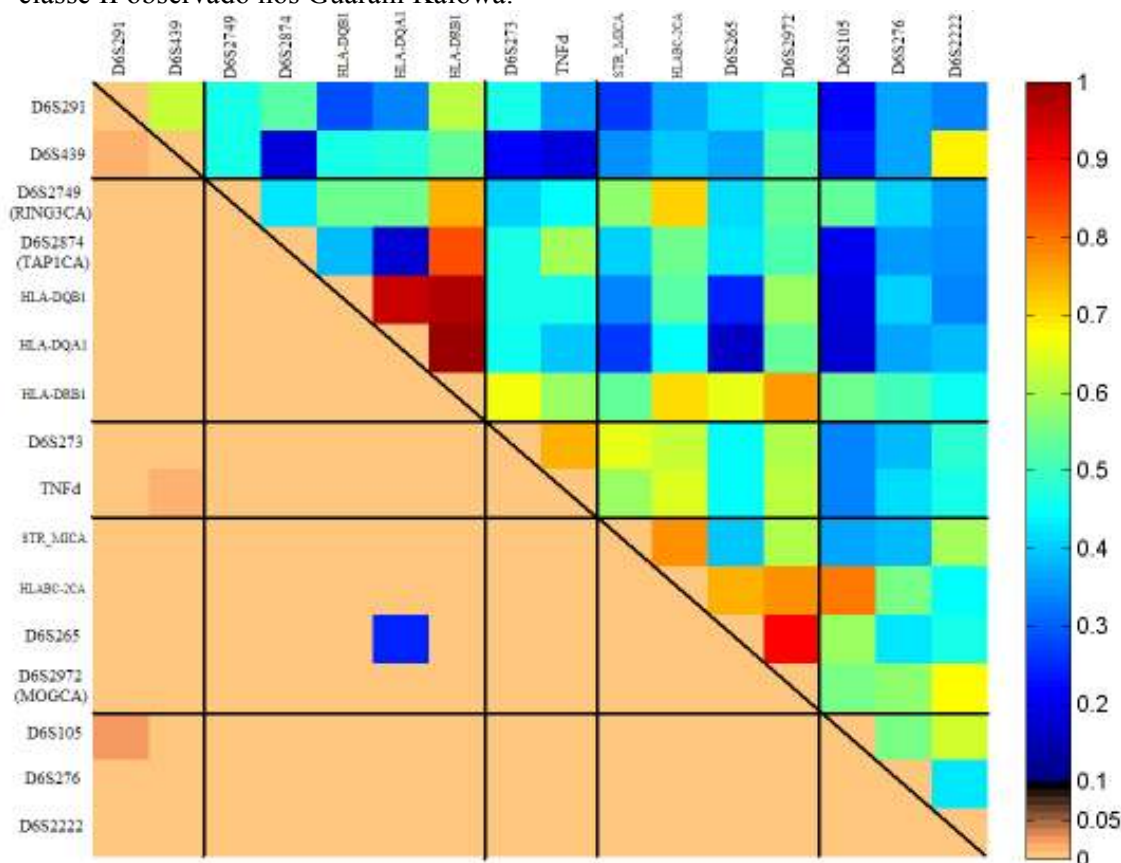
**FIGURA 20.** Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes *HLA* de classe II observado nos Guarani M'byá.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $r$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

Outro resultado que chama a atenção é que o único segmento com forte desequilíbrio de ligação em todas as populações, incluindo a população de Curitiba, é o que se estende do gene *HLA-DQB1* ao gene *HLA-DRB1*. Nas cinco populações ameríndias pode ser observado um desequilíbrio forte entre os microssatélites *D6S2972* (*MOGCA*) e *D6S265*, menos intenso nos Guarani Ñandeva. Alguns pares de locos apresentam desequilíbrio de ligação forte em pelo menos três populações: *D6S2749* (*RING3CA*) e *HLA-DRB1*, *D6S2874* (*TAP1CA*) e *HLA-DRB1*, *HLA-DRB1* e *D6S2972* (*MOGCA*), *STR\_MICA* e *HLABC-2CA*, *HLABC-2CA* e *D6S2972* (*MOGCA*), *D6S105* e *D6S2222*.

**FIGURA 21.** Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes *HLA* de classe II observado nos Guarani Kaiowá.

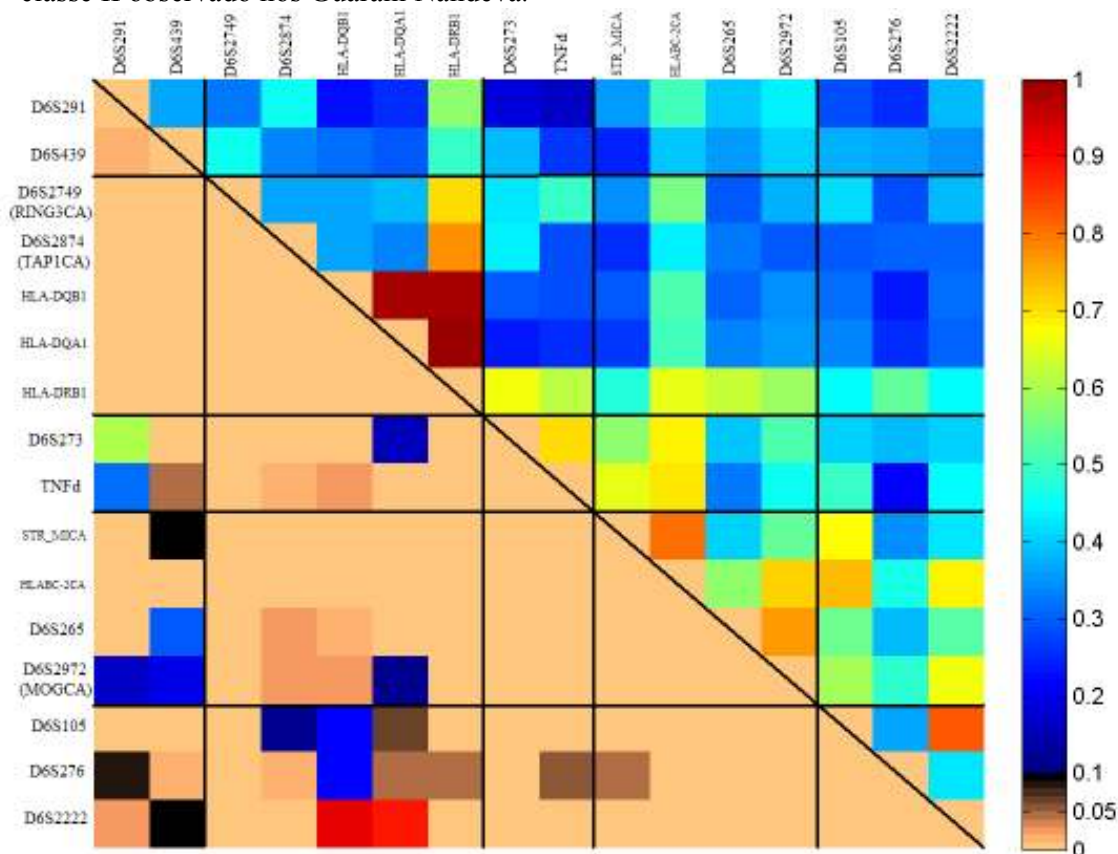


NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $r$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

Com exceção do segmento mencionado, do gene *HLA-DQB1* ao gene *HLA-DRB1*, a região de classe I tem desequilíbrio de ligação mais acentuado. Por outro lado, o desequilíbrio menos intenso é entre locos de classe I e locos de classe II.

Na região de classe III, neste primeiro conjunto de figuras, foram analisados apenas dois locos. Nos Guarani (Figuras 20, 21 e 22), estes dois locos estão em desequilíbrio com valores de  $D'$  acima de 65%. Já nos Kaingang e na população de Curitiba (Figuras 23, 24 e 25), os valores de  $D'$  estão entre 20% e 50%.

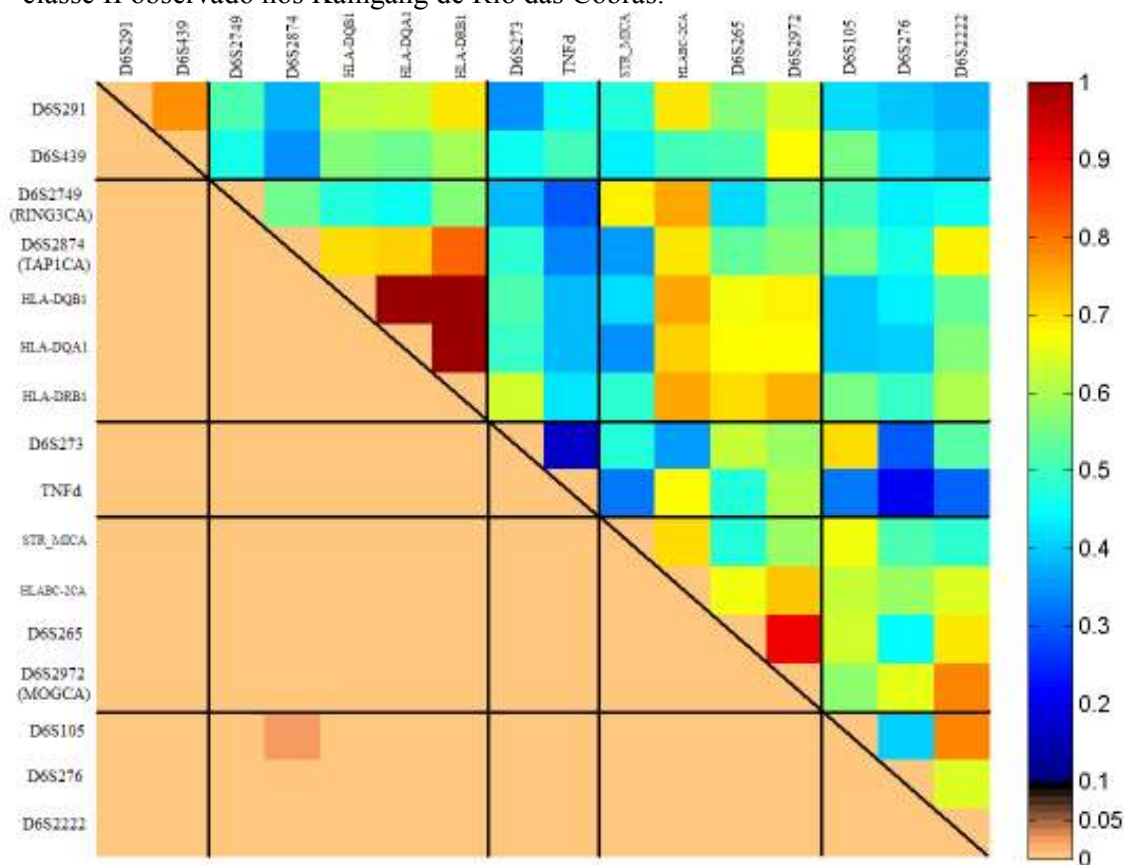
**FIGURA 22.** Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes *HLA* de classe II observado nos Guarani Nandeva.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $r$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

O segundo conjunto de gráficos (Figuras 26 a 30) mostra os resultados de desequilíbrio de ligação para todos os locos do MHC dos quais há dados para a população em questão. A população de Curitiba não aparece aqui, pois a Figura 25 já representa todos os locos com dados para esta população. Os locos analisados coincidem para os Guarani do Mato Grosso do Sul, Guarani Nandeva e Guarani Kaiowá (Figuras 26 e 27). Os locos também são os mesmos para as populações do Paraná, Guarani M'byá, Kaingang de Rio das Cobras e Kaingang de Ivaí (Figuras 28, 29 e 30).

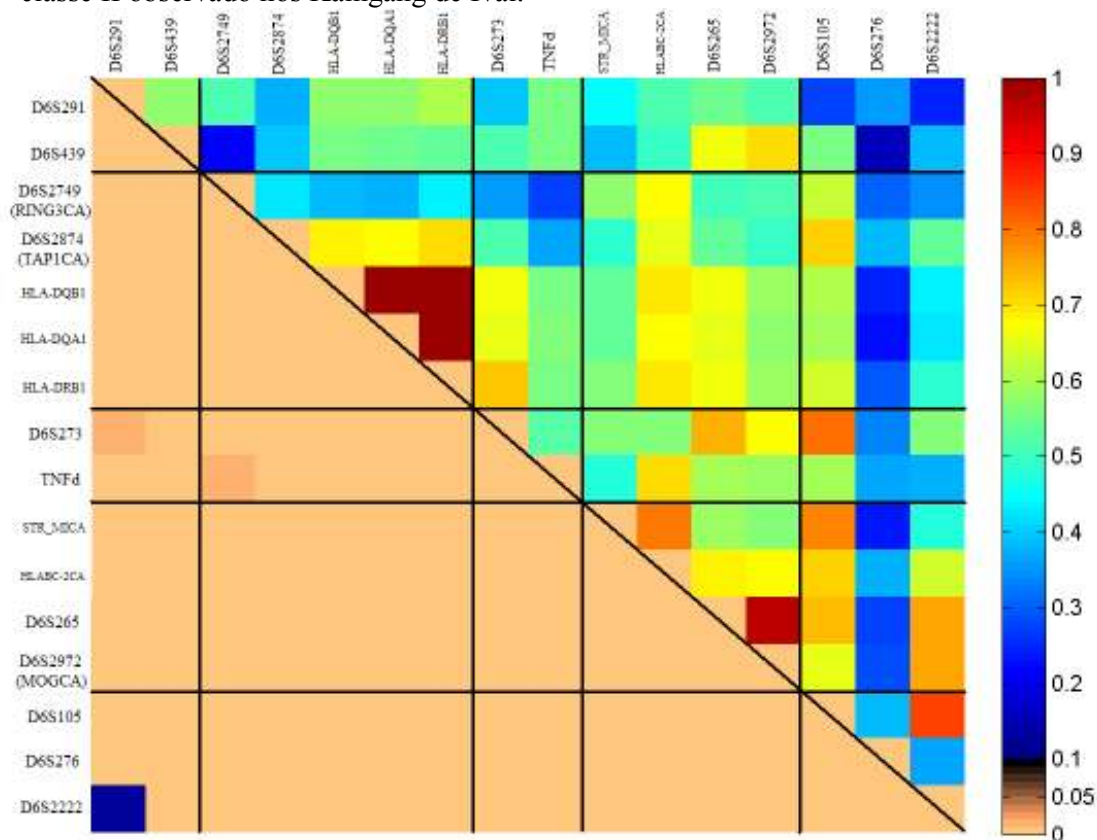
**FIGURA 23.** Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes *HLA* de classe II observado nos Kaingang de Rio das Cobras.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $r$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

O segmento que apresentava forte desequilíbrio no primeiro conjunto de gráficos, do gene *HLA-DQB1* ao gene *HLA-DRB1*, é estendido neste conjunto, englobando o microssatélite *D6S2876* (*G51152*) e os genes *HLA-DR* analisados (*HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* e *HLA-DRB5* nos Guarani de Mato Grosso do Sul; *HLA-DRA* nas populações do Paraná). Outro segmento se destaca, englobando os locos *D6S265*, *HLA-A* e *D6S2972* (*MOGCA*).

**FIGURA 24.** Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes *HLA* de classe II observado nos Kaingang de Ivaí.

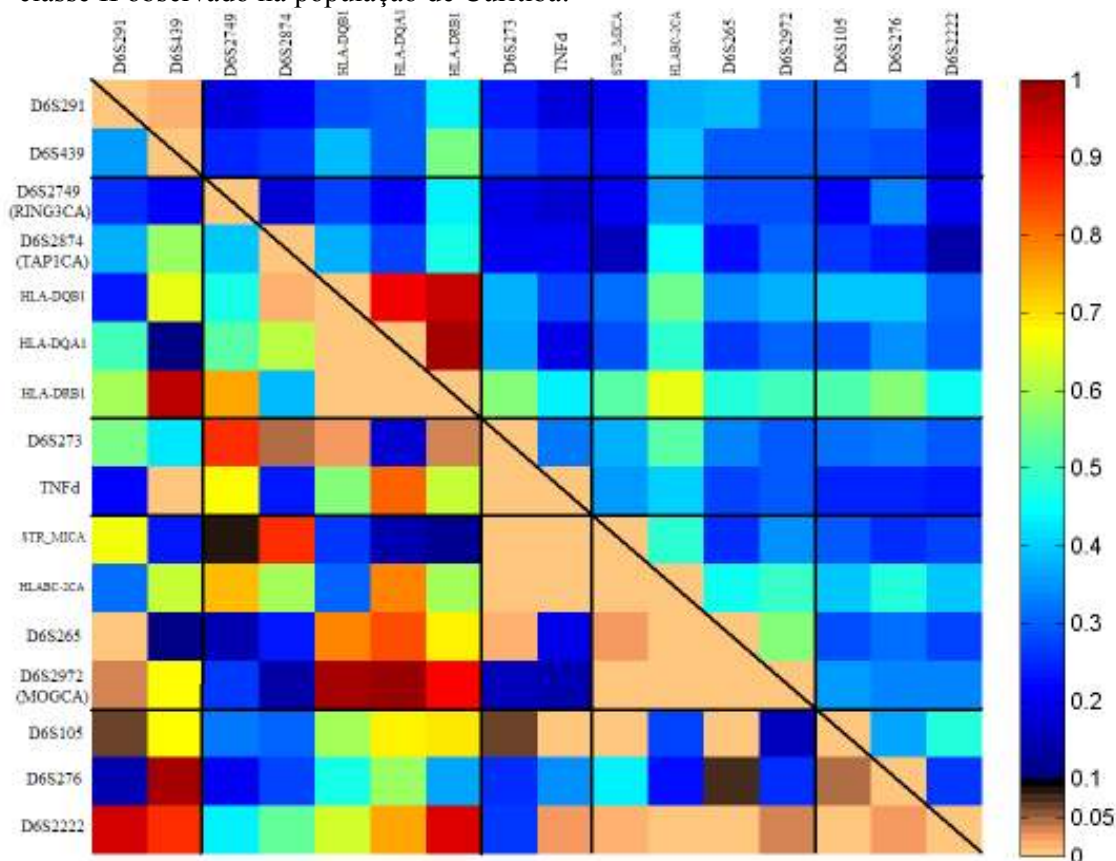


NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $r$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

Nas populações do Paraná, outros segmentos apresentaram forte desequilíbrio de ligação (Figuras 28, 29 e 30). O primeiro segmento vai do gene *HLA-DPA1* ao gene *HLA-DMB*. Outro segmento vai do gene *LMP2* ao gene *TAP2*. Estes dois segmentos englobam apenas um microssatélite cada um, *D6S2749* (*RING3CA*) e *D6S2874* (*TAP1CA*), respectivamente.



**FIGURA 25.** Padrão de desequilíbrio de ligação para os microssatélites e genes *HLA* de classe II observado na população de Curitiba.

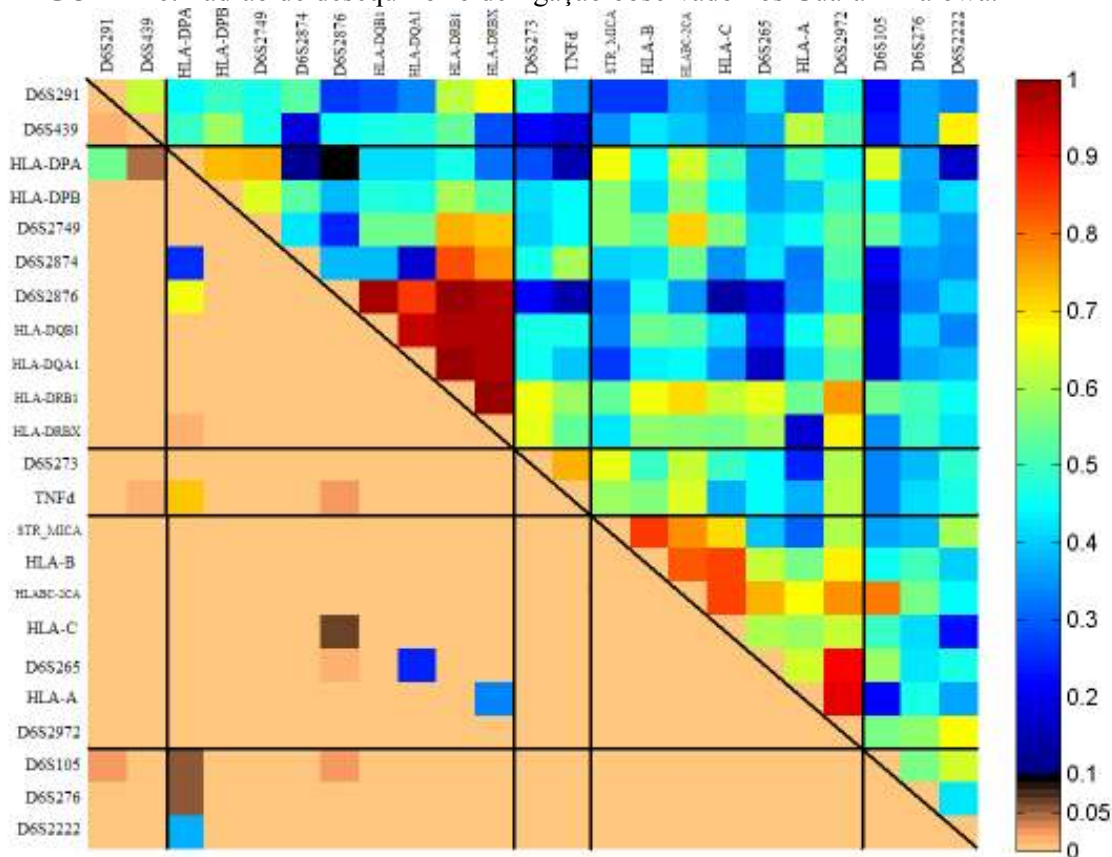


NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $r$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

Nos Guarani do Mato Grosso do Sul (Figuras 26 e 27), o desequilíbrio entre locos de classe I e locos de classe II é muito reduzido. Nas demais populações, alguns pares de locos de classe I e classe II apresentam desequilíbrio forte.

A região de classe III apresenta desequilíbrio de ligação mais acentuado em Guarani (Figuras 26, 27 e 28) do que em Kaingang (Figuras 29 e 30).

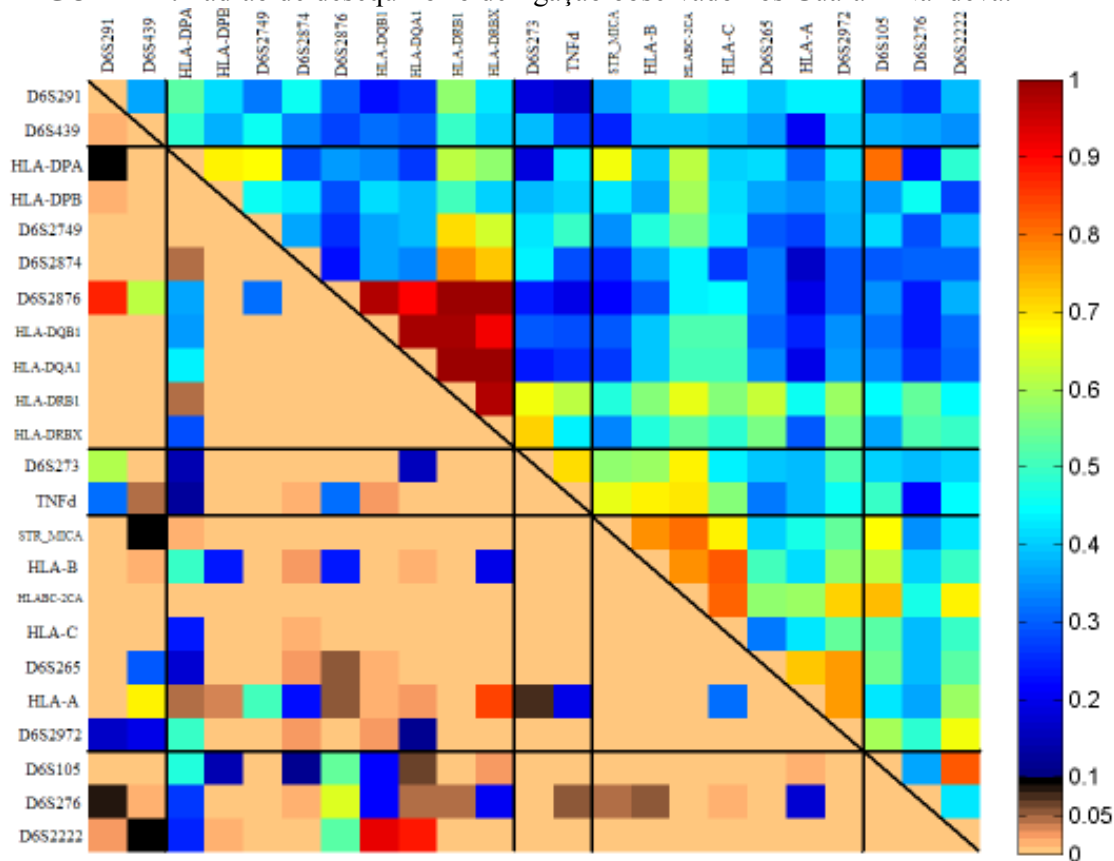
**FIGURA 26.** Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Guarani Kaiowá.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $p$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

Chama atenção o padrão de desequilíbrio de ligação na região de classe I nos Guarani M'byá (Figura 28). Nesta população, a região de classe I parece formar um grande bloco de desequilíbrio de ligação, com valores altos de  $D'$  para quase todos os pares de locos.

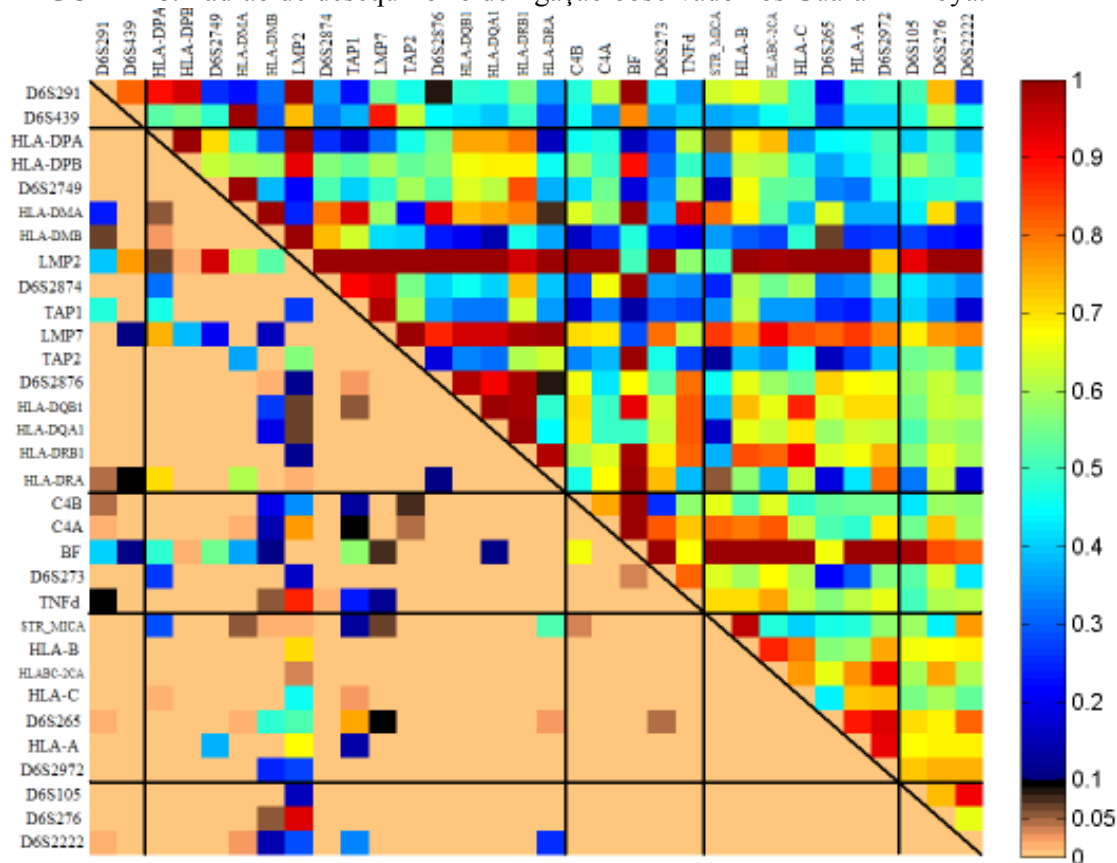
**FIGURA 27.** Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Guarani Nandeva.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $p$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

Para verificar a relação entre desequilíbrio de ligação e distância física entre os locos e, também, para facilitar a comparação entre populações, foi feito um gráfico em que os valores de  $D'$  são plotados em relação à distância entre os locos (Figura 31). Para este gráfico foram utilizados apenas os microssatélites e foi excluído o loco *D6S2876* (*G51152*), pois para este loco não há dados para a população de Curitiba. Por este gráfico, percebe-se o menor desequilíbrio de ligação da população de Curitiba. Há uma leve tendência, não significativa, de um menor desequilíbrio de ligação para locos mais distantes (Figura 31B), os quais não apresentam valores de  $D'$  acima de 75%.

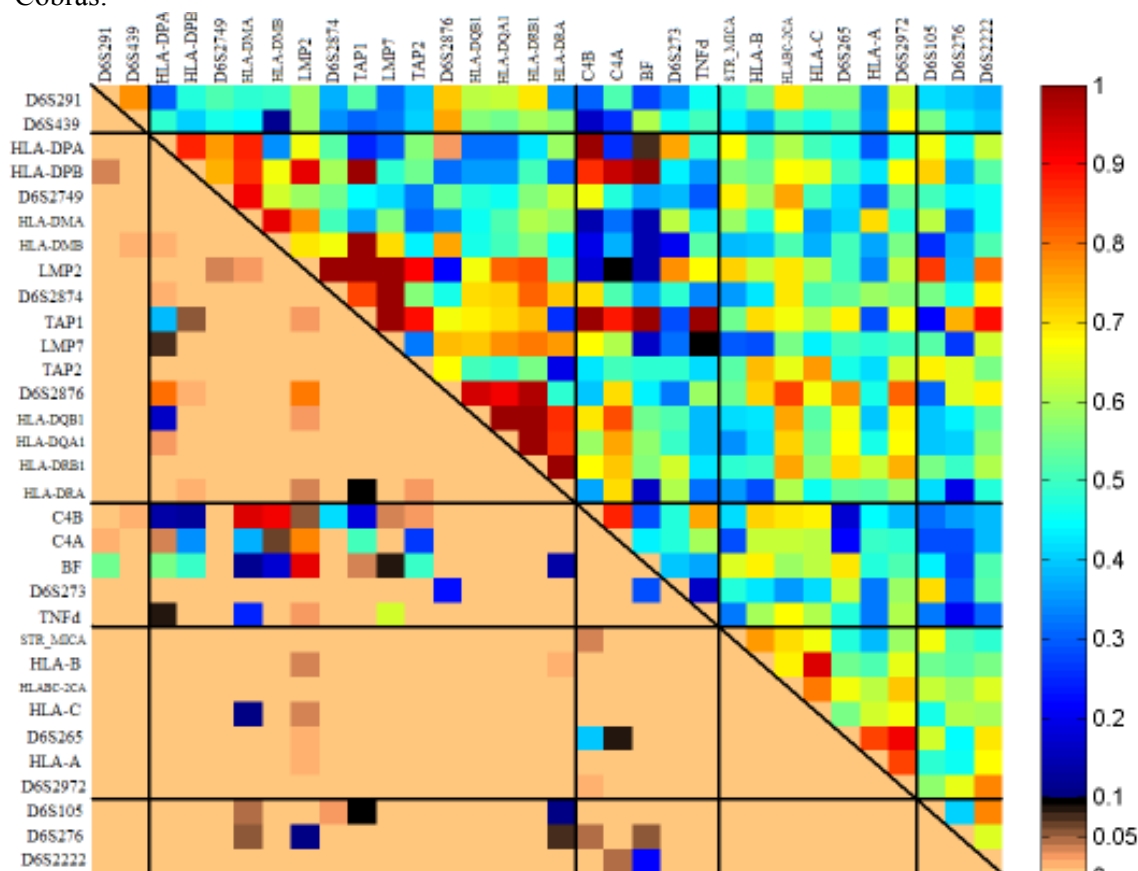
**FIGURA 28.** Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Guarani M'byá.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $p$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

As frequências haplotípicas foram calculadas para os segmentos que apresentaram desequilíbrio de ligação relativamente forte, com pares de locos com  $D'$  maior que 80%, em todas as populações (Figuras 20 a 30). Como nem todos os locos foram genotipados em todas as populações, em dois casos (Tabelas 54 e 55), as frequências são apresentadas apenas para as populações do estado do Paraná, Guarani M'byá e Kaingang.

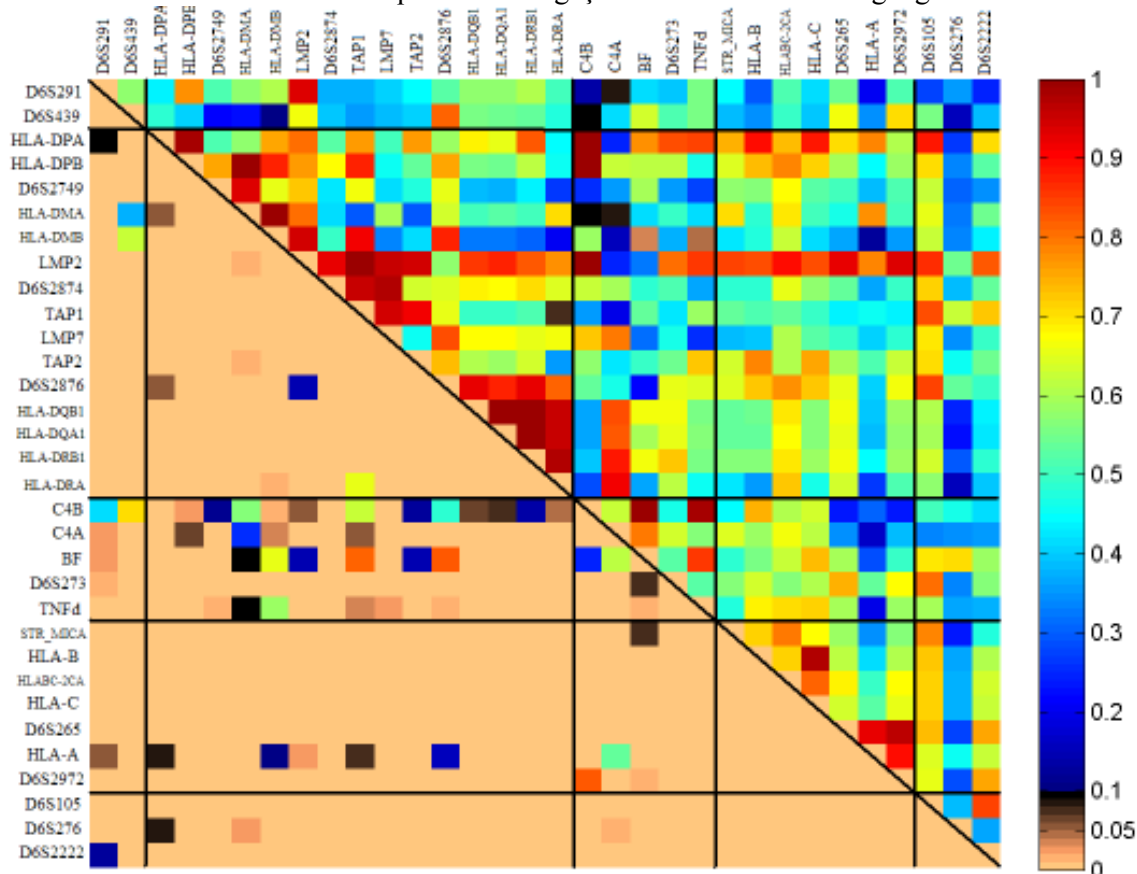
**FIGURA 29.** Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Kaingang de Rio das Cobras.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $r$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

As frequências haplotípicas evidenciam as diferenças genéticas entre as populações, principalmente entre os Guarani e os Kaingang (Tabelas 54 a 57). Muitos haplótipos são exclusivos de Guarani ou de Kaingang, ou muito frequentes em um e raros no outro. O segmento que mais evidencia isso é justamente aquele que apresentou desequilíbrio de ligação mais acentuado, do loco *D6S2876* (*G51152*) ao *HLA-DRB1*. Entre as populações de Guarani também há diferenças, principalmente entre os Guarani do Mato do Grosso do Sul, Kaiowá e Nandeva, e os do Paraná, M'byá (Tabelas 56 e 57).

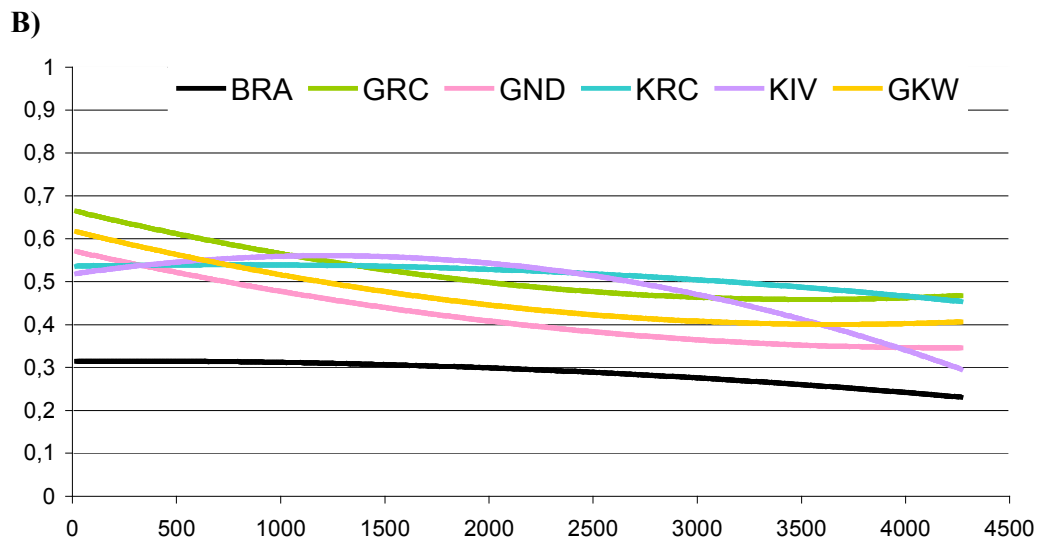
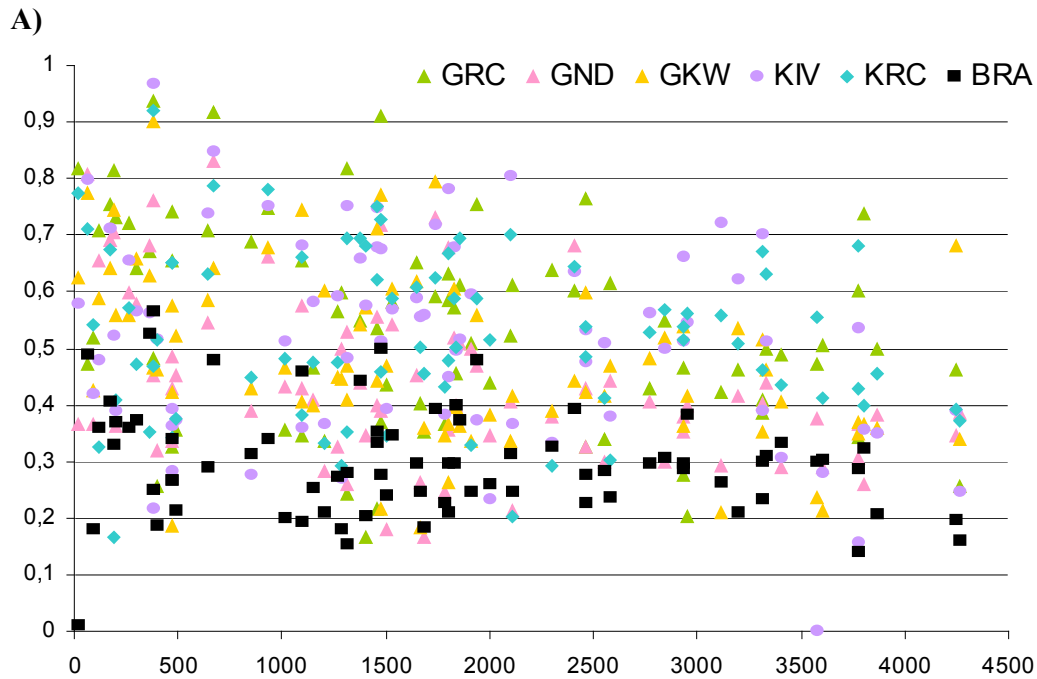
**FIGURA 30.** Padrão de desequilíbrio de ligação observado nos Kaingang de Ivaí.



NOTA: Os locos estão em ordem do centrômero ao telômero. A diagonal superior se refere a valores de  $D'$ ; a diagonal inferior se refere a valores de  $p$ . As linhas verticais e horizontais separam os locos que são centroméricos à região de classe II, locos de classe II, locos de classe III, locos de classe I e locos teloméricos a classe I.

O segmento que vai do gene *HLA-DPA1* ao *HLA-DMB* (Tabela 54) engloba o microssatélite *D6S2749* (*RING3CA*). Três dos cinco alelos do microssatélite ocorrem somente em um haplótipo, *D6S2749\*229*, *D6S2749\*231* e *D6S2749\*237*. Destes, o haplótipo com *D6S2749\*231* é exclusivo de Kaingang e o haplótipo com *D6S2749\*237* só ocorre em Kaingang do Ivaí. Dos outros dois alelos, *D6S2749\*233* só ocorre com *HLA-DMA\*0101*.

**FIGURA 31.** Gráfico dos valores de  $D'$  em relação à distância entre os locos.



NOTA: A) Os pontos representam um par de loco, a distância entre os locos (em pares de base) está no eixo x e valor de  $D'$  para este par no eixo y. B) Linhas de tendência relativas ao pontos plotados em A. GND: Guarani Nandeva; GWK: Guarani Kaiowá; GRC: Guarani M'byá; KRC: Kaingang de Rio das Cobras; KIV: Kaingang de Ivai; BRA: população euro-brasileira.

No segmento que vai do loco *LMP2* ao loco *TAP2* (Tabela 55), está englobado o microsatélite *D6S2874* (*TAPICA*), que está localizado no íntron 3 do gene *TAP1*. Os alelos *D6S2874\*191* e *D6S2874\*193* só ocorrem com *TAP1\*0101*. Já o alelo *D6S2874\*201* ocorre com *TAP1\*0201*.

Considerando-se os locos *D6S2876* (*G51152*), *HLA-DQB1* e *HLA-DQA1*, que se localizam, como visto acima, num segmento com forte desequilíbrio de ligação, o alelo *D6S2876\*215* (Tabela 56) só ocorre com *DQB1\*0301-DQA1\*0501* ou com *DQB1\*0303-DQA1\*03*. Já o alelo *D6S2876\*223* ocorre com *DQB1\*0302-DQA1\*03* ou com *DQB1\*0402-DQA1\*0401*. Cada haplótipo destes ocorre com mais de um alelo de *HLA-DRB1*, com exceção de *D6S2876\*215-DQB1\*0303-DQA1\*03*, que só ocorre com *DRB1\*09012*. Porém, cada alelo de *HLA-DRB1* ocorre em somente um haplótipo *D6S2876 - HLA-DQB1 - HLA-DQA1*.

O segmento que vai do loco *STR\_MICA* ao loco *D6S2972* (*MOGCA*) engloba todos os genes *HLA* de classe I clássicos, *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (Tabela 57). Percebe-se que cada tipo sorológico de *HLA-B* ocorre com somente um alelo de *STR\_MICA*, com exceção do *B\*35*, que ocorre com *STR\_MICA\*A9* e *STR\_MICA\*A10*. Além disso, os alelos *HLABC2CA\*123*, *D6S265\*190* e *D6S2972\*136* ocorrem em somente um haplótipo, com *STR\_MICA\*A9*, *B\*35*, *Cw\*04* e *A\*31*, haplótipo freqüente entre os Kaingang.

Com as freqüências haplotípicas (Tabela 57) fica visível a diferença do desequilíbrio de ligação nos Guarani Ñandeva (Figura 27). Eles apresentaram um maior número de haplótipos em menor freqüência. Os haplótipos colocados na tabelas, que são apenas aqueles com freqüência de no mínimo 5% em pelo menos uma população, somam 29,2% nesta população, 50,3% em Guarani Kaiowá e mais de 65% nas outras populações. Além disso, o haplótipo mais freqüente em Guarani Ñandeva tem freqüência de apenas 7,9%.



**TABELA 54.** Frequências haplotípicas (%) para os locos *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *D6S2749* (*RING3CA*), *HLA-DMA* e *HLA-DMB* nas populações indígenas do estado do Paraná.

<i>HLA-DPA1</i>	<i>HLA-DPB1</i>	<i>D6S2749</i>	<i>HLA-DMA</i>	<i>HLA-DMB</i>	GRC	KRC	KIV
01	0301	233	0101	0103		8,0	15,5
01	0401	233	0101	0103	15,1	7,0	2,7
01	0402	229	0101	0101	11,3	1,1	4,5
01	0402	231	0101	0101		7,4	9,1
01	0402	233	0101	0101	7,3		3,6
01	0402	233	0101	0103	18,3	11,9	5,6
01	0402	235	0101	0103		9,1	5,3
01	0402	235	0102	0101	6,1	<b>25,3</b>	<b>23,6</b>
0201	0901	233	0101	0103	0,6	14,0	14,4
0201	1302	237	0101	0103			5,4
0201	1401	235	0102	0101	11,0	1,5	
0201	2701	235	0101	0103	<b>18,4</b>		
OUTROS					11,9	14,7	10,3

Apenas haplótipos com frequência de no mínimo 5% em pelo menos uma população, a soma da frequência dos demais haplótipos está na linha OUTROS.

GRC – Guarani M'byá; KRC – Kaingang de Rio das Cobras; KIV – Kaingang de Ivaí.

■ Haplótipo mais frequente.

**TABELA 55.** Frequências haplotípicas (%) para os locos *LMP2*, *D6S2874* (*TAPICA*), *TAP1*, *LMP7* e *TAP2* nas populações indígenas do estado do Paraná.

<i>LMP2</i>	<i>D6S2874</i>	<i>TAP1</i>	<i>LMP7</i>	<i>TAP2</i>	GRC	KRC	KIV
<i>H</i>	193	0101	<i>A</i>	<i>D</i>		12,5	19,0
<i>R</i>	191	0101	<i>B</i>	0101	9,3	21,7	<b>23,3</b>
<i>R</i>	191	0101	<i>B</i>	0201		10,7	2,7
<i>R</i>	193	0101	<i>A</i>	0101	12,3	19,7	22,7
<i>R</i>	193	0101	<i>A</i>	0201	10,6	5,8	4,8
<i>R</i>	201	0201	<i>B</i>	0102	27,9		
<i>R</i>	201	0201	<i>B</i>	0201	<b>29,5</b>	<b>21,8</b>	20,5
OUTROS					10,4	7,8	7,0

Apenas haplótipos com frequência de no mínimo 5% em pelo menos uma população, a soma da frequência dos demais haplótipos está na linha OUTROS.

GRC – Guarani M'byá; KRC – Kaingang de Rio das Cobras; KIV – Kaingang de Ivaí.

■ Haplótipo mais frequente.

**TABELA 56.** Frequências haplotípicas (%) para os locos *D6S2876* (*G51152*), *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1* e *HLA-DRB1* nas populações deste trabalho.

<i>D6S2876</i>	<i>HLA-DQB1</i>	<i>HLA-DQA1</i>	<i>HLA-DRB1</i>	GRC	GKW	GND	KRC	KIV
215	0301	0501	1402	1,1	20,8	19,3	4,1	0,4
215	0301	0501	1413	15,2	0,3	0,6		
215	0301	0501	1602	<b>36,4</b>	<b>33,7</b>	<b>29,5</b>	16,5	9,8
215	0303	03	09012	2,7	9,0	4,8		0,4
223	0302	03	0404		0,3		15,9	29,9
223	0302	03	0407		7,1	0,6		
223	0302	03	0411	25,5	4,2	7,8	1,2	0,4
223	0402	0401	0802	2,7	6,1	8,4	<b>52,4</b>	<b>50,4</b>
223	0402	0401	0804	8,1		4,2		
223	0402	0401	0807	2,2	11,2	6,6		
OUTROS				6,1	7,3	18,2	9,9	8,7

Apenas haplótipos com frequência de no mínimo 5% em pelo menos uma população, a soma da frequência dos demais haplótipos está na linha OUTROS.

GRC – Guarani M'byá; GKW – Guarani Kaiowá; GND – Guarani Nãndeva; KRC – Kaingang de Rio das Cobras; KIV – Kaingang de Ivaí.

■ Haplótipo mais frequente.

**TABELA 57.** Frequências haplotípicas (%) para os locos *STR\_MICA*, *HLA-B*, *HLABC-2CA*, *HLA-C*, *D6S265*, *HLA-A* e *D6S2972* (*MOGCA*) nas populações deste trabalho.

<i>STR_MICA</i>	<i>HLA-B</i>	<i>HLABC-2CA</i>	<i>HLA-C</i>	<i>D6S265</i>	<i>HLA-A</i>	<i>D6S2972</i>	GRC	GKW	GND	KRC	KIV
A5	15	117	3	184	2	132			5,1		
A5	40	111	3	184	2	146	10,5	8,5	6,9		
A5	40	111	3	186	28	122	22,5	0,3			0,4
A5	51	111	3	182	31	150				8,3	16,5
A5	51	125	1	184	2	132				9,2	5,2
A5	53G	91	b	186	31	148	7,2				
A5	62	117	3	184	2	132	<b>23,9</b>				
A9	35	111	3	184	2	148		7,6	1,3		
A9	35	111	3	186	28	122	9,7		1,9		
A9	35	123	4	190	31	136			3,2	<b>15,6</b>	8,9
A9	35	125	4	184	24	148				5,0	3,6
A9	35	129	4	186	28	122		5,3			
A9	39	109	7	182	31	150		<b>22,9</b>	<b>7,9</b>	1,8	1,4
A9	39	109	7	184	2	132		0,3		5,5	3,6
A9	39	109	7	186	31	134		5,4	2,9	11,1	12,4
A10	35	125	4	186	31	134				9,1	<b>20,2</b>
<i>OUTROS</i>							26,2	49,7	70,8	34,4	27,8

Apenas haplótipos com frequência de no mínimo 5% em pelo menos uma população, a soma da frequência dos demais haplótipos está na linha OUTROS.

GRC – Guarani M'byá; GKW – Guarani Kaiowá; GND – Guarani Ñandeva; KRC – Kaingang de Rio das Cobras; KIV – Kaingang de Ivaí.

■ Haplótipo mais freqüente.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

As frequências alélicas e genotípicas obtidas mostram uma tendência interessante: os microssatélites da região de classe I são mais polimórficos que os demais. Isto é representado por um maior número de alelos, uma maior heterozigosidade e maior diversidade gênica, além de muitos locos desta região terem alelos e genótipos com frequências relativamente baixas e nenhum alelo com frequência muito elevada.

O microssatélite mais polimórfico foi o *HLABC-2CA*, que teve a maior diversidade gênica (89%, em Guarani Ñandeva, ver item 5.1). Este loco teve também o maior número de alelos (18) no conjunto das populações, sendo que nos Guarani M'byá, nos quais foram observados 9 alelos de *HLABC-2CA*, outro loco apresentou o mesmo número de alelos, *D6S105*. A heterozigosidade observada chegou a 90,4% para *HLABC-2CA* em Guarani Ñandeva, apenas mais baixa que a heterozigosidade do loco *D6S276* nos Guarani M'byá, que foi de 92,4%. O único alelo com frequência acima de 40% foi o *HLABC-2CA\*111* em Guarani M'byá e o único genótipo com frequência acima de 30% foi *HLABC-2CA\*111/117*, também em Guarani M'byá, enfatizando o alto grau de polimorfismo deste loco. Vale ressaltar que para este loco foi observado desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para duas amostras, Kaingang do Ivaí ( $p < 10^{-6}$ ) e Guarani Kaiowá ( $p = 0,0095$ ). Em nenhum dos casos há genótipos específicos com desvio maior, ou seja, os desvios estão distribuídos entre os genótipos. Porém, nos dois casos, a diversidade gênica foi maior que a heterozigosidade observada, indicando um excesso de homozigotos. Esse excesso é altamente significativo no caso dos Kaingang de Ivaí ( $p = 0,00004$ ). O fato do excesso de homozigotos não ser significativo para Guarani Kaiowá e do valor de  $p$  para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg estar muito próximo a 0,01 podem estar indicando que esta população está em equilíbrio e a significância pode ter sido consequência de erro do tipo I. Foram feitos muitos testes estatísticos e não foi feita nenhuma correção dos valores de  $p$ , por isso, esses valores devem ser avaliados com cautela.

O microssatélite com menor grau de polimorfismo foi o *D6S2876* (*G51152*), para o qual a diversidade gênica foi de apenas 27% para Kaingang de Ivaí. Este loco

apresentou apenas 2 alelos nos Kaingang de Rio das Cobras. O número máximo de alelos observado por amostra foi 4, totalizando 6 alelos em todas as amostras. A maior heterozigosidade para este loco foi de 59,8% em Guarani M'byá. O alelo mais freqüente (*D6S2876\*223* em Kaingang do Ivaí) apresenta a freqüência de 83,8% e o genótipo mais freqüente (*D6S2876\*223/223*, também em Kaingang do Ivaí), 70%.

Foi relatado em estudo anterior que marcadores próximos aos genes *HLA* clássicos têm maior heterozigosidade, principalmente aqueles próximos a *HLA-B* (MALKKI *et al.*, 2005). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os desse estudo, pois foram observadas altas heterozigosidade nos locos *HLABC-2CA*, *D6S265* e *D6S2972* (*MOGCA*). Porém, o loco *D6S2876* (*G51152*), que no presente trabalho teve uma heterozigosidade baixa, está localizado próximo aos genes clássicos *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1* e *HLA-DRB1*. Este loco pode ser uma exceção e outros microssatélites desta região devem ser estudados para se entender melhor a distribuição da diversidade ao longo do MHC e próximo aos genes *HLA* clássicos. Ou então, nos indígenas, pode haver uma diferença na taxa evolutiva dos locos das diferentes classes, com uma evolução mais rápida na região de classe I, aumentando sua diversidade.

Entre as populações, a que parece ter maior diversidade é a dos Guarani Ñandeva. Apesar de ser a amostra com menor número de indivíduos, foi para ela que foi observado o maior número de alelos (15 para *HLABC-2CA*) e a maior diversidade gênica (89%, também para *HLABC-2CA*). Além disso, esta amostra apresentou o maior número de alelos em 10 dos 14 locos estudados (ainda que em 5 desses apresente número igual ao de outras amostras). Dentre os microssatélites analisados, os únicos casos em que esta população não aparece com o maior valor em pelo menos um dos parâmetros de diversidade analisados (número de alelos, diversidade gênica e heterozigosidade) são para *D6S2874* (*TAP1CA*), *D6S2749* (*RING3CA*) e *D6S105*. Esta alta diversidade deve estar relacionada com o alto fluxo gênico com populações não indígenas observado nos Guarani Ñandeva, estimado em 14% para genes *HLA* de classe II (TSUNETO *et al.*, 2003).

É importante destacar que para esta população (Guarani Ñandeva) foram observados dois casos de desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, nos locos *D6S265* e *D6S273*. Deve-se levar em consideração os valores de *p* destes desvios, que em ambos os casos estão acima de 1% (0,02518 e 0,01195; respectivamente). Como já foi dito, foram feitos vários testes e não foi feita nenhuma correção para os valores de *p*. Portanto, pode estar ocorrendo erro do tipo I e estes desvios podem ter sido

observados ao acaso. Com esses valores de  $p$ , o desvio desapareceria com a correção. Isto também vale para o desvio observado em Guarani Kaiowá para o loco *D6S439*, para o qual o valor de  $p$  já está bem próximo de 5% ( $p=0,04056$ ) e talvez para o desvio observado nesta mesma população para o loco *HLABC-2CA*, discutido acima. Além disso, foram analisadas as freqüências genótípicas observadas e esperadas em cada um desses casos e não foi observado nenhum desvio significativo, o que fortalece a hipótese de estar ocorrendo erro do tipo I.

As comparações entre populações geraram um resultado inesperado. As freqüências diferem significativamente em praticamente todos os casos. As diferenças entre os Kaingang de Ivaí e os Kaingang de Rio das Cobras não haviam sido observadas em outros estudos (GUERRA *et al.*, 1992; PETZL-ERLER *et al.*, 1993). Devido à homogeneidade dessas duas populações, os Kaingang eram considerados um grupo único (PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; SALZANO *et al.*, 1997; WEG-REMERS *et al.*, 1997; FAUCZ *et al.*, 2000; TSUNETO *et al.*, 2003). No presente trabalho, estas populações diferiram significativamente em 13 dos 14 locos estudados, não diferindo significativamente apenas para *D6S2874 (TAPICA)*. Porém, as diferenças encontradas nem sempre devem ser verdadeiras. Foram feitos muitos testes estatísticos e não foi feita nenhuma correção dos valores de  $p$ , por isso, os valores de  $p$  devem ser analisados com cautela. De qualquer maneira, em três casos os valores de  $p$  foram menores que  $10^{-6}$ . Portanto, pelo menos para alguns locos, existe diferença entre estas populações. Esta diferença pode resultar da deriva genética. Outra possibilidade seria o fluxo gênico com populações não indígenas, que pode ter sido diferente nas duas populações, levando a uma diferenciação nas freqüências alélicas. Uma evidência disto seria o alelo *STR\_MICA\*A5.1*, que pelas freqüências (item 5.1.3) parece não ser de origem indígena e aparece nas populações deste trabalho principalmente com alelos não indígenas de *HLA-B*, como *B\*07* e *B\*13*, fortalecendo a hipótese de que entrou nas populações indígenas por fluxo gênico. Este alelo aparece apenas nos Kaingang de Rio das Cobras e não aparece nos Kaingang de Ivaí, podendo ser reflexo de um fluxo gênico diferente nas duas populações. Outros fatores, como seleção natural e a elevada taxa de mutação dos microssatélites, ainda poderiam explicar as diferenças entre as populações de Kaingang, mas são improváveis, pois estas populações são evolutivamente próximas, encontram-se geograficamente próximas e há fluxo gênico entre elas.

Para os Guarani do Mato Grosso do Sul (GND e GKW) já se esperava encontrar diferenças, porém, devido a sua ancestralidade comum, divergência recente e

proximidade geográfica e cultural, também se esperava encontrar semelhança em pelo menos alguns locos. Para oito dos 14 microssatélites analisados, o valor de  $p$  na comparação entre estas duas populações foi menor que  $10^{-6}$ , principalmente em locos da região de classe I. Para os microssatélites *D6S291*, *D6S2876 (G55152)* e *TNFd* a diferença não foi significativa. E para os locos *D6S2749 (RING3CA)* e *D6S273* o valor de  $p$  foi maior que 0,01, podendo indicar diferença, mas também podendo ser reflexo de erros do tipo I.

Esta maior diferenciação na região de classe I pode estar refletindo uma evolução mais rápida de genes neste segmento, como *HLA-B*, o que levaria a uma diferenciação mais rápida entre populações. A maior diferenciação na região de classe I não foi exclusiva dos Guarani do Mato Grosso do Sul, sendo que os locos de classe I diferiram mais entre todas as populações, apresentando inclusive diferenças mais significativas, o que fortalece a hipótese de uma evolução mais rápida nesta região.

Para alguns locos, a diferença não foi significativa em outras comparações. Para o loco *D6S2876 (G51152)*, as três populações de Guarani tiveram frequências semelhantes. Para *TNFd*, além da semelhança entre os Guarani do Mato Grosso do Sul (GKW e GND) também houve semelhança entre as frequências dos Guarani M'byá e dos Guarani Ñandeva. Estas semelhanças podem existir pelo fato de estas populações terem divergido mais recentemente e por um possível fluxo gênico entre elas.

Para dois locos, *D6S291* e *D6S265*, não foi observada diferença significativa entre populações Kaingang e populações Guarani. No caso do *D6S291*, as frequências foram semelhantes entre Guarani M'byá e Kaingang de Ivaí e o valor de  $p$  ficou próximo a 0,05 na comparação entre Guarani Kaiowá e Kaingang de Rio das Cobras. Já para o loco *D6S265*, não foi observada diferença entre as frequências de Guarani Ñandeva e Kaingang de Rio das Cobras. Nestes casos, as frequências alélicas podem ter se aproximado por deriva genética, ou estes valores de  $p$  podem refletir erros decorrentes do número de comparações feitas.

Nas comparações com a população de Curitiba, as diferenças foram significativas em todos os casos. Isto já era esperado e diferenças como estas já haviam sido observadas para outros locos do MHC. Populações urbanas refletem a mistura de várias populações e, geralmente, apresentam uma diversidade bem maior em relação a populações isoladas, como os Ameríndios deste trabalho. Esta maior diversidade da população de Curitiba pode ser observada nas frequências alélicas, com um maior número de alelos em frequências mais baixas.

Nas comparações com frequências alélicas de populações encontradas na literatura, as diferenças foram sempre significativas. Porém, para o microsatélite *STR\_MICA*, para o qual foi possível a comparação com outras populações ameríndias, o valor de  $p$  ficou muito próximo de 5% na comparação entre Wichi e Guarani Ñandeva e foi maior que  $10^{-3}$  nas comparações entre Terena e Guarani Ñandeva, Toba e Guarani M'byá e Toba e Guarani Ñandeva. Os Wichi e Toba são da Argentina, já os Terena são do Mato Grosso do Sul (FERNANDEZ-VINA *et al.*, 1997; LAZARO *et al.*, 1999). Estas possíveis semelhanças entre as frequências alélicas podem ser resultado da origem comum destas populações associada a fluxo gênico e deriva genética. Em um estudo de genes *HLA* de classe II, foi construído um dendrograma no qual as populações de Toba, Wichi e Terena ficaram mais próximas aos Kaingang em comparação aos Guarani (TSUNETO *et al.*, 2003). Esta diferença na proximidade de populações quanto a genes da região de classe I (*MICA*) e de classe II indica que as semelhanças podem ser devidas a deriva genética.

Algumas frequências alélicas chamam atenção e podem estar indicando fluxo gênico entre as populações. Um exemplo é o alelo *D6S439\*278*, que aparece com uma frequência alta em Guarani M'byá e com frequências baixas em Guarani Ñandeva e em Kaingang de Rio das Cobras. Este alelo pode ter surgido nos Guarani M'byá e ter passado para as outras duas populações por fluxo gênico. Outra possibilidade seria este alelo estar presente na população ancestral das populações de Guarani deste estudo e ter sido perdido, ou ter tido a frequência diminuída em todas menos nos Guarani M'byá e ter entrado na população Kaingang por fluxo gênico. Além disso, pode ser que este alelo tenha surgido separadamente nas três populações em que ele ocorre. Para avaliar estas hipóteses foi verificado em que haplótipos *HLA-DQB1-HLA-DQA1-HLA-DRB1* este alelo aparece em cada população. Foi verificado que em cada população o alelo *D6S439\*278* aparece em uma combinação haplotípica diferente. Esta observação descarta a hipótese de fluxo gênico e deixa mais plausível a idéia do alelo estar na presente na população ancestral asiática ou então ter surgido mais de uma vez em diferentes haplótipos.

Outros exemplos de possíveis casos de fluxo gênico são os alelos *D6S276\*147*, que tem frequência alta em Guarani M'byá, baixa nas outras populações de Guarani e não ocorre nos Kaingang e *D6S273\*147*, que tem frequência alta nos Guarani e baixa nos Kaingang. Nestes casos também foram analisados haplótipos. Para o microsatélite *D6S276*, os haplótipos de *HLA-B-HLA-C-HLA-A* observados com o alelo *D6S276\*147*



são diferentes entre as populações, diferindo inclusive quanto ao alelo *HLA-A*, que é o loco mais próximo ao microssatélite. Já o alelo *D6S273\*147* ocorre em muitas combinações haplotípicas *HLA-DQB1-HLA-DQA1-HLA-DRB1* diferentes. Neste caso, o loco mais próximo é o *HLA-DRB1*, que tem muitos alelos. Portanto, fica difícil concluir sobre a ocorrência de ou não de fluxo gênico.

Pela comparação com a população de Curitiba é possível fazer inferências sobre fluxo gênico entre indígenas e outras populações brasileiras. É o caso do alelo *D6S2874\*201*, que é muito comum em indígenas, principalmente nos Guarani, e tem frequência de 1,3% na população de Curitiba. Este alelo deve ter entrado na população curitibana por fluxo gênico com populações indígenas. Para confirmar esta hipótese, foram analisados os genótipos dos indivíduos da população de Curitiba que tem o alelo *D6S2874\*201* quanto aos genes *HLA* de classe II. Dos cinco indivíduos analisados, dois possuem haplótipos que são muito frequentes nos Guarani, *DRB1\*1602-DQA1\*0501-DQB1\*0301* e *DRB1\*0411-DQA1\*03-DQB1\*0302* (SOTOMAIOR *et al.*, 1998), porém raros ou inexistentes em populações não-Ameríndias. Os demais apresentam haplótipos comuns em todas as populações. Estes haplótipos não excluem a possibilidade do fluxo gênico, mas não nos permitem afirmar com clareza a origem do alelo nas populações.

Este poderia também ser o caso do alelo *D6S2222\*250*, que é muito comum em Kaingang e em Guarani do Mato Grosso do Sul e tem frequência de 2,1% na população de Curitiba. Este microssatélite está mais próximo dos genes *HLA* de classe I, para os quais foram analisados os genótipos dos indivíduos da população de Curitiba. Dois seis indivíduos analisados, três possuem haplótipos bem comuns entre os indígenas, *HLA-B\*39-HLA-Cw\*07-HLA-A\*31-D6S2222\*250* e *HLA-B\*35-HLA-Cw\*04-HLA-A\*31-D6S2222\*250*. Os demais haplótipos são menos frequentes em Ameríndios e poderiam ser de origem européia. Com isso, parece plausível que o fluxo gênico com Ameríndios tenha contribuído para a frequência do alelo *D6S2222\*250* na população de Curitiba, mas este alelo devia estar presente também na população européia que migrou para o Brasil.

Já para o alelo *D6S2972\*130*, pode ter ocorrido o inverso. Este alelo parece ter sido introduzido nas populações indígenas por fluxo gênico de outras populações. Para confirmação foram analisados os genótipos dos indivíduos para verificação dos haplótipos com genes *HLA* de classe I. Dos cinco indígenas com *D6S2972\*130*, quatro possuem alelos *HLA* não ameríndios, *B\*14*, *Cw\*05* ou *A\*29*. Para o outro indivíduo, a tipagem não está completa, sendo impossível inferir os alelos. Isto é uma forte evidência

de que realmente o alelo *D6S2972\*130* entrou nas populações ameríndias por fluxo gênico. Outro exemplo deste tipo, do alelo *STR\_MICA\*A5.1*, já foi citado acima.

Outro caso interessante é do *STR\_MICA*, para o qual foi observada uma frequência alta do alelo A10 em Kaingang. Além disso, o alelo A10 aparece com uma frequência baixa nos Guarani M'byá, podendo indicar fluxo gênico entre estes Guarani e os Kaingang. Este alelo havia sido observado apenas em chineses, em um único haplótipo com *HLA-B\*5801* (TIAN *et al.*, 2006).

Para inferir a origem deste alelo verificou-se em quais haplótipos *HLA* de classe I este alelo é encontrado. Em Kaingang, foi possível observar que o alelo *STR\_MICA\*A10* ocorre principalmente no haplótipo *STR\_MICA\*A10-B\*35-Cw\*04-A\*31*. Este haplótipo teve uma frequência de 20% em Kaingang de Ivaí e de 10% em Kaingang de Rio das Cobras. Os demais haplótipos que continham o alelo *STR\_MICA\*A10* apareceram com frequências muito baixas. Como não conhecemos a fase dos alelos nos indivíduos e o método para cálculo das frequências haplotípicas pode gerar haplótipos que não ocorrem, estes haplótipos com frequências muito baixas não necessariamente são os haplótipos reais nos indivíduos. Por isso, foi feita uma inferência do haplótipo de cada indivíduo, baseando-se nos genótipos e nos haplótipos ameríndios conhecidos para os genes *HLA* de classe I (PARHAM *et al.*, 1997). Esta inferência gerou um total de 83 haplótipos com o alelo *STR\_MICA\*A10*. Destes, apenas 10 não eram *STR\_MICA\*A10-B\*35-Cw\*04-A\*31*. Além disso, foram inferidos os haplótipos de todos os indivíduos com os alelos *B\*35*, *Cw\*04* e *A\*31*. Com esta inferência, observou-se que dos 148 haplótipos *B\*35-Cw\*04-A\*31*, 73 também tinham o alelo *STR\_MICA\*A10*, 66 o alelo *STR\_MICA\*A9*, 3 o alelo *STR\_MICA\*A5* e em 6 casos não foi possível determinar o alelo do microssatélite. É interessante observar que nos Guarani o haplótipo *B\*35-Cw\*04-A\*31* é raro, ocorrendo sempre com o alelo *STR\_MICA\*A9*. O único indivíduo Guarani que possui o alelo *STR\_MICA\*A10* não possui a tipagem para os genes *HLA* de classe I, não sendo possível saber seu haplótipo. Porém, este indivíduo possui alelos em outros locos que parecem confirmar a origem Kaingang do *STR\_MICA\*A10*, como, por exemplo, o alelo *BF\*S05*, que é ameríndio e mais comum em Kaingang (GUERRA *et al.*, 1992; WEG-REMERS *et al.*, 1997) e o alelo *DRB1\*0802*, para o qual o indivíduo é homocigoto, que também possui frequência muito mais elevada em Kaingang, porém baixa em Guarani (TSUNETO *et al.*, 2003).

Em estudo anterior (PARHAM *et al.*, 1997), foi verificado que, nas mesmas populações indígenas analisadas no presente trabalho, o haplótipo *B\*35-Cw\*04-A\*31*

pode conter dois alelos de *HLA-B*, *B\*3501* ou *B\*3505*. O alelo *B\*3505* surgiu na América do Sul, provavelmente a partir de um evento de conversão gênica, tendo como alelo receptor *B\*3501*, que é considerado um dos alelos fundadores, já presente na população Asiática que migrou para as Américas (PARHAM *et al.*, 1997). Dos indivíduos que possuem o alelo *STR\_MICA\*A10*, três tiveram seus alelos de *HLA-B* sequenciados e são *B\*3505*. Por isso, é plausível admitir que este seja o alelo presente nos demais indivíduos *STR\_MICA\*A10-B\*35-Cw\*04-A\*31*. Com isso, propomos a seguinte hipótese: o alelo *STR\_MICA\*A10* surgiu em algum indivíduo com o haplótipo *B\*3505-Cw\*04-A\*31*, em um momento em que o alelo *B\*3505* era raro. Quando o alelo *B\*3505* aumentou sua frequência na população, possivelmente por seleção natural, a frequência do alelo *STR\_MICA\*A10* também aumentou pelo chamado efeito carona, no qual um alelo é selecionado indiretamente por estar em desequilíbrio de ligação com outro. Está sendo proposto que o alelo *B\*3505* aumentou de frequência por seleção natural, pois há forte evidência de seleção natural balanceadora nos genes *HLA* (ver item 2.2.2) e este tipo de seleção pode levar ao aumento da frequência de alelos raros, que seria do *B\*3505* no momento de seu surgimento. Porém, este aumento de frequência do haplótipo *B\*3505-STR\_MICA\*A10* pode ter ocorrido por outros motivos, como deriva genética, migração, efeito fundador ou até seleção natural direcional. Para explicar as frequências dos alelos *HLA* nos ameríndios foi proposta a hipótese do *turnover* de alelos (BELICH *et al.*, 1992; PARHAM *et al.*, 1997), que propõe a ocorrência conjunta de seleção natural balanceadora e deriva genética.

O gene *MICA* realmente está em forte desequilíbrio de ligação com *HLA-B* em várias populações (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999; ROMPHRUK *et al.*, 2001; TIAN *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2006; GRUBIC *et al.*, 2006; TIAN *et al.*, 2006; e neste estudo, Figuras 26 a 30). Além disso, os indivíduos que possuem o haplótipo *B\*35-Cw\*04-A\*31* e não têm o alelo *STR\_MICA\*A10*, têm, na sua maioria, o alelo *STR\_MICA\*A9*. Isso significa que, provavelmente, o indivíduo no qual surgiu o alelo *STR\_MICA\*A10* deveria ter o haplótipo *STR\_MICA\*A9-B\*3505-Cw\*04-A\*31*, sendo necessário o acréscimo de apenas uma repetição para o surgimento do alelo *STR\_MICA\*A10*, mutação relativamente frequente entre os microssatélites, com taxa variando entre  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  por *locus* por geração (CULLEN *et al.*, 2003).

É possível também que a seleção tenha atuado favorecendo indivíduos com o alelo *STR\_MICA\*A10* e que o alelo *B\*3505* é que tenha aumentado de frequência por efeito carona. Porém, esta hipótese é menos verossímil pela forte evidência de seleção

nos genes *HLA* e pelo padrão de diversidade do gene *MICA*, que não é indicativo de seleção neste loco.

Os dez haplótipos que têm o alelo *STR\_MICA\*A10* e não são *B\*35-Cw\*04-A\*31* podem estar refletindo erros na metodologia utilizada para tipagem ou na interpretação dos resultados, tanto de *STR\_MICA*, quanto de *HLA*, ou eventos de recombinação entre os locos *MICA* e *HLA-B*. Dos dez haplótipos, oito ocorreram em indivíduos homozigotos para *STR\_MICA\*A10*. Uma possível explicação seria a presença da deleção do gene *MICA* (KOMATSU-WAKUI *et al.*, 1999). Esta deleção foi encontrada em alta frequência em uma população Ameríndia e também em populações asiáticas (AIDA *et al.*, 2002; KOMATSU-WAKUI *et al.*, 2001; TIAN *et al.*, 2006), normalmente com o alelo *HLA-B\*4801*, tendo sido sugerido que este haplótipo é mantido por seleção natural (TIAN *et al.*, 2006). Esta deleção também foi observada com *B\*48* nas populações dos Guarani do Mato Grosso do Sul estudadas no presente trabalho (ALBERT *et al.*, no prelo). A presença desta deleção explicaria, no mínimo, 3 dos 10 haplótipos que supostamente portariam o alelo *STR\_MICA\*A10*, mas que não são *B\*35-Cw\*04-A\*31*. Estes indivíduos foram genotipados como *STR\_MICA\*A10/A10-B\*35/48-Cw\*04/08-A\*31/31*, mas na verdade eles seriam *STR\_MICA\*A10/nulo-B\*35/48-Cw\*04/08-A\*31/31*.

## 6.2 DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES

Como era esperado, as maiores distâncias genéticas interpopulacionais, calculadas em uma análise conjunta de todos os microssatélites (exceto *D6S2876*), foram observadas com relação à população de Curitiba (ver item 5.2). Porém, as distâncias entre os Guarani M'byá e os dois grupos de Kaingang (KRC e KIV) foram maiores que as distâncias entre os Guarani Ñandeva e a população de Curitiba e foram muito próximas a distância entre Kaingang de Rio das Cobras e a população de Curitiba. Isto mostra que realmente as populações de Guarani M'byá e de Kaingang são muito distintas geneticamente, apesar de viverem lado a lado (PETZL-ERLER *et al.*, 1993). Além disso, os Guarani Ñandeva são os que apresentaram maior grau de fluxo gênico com populações não Ameríndias (TSUNETO *et al.*, 2003), o que talvez explique sua menor distância em relação à população de Curitiba.

A menor distância foi entre os dois grupos Kaingang (Tabela 66). Apesar das diferenças nas frequências alélicas, as distâncias genéticas realmente confirmam a

grande proximidade genética entre estas populações, que havia sido observada anteriormente (GUERRA *et al.*, 1992; PETZL-ERLER *et al.*, 1993; PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; SALZANO *et al.*, 1997; WEG-REMERS *et al.*, 1997; FAUCZ *et al.*, 2000; TSUNETO *et al.*, 2003). Outra distância muito pequena foi observada entre os grupos Guarani do Mato Grosso do Sul, Nandeva e Kaiowá. Esta proximidade era esperada por serem populações que são evolutivamente próximas e que tem grande proximidade geográfica e cultural, possibilitando fluxo gênico. A proximidade genética entre estas populações já havia sido observada em um estudo de genes *HLA* de classe II (TSUNETO *et al.*, 2003).

### 6.3 HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O desequilíbrio de ligação (ver item 5.3) mais acentuado nos indígenas em relação a população de Curitiba era esperado, pois é provável que as populações ancestrais dos ameríndios tenham passado por um forte efeito fundador durante a migração e a ocupação da América, o que aumenta o desequilíbrio de ligação. Além disso, estas populações são isoladas e devem ter tido tamanho efetivo relativamente pequeno durante sua história evolutiva, sofrendo forte efeito de deriva genética. O desequilíbrio de ligação não tão acentuado nos Guarani Nandeva pode estar refletindo um efeito menos intenso de deriva genética nesta população. Além disso, apesar do fluxo gênico geralmente aumentar o desequilíbrio de ligação, é possível que, neste caso, o fluxo gênico com populações não indígenas (TSUNETO *et al.*, 2003) tenha diminuído o desequilíbrio de ligação dos Guarani Nandeva.

O desequilíbrio de ligação mais acentuado na região do MHC de classe I já havia sido observado em populações de origem européia e africana (STENZEL *et al.*, 2004), com blocos de desequilíbrio menores nas regiões central e centromérica do MHC. Porém, em um outro estudo foi encontrado o padrão inverso (MALKKI *et al.*, 2005). A amostra desse estudo consistia de pacientes e controles em transplantes de tecido hematopoiético. Este padrão diferente de desequilíbrio pode estar relacionado com a ocorrência preferencial de alguns haplótipos nesta amostra, aumentando o desequilíbrio na região centromérica. Algumas associações fortes observadas nesse estudo (MALKKI *et al.*, 2005) também foram observadas no presente trabalho, como é o caso das associações entre o loco *D6S2876* (*G51152*) e os genes *HLA-DQB1* e *DRB1* e entre o loco *D6S265* e o gene *HLA-A*. Estas informações em conjunto parecem mostrar um

desequilíbrio mais pronunciado próximo aos genes *HLA* clássicos, o que poderia indicar co-evolução entre estes genes. Além disso, estes genes possuem evolução rápida, o que também leva a um elevado desequilíbrio de ligação. Novamente (ver item 6.1), uma evolução mais rápida na região de classe I poderia explicar a diferença observada entre as classes no presente trabalho.

Mais de um resultado aponta para uma evolução mais rápida, ou seja, acúmulo mais rápido de mudanças, na região do MHC de classe I em relação às outras regiões. O primeiro é a maior diversidade observada nesta região, com microssatélites mais polimórficos. Além disso, as frequências alélicas dos locos desta região diferem mais entre as populações. Por último, o desequilíbrio de ligação nesta região é mais acentuado, considerando-se a região como um todo. Estes padrões podem ser explicados por seleção natural balanceadora e deriva genética, como foi proposto na hipótese de *turnover* de alelos para os genes *HLA* (BELICH *et al.*, 1992; PARHAM *et al.*, 1997), principalmente *HLA-B*. A diferença dos resultados em relação à região de classe II pode estar relacionada com o fato de que não foram estudados microssatélites localizados entre os genes *HLA* de classe II clássicos, principalmente próximos à *HLA-DRB1*, apenas microssatélites teloméricos a eles. Talvez locos próximos a *HLA-DRB1* tenham características semelhantes aos locos próximos a *HLA-B*, já que estes são os locos *HLA* mais polimórficos (ver item 2.2.2). Porém, mesmo que estes locos fossem estudados e apresentassem alta diversidade, alta diferenciação entre populações e desequilíbrio de ligação intenso, a influência da rápida evolução dos genes *HLA* clássicos parece ser mais forte na região de classe I, pois estas características são observadas em locos espalhados por toda esta região. Isto pode estar relacionado com o fato dos genes *HLA* clássicos de classe I estarem espalhados pela região e os de classe II estarem mais agrupados, não influenciando tanto os locos mais afastados. De qualquer maneira, a rápida evolução dos genes *HLA* de classe I interfere nas características dos microssatélites desta região, aumentando sua diversidade e o desequilíbrio de ligação na região. Estes resultados dão um forte suporte à hipótese do *turnover* (BELICH *et al.*, 1992; PARHAM *et al.*, 1997), apontando para a ocorrência de seleção balanceadora e deriva genética mantendo o polimorfismo dos genes *HLA* e diferenciado as populações.

As frequências haplotípicas (item 5.3) tornam mais evidentes muitas das diferenças genéticas entre as populações já percebidas com as frequências alélicas. Por exemplo, as frequências alélicas do loco *D6S2876 (G51152)* diferiam entre Kaingang e Guarani (item 5.1.1). Porém, os haplótipos deste loco com os genes *HLA* diferem mais

ainda, sendo que o haplótipo mais freqüente de Kaingang tem freqüência relativamente baixa entre os Guarani. Este haplótipo tem o alelo *D6S2876\*223*, que é mais comum em Kaingang, mas isso não é suficiente para explicar esta diferença nas freqüências haplotípicas, já que este mesmo alelo ocorre em um outro haplótipo com uma freqüência alta (25,5%) em Guarani M'byá.

Alguns haplótipos com o loco *D6S2749 (RING3CA)* parecem informar sobre a origem de alelos do microsatélite. Entre os ameríndios, o alelo *D6S2749\*231* só ocorre em Kaingang, em um haplótipo *DPA1-DPBI-DMA-DMB* que é observado com *D6S2749\*229* nos Guarani e também em Kaingang. Isto poderia indicar que o alelo *D6S2749\*231* surgiu nos Kaingang. Porém, este alelo é freqüente na população de Curitiba (item 5.1.1), para a qual não conhecemos o haplótipo. Uma possibilidade é que este alelo exista em um haplótipo diferente na população de Curitiba e que ele tenha surgido independentemente ao menos duas vezes na história das populações humanas. Outra hipótese é que este haplótipo, com o alelo *D6S2749\*231*, seja antigo e esteja presente em populações do mundo todo, mas tenha sido perdido nos Guarani. Para testar estas hipóteses teríamos que conhecer os alelos dos genes *HLA-DP* e *HLA-DM* que estão associados com *D6S2749\*231* na população de Curitiba e em outras populações.

Para o loco *D6S2874 (TAPICA)*, foi encontrada uma associação forte com o gene *TAPI*, o que era esperado, já que este microsatélite está em um íntron deste gene. O alelo *D6S2874\*201* só ocorreu com o alelo *TAPI\*0201*. Este alelo do microsatélite é comum nos ameríndios e raro na população de Curitiba (item 5.1.1) e, por isso, foi levantada a hipótese de fluxo gênico com ameríndios na população de Curitiba (ver item 6.1). O alelo *TAPI\*0201* é encontrado em várias populações (LAJOIE *et al.*, 2003), não exclusivamente nos ameríndios. Portanto, parece mais plausível que a baixa freqüência do alelo *D6S2874\*201* na população de Curitiba seja devida a uma diminuição na freqüência deste alelo, provavelmente por deriva genética. Porém, existe ainda a possibilidade do alelo *TAPI\*0201* ocorrer com outro alelo do microsatélite em outras populações e do alelo *D6S2874\*201* realmente ser exclusivo de Ameríndios.

As freqüências haplotípicas também evidenciam o forte desequilíbrio que ocorre entre os locos *STR\_MICA* e *HLA-B*. Cada alelo de *HLA-B* parece ocorrer com apenas um alelo do microsatélite. Esta observação dá maior força à hipótese de que o alelo *STR\_MICA\*A10* ocorre com o alelo *HLA-B\*3505* e surgiu nesta combinação, aumentando de freqüência por efeito carona (ver item 6.1).

## 7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi encontrado pela primeira vez uma alta frequência do alelo *STR\_MICA\*A10* em uma população. A alta frequência e a aparente associação com *HLA-B\*3505* nos Kaingang indicam o surgimento deste alelo nesta população e seu estabelecimento por efeito indireto da seleção balanceadora dos genes *HLA*.

Este alelo também propiciou um forte indício de fluxo gênico entre os Kaingang e os Guarani M'byá, já que aparece em um indivíduo Guarani que apresenta alelos em outros locos também de origem provavelmente Kaingang. Porém, este fluxo gênico é muito restrito tendo em vista o longo tempo em que estas populações vivem em grande proximidade geográfica. A grande diferença cultural entre estas populações parece mesmo restringir o fluxo gênico, mantendo grandes distâncias genéticas.

Outro caso de fluxo gênico que parece ter ocorrido é entre os ameríndios e populações neo-brasileiras. Isto fica evidenciado nas frequências do alelo *D6S2972\*130*, comum na população de Curitiba e raro nos indígenas, nos quais parece ocorrer sempre com alelos não ameríndios dos genes *HLA*. Porém, este fluxo gênico também parece ter sido reduzido. Exceto nos Guarani Ñandeva, que apresentaram a maior diversidade genética e a menor distância genética em relação a população de Curitiba. Isto se explicaria por um maior fluxo gênico com populações não ameríndias.

O desequilíbrio de ligação parece ser mais intenso próximo aos genes *HLA* clássicos. Isto se justifica pela proximidade física entre os locos, mas pode estar indicando co-evolução entre estes genes. Outra possível explicação é a rápida evolução destes genes, que estaria aumentando o desequilíbrio de ligação com locos ao redor. Além disso, muitas das associações observadas neste estudo parecem ocorrer em outras populações, o que indica que os padrões de desequilíbrio de ligação na região do MHC possivelmente não variam muito entre populações.

A alta diversidade dos locos da região do MHC de classe I, a grande diferenciação entre populações quanto às frequências alélicas destes locos e o forte desequilíbrio de ligação observado entre eles apontam para uma evolução mais rápida desta região cromossômica, devida principalmente à rápida evolução do gene *HLA-B*, com ação de seleção natural balanceadora e deriva genética. Estes dados apóiam a hipótese de *turnover* proposta para os genes *HLA* (BELICH *et al.*, 1992; PARHAM *et al.*, 1997).



## 8 REFERÊNCIAS

- AIDA, K.; RUSSOMANDO, G.; KIKUCHI, M.; CANDIA, N.; FRANCO, L.; ALMIRON, M.; UBALEE, R.; HIRAYAMA, K. High frequency of MIC null haplotype (*HLA-B48-MICA-del-MICB\*0107 N*) in the Angaité Amerindian community in Paraguay. **Immunogenetics**, v.54, pp.439-441, 2002.
- ALBERT, A.; YAO, Z.; CHANDANAYINGYONG, D.; WITTER, K.; VOLGER, A.; PIANCATELLI, D.; Del BEATO, T.; OUMHANI, K.; ADORNO, D.; PETZL-ERLER, M.L.; TSUNETO, L.T.; FAN, L.A.; LAU, M.; MICKELSON, E.; HELMBERG, W. 13<sup>th</sup> IHWS Human MHC Joint Report. MICA report. Em: HLA 2004 Immunobiology of the Human MHC, **Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop and Conference**, editado por J. A. Hansen. IHWG Press, Seattle (in press).
- ALDRICH, C.; WAMBEBE, C.; ODAMA, L.; di RIENZO, A.; OBER, C. Linkage disequilibrium and age estimates of a deletion polymorphism (1597ΔC) in HLA-G suggest non-neutral evolution. **Human Immunology**, v.63, pp.405-412, 2002.
- ASANO, H.; KOBAYASHI, T.; UCHIDA, K.; HAYASHI, S.; YOKOYAMA, I.; INOKO, H.; TAKAGI, H. Significance of tumor necrosis factor microsatellite polymorphism in renal transplantation. **Tissue Antigens**, v.50, pp.484-488, 1997.
- BELICH, M.P.; MADRIGAL, J.A.; HILDEBRAND, W.H.; ZEMMOUR, J.; WILLIAMS, R.C.; LUZ, R.; PETZL-ERLER, M.L.; PARHAM, P. Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. **Nature**, v.357, pp.326-329, 1992.
- BLACK, F.L., SALZANO, F.M. Evidence for heterosis in the HLA system. **American Journal of Human Genetics**, v.33, pp.894-899, 1981.
- BOLOGNESI, E.; D'ALFONSO, S.; ROLANDO, V.; FASANO, M.E.; PRATICÒ, L.; MOMIGLIANO-RICHIARDI, P. MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. **European Journal of Immunogenetics**, v.28, pp.523-530, 2001.
- BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, pp.1866-1871, 1997a.
- BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M. Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World. **American Journal of Human Genetics**, v.61, pp.1413-1423, 1997b.
- BOUISSOU, C.; PONTAROTTI, P.; CROUAU-ROY, B. A precise meiotic map in the class I region of the human major histocompatibility complex. **Genomics**, v.30, pp.486-492, 1995.
- BRAUN-PRADO, K.; MION, A.L.U.; PEREIRA, N.F.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M.L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v.55, pp.417-427, 2000.
- BURT, M.J.; SMIT, D.J.; PYPPE, W.R.; POWELL, L.W.; JAZWINSKA, E.C. A 4.5-megabase YAC contig and physical map over the hemochromatosis gene region. **Genomics**, v.33, pp.153-158, 1996.

- CADAVID, L.F.; WATKINS, D.I. Heirs of the jaguar and the anaconda: HLA, conquest and disease in the indigenous populations of the Americas. **Tissue Antigens**, v.50, pp.209-218, 1997.
- CAMASCHELLA, C.; ROETTO, A.; GASPARINI, P.; PIPERNO, A.; FORTINA, P.; SURREY, S.; RAPPAPORT, E. Allelic association of microsatellites of 6p in Italian hemochromatosis patients. **Human Genetics**, v.97, pp.476-481, 1996.
- CARRINGTON, M.; WADE, J. Selection of transplant donors based on MHC microsatellite data. **Human Immunology**, v.50, pp.151-154, 1996.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. **Genes, Povos e Línguas**. São Paulo: Companhia das Letras, 2003.
- CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **Evolution**, v.32, pp.550-570, 1967.
- CAVET, J.; MIDDLETON, P.G.; SEGALL, M.; NOREEN, H.; DAVIES, S.M.; DICKINSON, A.M. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. **Blood**, v.94, pp.3941-3946, 1999.
- CHEONG, K.Y.; ALLCOCK, R.J.; EERLIGH, P.; WITT, C.S.; CHRISTIANSEN, F.T.; MCCANN, V.; PRICE, P. Localization of central MHC genes influencing type I diabetes. **Human Immunology**, v.62, pp.1363-1370, 2001.
- CHOI, H.B.; HAN, H.; YOUN, J.I.; KIM, T.Y.; KIM, T.G. MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. **Tissue Antigens**, v.56, pp.548-550, 2000.
- CHUNG-JI, L.; YANN-JINN, L.; HSIN-FU, L.; CHING-WEN, D.; CHE-SHOA, C.; YI-SHING, L.; KUO-WEI, C. The increase in the frequency of MICA gene A6 allele in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.31, pp.323-328, 2002.
- COLLINS-SCHRAMM, H.E.; PHILLIPS, C.M.; OPERARIO, D.J.; LEE, J.S.; WEBER, J.L.; HANSON, R.L.; KNOWLER, W.C.; COOPER, R.; LI, H.; SELDIN, M.F. Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture linkage disequilibrium. **American Journal of Human Genetics**, v.70, pp.737-750, 2002.
- CULLEN, M.; NOBLE, J.; ERLICH, H.; THORPE, K.; BECK, S.; KLITZ, W.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Characterization of recombination in the HLA class II region. **American Journal of Human Genetics**, v.60, pp.397-407, 1997.
- CULLEN, M.; MALASKY, M.; HARDING, A.; CARRINGTON, M. High-density map of short tandem repeats across the human major histocompatibility complex. **Immunogenetics**, v.54, pp.900-910, 2003.
- DUGOUJON, J.M.; MOURRIERAS, B.; SENEGAS, M.T.; GUITARD, E.; SEVIN, A.; BOIS, E.; HAZOUT, S. Human genetic diversity (immunoglobulin GM allotypes), linguistic data, and migrations of Amerindian tribes. **Human Biology**, v.67, pp.231-249, 1995.

- EBERS, G.C.; KUKAY, K.; BULMAN, D.E.; SADOVNICK, A.D.; RICE, G.; ANDERSON, C.; ARMSTRONG, H.; COUSIN, K.; BELL, R.B.; HADER, W.; PATY, D.W.; HASHIMOTO, S.; OGER, J.; DUQUETTE, P.; WARREN, S.; GRAY, T.; O'CONNOR, P.; NATH, A.; AUTY, A.; METZ, L.; FRANCIS, G.; PAULSETH, J.E.; MURRAY, T.J.; PRYSE-PHILLIPS, W.; NELSON, R.; FREEDMAN, M.; BRUNET, D.; BOUCHARD, J.P.; HINDS, D.; RISCH, N. A full genome search in multiple sclerosis. **Nature Genetics**, v.13, pp.472-476, 1996.
- EXCOFFIER; LAVAL, L.G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, pp.47-50, 2005.
- FAUCZ, F.R.; PROBST, C.M.; PETZL-ERLER, M.L. Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. **European Journal of Immunogenetics**, v.27, pp.5-16, 2000.
- FDEZ-MORERA, J.L.; RODRIGO, L.; LÓPEZ-VÁZQUEZ, A.; RODERO, S.R.; MARTÍNEZ-BORRA, J.; NIÑO, P.; GONZÁLEZ, S.; LÓPEZ-LARREA, C. MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. **Human Immunology**, v.64, pp.816-822, 2003.
- FEICHTLBAUER, P.; GOMOLKA, M.; BRÜNNLER, G.; EISENHUT, T.; TRUCKENBRODT, H.; ALBERT, E.D. HLA region microsatellite polymorphisms in juvenile arthritis. **Tissue Antigens**, v.52, pp.220-229, 1998.
- FELSENSTEIN, J. **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Programa distribuído pelo autor. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2004.
- FENG, M.L.; GUO, X.J.; ZHANG, J.Y.; XIE, J.H.; CHEN, L.; LU, Q.; YANG, J.H.; JI, Y.; QIAN, K.C. Study on the haplotypes of MICA and MICB microsatellite and HLA-B locus in the Guangzhou Han population. **Tissue Antigens**, v.64, pp.281-285, 2004.
- FERNANDEZ, L.; FERNANDEZ-ARQUERO, M.; GUAL, L.; LAZARO, F.; MALUENDA, C.; POLANCO, I.; FIGUEREDO, M.A.; GOMEZ de la CONCHA, E. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene in celiac disease. **Tissue Antigens**, v.59, pp.219-222, 2002.
- FERNANDEZ-VINA, M.A.; LAZARO, A.M.; MARCOS, C.Y.; NULF, C.; RAIMONDI, E.; HAAS, E.J.; STASTNY, P. Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II loci of the HLA region in South American Indian tribes. **Tissue Antigens**, v.50, pp.233-250, 1997.
- FOISSAC, A.; CROUAU-ROY, B.; FAURÈ, S.; THOMSEN, M.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: an overview. **Tissue Antigens**, v.49, pp.197-214, 1997.
- FOISSAC, A.; SALHI, M.; CAMBON-THOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: 1999 update. **Tissue Antigens**, v.55, pp.477-509, 2000.
- FUSELLI, S.; TARAZONA-SANTOS, E.; DUPANLOUP, I.; SOTO, A.; LUISELLI, D.; PETTENER, D. Mitochondrial DNA diversity in South America and the genetic history of Andean Highlanders. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, pp. 1682-1691, 2003.

- GAMBELUNGHE, G.; FALORNI, A.; GHADERI, M.; LAURETI, S.; TORTOIOLI, C.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P.; SANJEEVI, C.B. Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84, pp.3701-3707, 1999.
- GAMBELUNGHE, G.; GHADERI, M.; COSENTINO, A.; FALORNI, A.; BRUNETTI, P.; FALORNI, A.; SANJEEVI, C.B. Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes. **Diabetologia**, v.43, pp.507-514, 2000.
- GAO, X.; SINGLE, R.M.; KARACKI, P.; MARTI, D.; O'BRIEN, S.J.; CARRINGTON, M. Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two North American populations. **Human Immunology**, v.67, pp.152-158, 2006.
- GHADERI, M.; HJELMSTRÖM, P.; HALLMANS, G.; WIKLUND, F.; LENNER, P.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C.B. MICA gene polymorphism and the risk to develop cervical intraepithelial neoplasia. **Human Immunology**, v.60, pp.970-973, 1999.
- GHADERI, M.; NIKITINA ZAKE, L.; WALLIN, K.; WIKLUND, F.; HALLMANS, G.; LENNER, P.; DILLNER, J.; SANJEEVI, C.B. Tumor necrosis factor A and MHC class I chain related gene A (MIC-A) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. **Human Immunology**, v.62, pp.1153-1158, 2001.
- GONZALEZ, S.; BRAUTBAR, C.; MARTINEZ-BORRA, J.; LOPEZ-VAZQUEZ, A.; SEGAL, R.; BLANCO-GELAZ, M.A.; ENK, C.D.; SAFRIMAN, C.; LOPEZ-LARREA, C. Polymorphism in MICA rather than HLA-B/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. **Human Immunology**, v.62, pp.632-638, 2001.
- GONZALEZ-ESCRIBANO, M.F.; RODRIGUEZ, M.R.; AGUILAR, F.; ALVAREZ, A.; SANCHEZ-ROMAN, J.; NUNEZ-ROLDAN, A. Lack of association of MICA transmembrane region polymorphism and Behçet's disease in Spain. **Tissue Antigens**, v.54, pp.278-281, 1999.
- GONZALEZ-JOSE, R.; DAHINTEN, S.L.; LUIS, M.A.; HERNANDEZ, M.; PUCCIARELLI, H.M. Craniometric variation and the settlement of the Americas: testing hypotheses by means of R-matrix and matrix correlation analyses. **American Journal of Physical Anthropology**, v.116, pp.154-165, 2001.
- GONZALEZ-JOSE, R.; NEVES, W.; LAHR, M.M.; GONZALEZ, S.; PUCCIARELLI, H.; HERNANDEZ MARTINEZ, M.; CORREAL, G. Late Pleistocene/Holocene craniofacial morphology in Mesoamerican Paleoindians: implications for the peopling of the New World. **American Journal of Physical Anthropology**, v.128, pp.772-780, 2005.
- GOTO, K.; OTA, M.; MAKSYMOWYCH, W.P.; MIZUKI, N.; YABUKI, K.; KATSUYAMA, Y.; KIMURA, M.; INOKO, H.; OHNO, S. Association between MICA gene A4 allele and acute anterior uveitis in white patients with and without HLA-B27. **American Journal of Ophthalmology**, v.126, pp.436-441, 1998.
- 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**, v.64, pp.543-555, 2004.

- GRUBIC, Z.; PERIC, P.; EEEUK-JELICIC, E.; ZUNEC, R.; STINGL, K.; CURKOVIC, B.; KERHIN-BRKLJACIC, V. The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population. **European Journal of Immunogenetics**, v.31, pp.93-98, 2004.
- GRUBIC, Z.; STINGL, K.; ZUNEC, R.; CAR, H.; CECUK-JELICIC, E.; BRKLJACIC-KERHIN, V. Linkage disequilibria between human leucocyte antigen-B and closely linked microsatellites in the Croatian population. **Tissue Antigens**, v.69, pp.86-94, 2006.
- GUERRA, L.K.; REHFELDT, I.R.; LIMA, M.T.; PETZL-ERLER, M.L.; de MESSIAS, I.J. BF and C3 genetic polymorphisms in Kaingang Indians from southern Brazil. **Human Heredity**, v.42, pp.153-156, 1992.
- GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, pp.361-372, 1992.
- HAINES, J.L.; TER-MINASSIAN, M.; BAZYK, A.; GUSELLA, J.F.; KIM, D.J.; TERWEDOW, H.; PERICAK-VANCE, M.A.; RIMMLER, J.B.; HAYNES, C.S.; ROSES, A.D.; LEE A.; SHANER, B.; MENOLD, M.; SEBOUN, E.; FITOUSSI, R.P.; GARTIOUX, C.; REYES, C.; RIBIERRE, F.; GYAPAY, G.; WEISSENBACH J.; HAUSER, S.L.; GOODKIN, D.E.; LINCOLN, R.; USUKU, K.; GARCIA-MERINO, A.; GATTO, N.; YOUNG, S.; OKSENBERG, J.R. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. **Nature Genetics**, v.13, pp.469-471, 1996.
- HASSAN, A.B.; NIKITINA-ZAKE, L.; PADYUKOV, L.; KARLSSON, G.; GUPTA, M.; LUNDBERG, I.E.; SANJEEVI, C.B. MICA4/HLA-DRB1\*04/TNF1 haplotype is associated with mixed connective tissue disease in Swedish patients. **Human Immunology**, v.64, pp.290-296, 2003.
- HEDRICK, P.W. **Genetics of Populations**. Sudbury: Jones and Barlett Publishers, Third Edition, 2003.
- HEY, J. On the number of New World founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. **PLoS Biology**, v.3, e193, pp.0001-0011, 2005.
- HORAI, S.; KONDO, R.; NAKAGAWA-HATTORI, Y.; HAYASHI, S.; SONODA, S.; TAJIMA, K. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, pp.23-47, 1993.
- IMGT/HLA Sequence Database. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index.html>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2006.
- Instituto Socioambiental. Disponível em: <<http://www.socioambiental.org/website/pib/index.html>>. Acesso em: 28 de julho de 2006.
- IRVING, W.N. Context and chronology of early man in the Americas. **Annual Reviews of Anthropology** v.14, pp.529-555, 1985 *apud* SCHANFIELD, M.S. Immunoglobulin Allotypes (GM and KM) indicate multiple founding populations of Native Americans: evidence of at least four migrations to the New World. **Human Biology**, v.64, pp.381-402, 1992.

- JANEWAY, C.; TRAVERS, P. **Imunobiologia**. O Sistema Imune na Saúde e na Doença. 8. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- JAZWINSKA, E.C.; LEE, S.C.; WEBB, S.I.; HALLIDAY, J.W.; POWELL, L.W. Localization of the hemochromatosis gene close to D6S105. **American Journal of Human Genetics**, v.53, pp.347-352, 1993.
- KARELL, K.; KLINGER, N.; HOLOPAINEN, P.; LEVO, A.; PARTANEN, J. Major histocompatibility complex (MHC)-linked microsatellite markers in a founder population. **Tissue Antigens**, v.56, pp.45-51, 2000.
- KAWABATA, Y.; IKEGAMI, H.; KAWAGUCHI, Y.; FUJISAWA, T.; HOTTA, M.; UEDA, H.; SHINTANI, M.; NOJIMA, K.; ONO, M.; NISHINO, M.; TANIGUCHI, H.; NOSO, S.; YAMADA, K.; BABAYA, N.; OGIHARA, T. Age-related association of MHC class I chain-related gene A (MICA) with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Human Immunology**, v.61, pp.624-629, 2000.
- KIM, H.K.; HAN, H.; CHOI, H.B.; PYO, C.W.; KIM, C.C.; KIM, T.G. Distribution of seven polymorphic markers and haplotypes within the human TNF gene cluster in Koreans. **Human Immunology**, v.61, pp.1274-1280, 2000.
- KIRK, C.W.; DROOGAN, A.G.; HAWKINS, A.S.; MCMILLAN, A.S.; NEVIN, N.C.; GRAHAM, C.A. Tumor necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis. **Journal of Neurological Sciences**, v.147, pp.21-25, 1997.
- KOHLRAUSCH, F.B.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; SALZANO, F.M.; HUTZ, M.H. Geography influences microsatellite polymorphism diversity in Amerindians. **American Journal of Physical Anthropology**, v.126, pp.463-470, 2005.
- KOMATSU-WAKUI, M.; TOKUNAGA, K.; ISHIKAWA, Y.; KASHIWASE, K.; MORIYAMA, S.; TSUCHIYA, N.; ANDO, H.; SHIINA, T.; GERAGHTY, D.E.; INOKO, H.; JUJI, T. *MIC-A* polymorphism in Japanese and a *MIC-A-MIC-B* null haplotype. **Immunogenetics**, v.49, pp.620-628, 1999.
- KOMATSU-WAKUI, M.; TOKUNAGA, K.; ISHIKAWA, Y.; LEELAYUWAT, C.; KASHIWASE, K.; TANAKA, H.; MORIYAMA, S.; NAKAJIMA, F.; PARK, M.H.; JIA, G.J.; CHIMGE, N.O.; SIDELTSEVA, E.W.; JUJI, T. Wide distribution of the *MICA-MICB* null haplotype in East Asians. **Tissue Antigens**, v.57, pp.1-8, 2001.
- LAHIRI, D.K.; NURNBERG, J.J.I. A rapid non enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.19, 1991.
- LAJOIE, J.; ZIJENAH, L.S.; FAUCHER, M.C.; WARD, B.J.; ROGER, M., for the ZVITAMBO Study Group. Novel TAP1 Polymorphisms in indigenous Zimbabweans: Their potential implications on TAP function and in human diseases. **Human Immunology**, v.64, pp.823-829, 2003.
- LANCASTER, A.; NELSON, M.P.; SINGLE, R.M.; MEYER, D.; THOMSON, G. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. **Pacific Symposium on Biocomputing**, v.8, pp.514-525, 2003.

- LAZARO, A.M.; MORAES, M.E.; MARCOS, C.Y.; MORAES, J.R.; FERNANDEZ-VINA, M.A.; STASTNY, P. Evolution of HLA-Class I compared to HLA-Class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. **Human Immunology**, v.60, pp.1138-1149, 1999.
- LI, S.; KAWATA, H.; KATSUYAMA, Y.; OTA, M.; MORISHIMA, Y.; MANO, S.; KULSKI, J.K.; NARUSE, T.; INOKO, H. Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. **Tissue Antigens**, v.63, pp.362-368, 2004.
- LIE, B.A.; TODD, J.A.; POCIOT, F.; NERUP, J.; AKSELSEN, H.E.; JONER, G.; DAHL-JORGENSEN, K.; RONNINGEN, K.S.; THORSBY, E.; UNDLIEN, D.E. The predisposition to type 1 diabetes linked to the human leukocyte antigen complex includes at least one non-class II gene. **American Journal of Human Genetics**, v.64, pp.793-800, 1999.
- LIN, L.; JIN, L.; KIMURA, A.; CARRINGTON, M.; MIGNOT, E. DQ microsatellite association studies in three ethnic groups. **Tissue Antigens**, v.50, pp.507-520, 1997.
- LIN, L.; JIN, L.; LIN, X.; VOROS, A.; UNDERHILL, P.; MIGNOT, E. Microsatellite single nucleotide polymorphisms in the HLA-DQ region. **Tissue Antigens**, v.52, pp.9-18, 1998.
- LIU, C.J.; LEE, Y.J.; CHANG, K.W.; SHIH, Y.N.; LIU, H.F.; DANG, C.W. Polymorphism of the MICA gene and the risk for oral submucous fibrosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.33, pp.1-6, 2004.
- MALFROY, L.; ROTH, M.P.; CARRINGTON, M.; BOROT, N.; VOLZ, A.; ZIEGLER, A.; COPPIN, H. Heterogeneity in rates of recombination in the 6-Mb region telomeric to the human major histocompatibility complex. **Genomics**, v.43, pp.226-231, 1997.
- MALKKI, M.; SINGLE, R.; CARRINGTON, M.; THOMSON, G.; PETERSDORF, E. MHC microsatellite diversity and linkage disequilibrium among common HLA-A, HLA-B, DRB1 haplotypes: implications for unrelated donor hematopoietic transplantation and disease association studies. **Tissue Antigens**, v.66, pp.114-124, 2005.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- MARTIN, M.P.; HARDING, A.; CHADWICK, R.; KRONICK, M.; CULLEN, M.; LIN, L.; MIGNOT, E.; CARRINGTON, M. Characterization of 12 microsatellite loci on the human MHC in a panel of reference cell lines. **Immunogenetics**, v.47, pp.131-138, 1998.
- McDONNELL, G.V.; KIRK, C.W.; MIDDLETON, D.; DROOGAN, A.G.; HAWKINS, S.A.; PATTERSON, C.C.; GRAHAM, C.A. Genetic association studies of tumour necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$  and tumour necrosis factor receptor 1 and 2 polymorphisms across the clinical spectrum of multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v.246, pp.1051-1058, 1999.
- MEYER, D.; THOMSON, G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. **Annals of Human Genetics**, v.65, pp.1-26, 2001.

- MIDDLETON, P.G.; TAYLOR, P.R.; JACKSON, G.; PROCTOR, S.J.; DICKINSON, A.M. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. **Blood**, v.92, pp.3943-3948, 1998.
- MIGNOT, E.; KIMURA, A.; LATTERMANN, A.; LIN, X.; YASUNAGA, S.; MUELLER-ECKHARDT, G.; RATAZZI, C.; LIN, L.; GUILLEMINAULT, C.; GRUMET, F.C.; MAYER, G.; DEMENT, W.C.; UNDERHILL, P. Extensive HLA class II studies in 58 non-DRB1\*15 (DR2) narcoleptic patients with cataplexy. **Tissue Antigens**, v.49, pp.329-341, 1997.
- 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.
- MIZUKI, N.; OTA, M.; KIMURA, M.; OHNO, S.; ANDO, H.; KATSUYAMA, Y.; YAMAZAKI, M.; WATANABE, K.; GOTO, K.; NAKAMURA, S.; BAHRAM, S.; INOKO, H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, pp.1298-1303, 1997.
- MIZUKI, N.; OTA, M.; YABUKI, K.; KATSUYAMA, Y.; ANDO, H.; PALIMERIS, G.D.; KAKLAMANI, E.; ACCORINTI, M.; PIVETTI-PEZZI, P.; OHNO, S.; INOKO, H. Localization of the pathogenic gene of Behçet's disease by microsatellite analysis of three different populations. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.41, pp.3702-3708, 2000.
- MOK, J.W.; LEE, Y.J.; KIM, J.Y.; LEE, E.B.; SONG, Y.W.; PARK, M.H.; PARK, K.S. Association of MICA polymorphism with rheumatoid arthritis patients in Koreans. **Human Immunology**, v.64, pp.1190-1194, 2003.
- NAIR, R.P.; STUART, P.; HENSELER, T.; JENISCH, S.; CHIA, N.V.; WESTPHAL, E.; SCHORK, N.J.; KIM, J.; LIM, H.W.; CHRISTOPHERS, E.; VOORHEES, J.J.; ELDER, J.T. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. **American Journal of Human Genetics**, v.66, pp.1833-1844, 2000.
- NEVES, W.A.; HUBBE, M.; OKUMURA, M.M.; GONZALEZ-JOSE, R.; FIGUTI, L.; EGGERS, S.; De BLASIS, P.A. A new early Holocene human skeleton from Brazil: implications for the settlement of the New World. **Journal of Human Evolution**, v.48, pp.403-414, 2005.
- NEVES, W.A.; HUBBE, M. Cranial morphology of early Americans from Lagoa Santa, Brazil: implications for the settlement of the New World. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, pp.18309-18314, 2005.
- NIIZEKI, H.; NARUSE, T.; HECKER, K.H.; TAYLOR, J.R.; KURIMOTO, I.; SHIMIZU, T.; YAMASAKI, Y.; INOKO, H.; STREILEIN, J.W. Polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes are associated with susceptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. **Tissue Antigens**, v.58, pp.369-378, 2001.
- NIKITINA-ZAKE, L.; CIMDINA, I.; RUMBA, I.; DABADGHAO, P.; SANJEEVI, C.B. Major histocompatibility complex class I chain related (MIC) A gene, TNFa microsatellite alleles and TNFB alleles in juvenile idiopathic arthritis patients from Latvia. **Human Immunology**, v.63, pp.418-423, 2002.



- NISHIYAMA, M.; TAKAHASHI, M.; MANAKA, K.; ROOSIHERMIATIE, B.; KURIYAMA, T.; NAKAE, K. Frequencies of MICA gene polymorphism: a comparison between Indonesians on Bacan Island and suburban Japanese. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.35, pp.195-201, 2004.
- NOVOTA, P.; KOLESAR, L.; SLAVCEV, A.; CERNA, M. Fluorescence-based automated fragment analysis of microsatellite polymorphism within the transmembrane region of the MIC-A gene. **Folia Biologica (Praha)**, v.50, pp.21-23, 2004
- O'ROURKE, D.H.; MOBARRY, A.; SUAREZ, B.K. Patterns of genetic variation in Native America. **Human Biology**, v.64, pp.417-434, 1992.
- 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**, v.49, pp.448-454, 1997.
- PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, pp.357-358, 1996.
- PARHAM, P.; ARNETT, K.L.; ADAMS, E.J.; LITTLE, A.M.; TEES, K.; BARBER, L.D.; MARSH, S.G.; OHTA, T.; MARKOW, T.; PETZL-ERLER, M.L. Episodic evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americas. **Tissue Antigens**, v.50, pp.219-232, 1997.
- PARK, S.H.; PARK, K.S.; SEO, Y.I.; MIN, D.J.; KIM, W.U.; KIM, T.G.; CHO, C.S.; MOK, J.W.; PARK, K.S.; KIM, H.Y. Association of MICA polymorphism with HLA-B51 and disease severity in Korean patients with Behcet's disease. **Journal of Korean Medical Science**, v.17, pp.366-370, 2002a.
- PARK, Y.; LEE, H.; SANJEEVI, C.B.; EISENBARTH, G.S. MICA polymorphism is associated with type 1 diabetes in the Korean population. **Diabetes Care**, v.24, pp.33-38, 2001.
- PARK, Y.S.; SANJEEVI, C.B.; ROBLES, D.; YU, L.; REWERS, M.; GOTTLIEB, P.A.; FAIN, P.; EISENBARTH, G.S. Additional association of intra-MHC genes, MICA and D6S273, with Addison's disease. **Tissue Antigens**, v.60, pp.155-163, 2002b.
- PENA, J.A.; CALDERON, R.; PEREZ-MIRANDA, A.; VIDALES, C.; DUGOUJON, J.M.; CARRION, M.; CROUAU-ROY, B. Microsatellite DNA markers from HLA region (D6S105, D6S265 and TNFa) in autochthonous Basques from Northern Navarre (Spain). **Annals of Human Biology**, v.29, pp.176-191, 2002.
- PENA, S.D.J.; SANTOS, F.R.; BIANCHI, N.O.; BRAVI, C.M.; CARNESE, F.R.; ROTHHAMMER, F.; GERELSAIKHAN, T.; MUNKHTUJA, B.; OYUNSUREN, T. A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. **Nature Genetics**, v.11, pp.15-16, 1995.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; CORELL, A.; ARGÜELLO, J.R.; COX, S.T.; McWHINNIE, A.; MARSH, S.G.E.; MADRIGAL, J.A. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. **Tissue Antigens**, v.55, pp.162-165, 2000.

- PETZL-ERLER, M.L.; LUZ, R.; SOTOMAIOR, V.S. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: the Kaingang and the Guarani. **Tissue Antigens**, v.41, pp.227-37, 1993.
- PETZL-ERLER, M.L.; MCDEVITT, H.O. Molecular analysis of the HLA-DRB genes in two tribes of Brazilian Indians. **Human Immunology**, v.41, pp.180-184, 1994.
- PETZL-ERLER, M.L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura**, Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, v.51, pp.199-211, 1999.
- PLEVY, S.E.; TARGAN, S.R.; YANG, H.; FERNANDEZ, D.; ROTTER, J.I.; TOYODA, H. Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease-associated haplotype on chromosome 6. **Gastroenterology**, v.110, pp.1053-1060, 1996.
- PROBST, C.M. **CONVERT**: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos e genética de populações. Programa distribuído pelo autor. Curitiba, 1998.
- PYO, C.W.; HUR, S.S.; KIM, Y.K.; CHOI, H.B.; KIM, T.Y.; KIM, T.G. Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population. **Human Immunology**, v.64, pp.378-384, 2003.
- RAHA-CHOWDHURY, R.; BOWEN, D.J.; STONE, C.; POINTON, J.J.; TERWILLIGER, J.D.; SHEARMAN, J.D.; ROBSON, K.J.; BOMFORD, A.; WORWOOD, M. New polymorphic microsatellite markers place the haemochromatosis gene telomeric to D6S105. **Human Molecular Genetics**, v.4, pp.1869-74, 1995.
- ROGERS, R.A.; ROGERS, L.A.; MARTIN, L.D. How the door opened: the peopling of the new world. **Human Biology**, v.64, pp.281-302, 1992.
- ROMPHRUK, A.V.; NARUSE, T.K.; ROMPHRUK, A.; KAWATA, H.; PUAPAIROJ, C.; KULSKI, J.K.; LEELAYUWAT, C.; INOKO, H. Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. **Tissue Antigens**, v.58, pp.83-89, 2001.
- ROTH, M.P.; DOLBOIS, L.; BOROT, N.; AMADOU, C.; CLANET, M.; PONTAROTTI, P.; COPPIN, H. Three highly polymorphic microsatellites at the human myelin oligodendrocyte glycoprotein locus, 100 kb telomeric to HLA-F. Characterization and relation to HLA haplotypes. **Human Immunology**, v.43, pp.276-282, 1995a.
- ROTH, M.P.; DOLBOIS, L.; BOROT, N.; PONTAROTTI, P.; CLANET, M.; COPPIN, H. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene polymorphisms and multiple sclerosis: no evidence of disease association with MOG. **Journal of Neuroimmunology**, v.61, pp.117-122, 1995b.
- ROTHHAMMER, F.; SILVA, C.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; LLOP, E.; SALZANO, F.M. Gradients of HLA diversity in South American Indians. **Annals of Human Biology**, v.24, pp.197-208, 1997.
- RUBIO, J.P.; BAHLO, M.; BUTZKUEVEN, H.; van DER MEI, I.A.; SALE, M.M.; DICKINSON, J.L.; GROOM, P.; JOHNSON, L.J.; SIMMONS, R.D.; TAIT, B.; VARNEY, M.; TAYLOR, B.; DWYER, T.; WILLIAMSON, R.; GOUGH, N.M.; KILPATRICK, T.J.; SPEED, T.P.; FOOTE, S.J. Genetic dissection of the human leukocyte antigen region by use of haplotypes of Tasmanians with multiple sclerosis. **American Journal of Human Genetics**, v.70, pp.1125-1137, 2002.

- RUEDA, B.; PASCUAL, M.; LOPEZ-NEVOT, M.A.; GONZALEZ, E.; MARTIN, J. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. **Tissue Antigens**, v.60, pp.526-528, 2002.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, pp.406-425, 1987.
- SALZANO, F.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; WEIMER, T.A.; FRANCO, M.H.L.P.; HUTZ, M.H.; PETZL-ERLER, M.L. Eletrophoretic protein polymorphisms in Kaingang and Guarani Indians of Southern Brazil. **American Journal of Human Biology**, v.9, pp.505-512, 1997.
- SARDI, M.L.; RAMIREZ ROZZI, F.; GONZALEZ-JOSE, R.; PUCCIARELLI, H.M. South Amerindian craniofacial morphology: diversity and implications for Amerindian evolution. **American Journal of Physical Anthropology**, v.1028, pp.747-756, 2005.
- SAWCER, S.; JONES, H.B.; FEAKES, R.; GRAY, J.; SMALDON, N.; CHATAWAY, J.; ROBERTSON, N.; CLAYTON, D.; GOODFELLOW, P.N.; COMPSTON, A. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. **Nature Genetics**, v.13, pp.464-468, 1996.
- SCHANFIELD, M.S. Immunoglobulin Allotypes (GM and KM) indicate multiple founding populations of Native Americans: evidence of at least four migrations to the New World. **Human Biology**, v.64, pp.381-402, 1992.
- SLOMOV, E.; LOEWENTHAL, R.; GOLDBERG, I.; KOROSTISHEVSKY, M.; BRENNER, S.; GAZIT, E. Pemphigus vulgaris in Jewish patients is associated with HLA-A region genes: mapping by microsatellite markers. **Human Immunology**, v.64, pp.771-779, 2003.
- SMERDEL, A.; LIE, B.A.; FINHOLT, C.; PLOSKI, R.; FORRE, O.; UNDLIEN, D.E.; THORSBY, E. An additional susceptibility gene for juvenile idiopathic arthritis in the HLA class I region on several DR-DQ haplotypes. **Tissue Antigens**, v.61, pp.80-84, 2003.
- SOTOMAIOR, V.S.; FAUCZ, F.R.; SCHAFHAUSER, C.; JANZEN-DUCK, M.; BOLDT, A.B.; PETZL-ERLER, M.L. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles and haplotypes in two Brazilian Indian tribes: evidence of conservative evolution of HLA-DQ. **Human Biology**, v.70, pp.789-797, 1998.
- SPINK, C.F.; KEEN, L.J.; MIDDLETON, P.G.; BIDWELL, J.L. Discrimination of suballeles present at the TNFd microsatellite locus using induced heteroduplex analysis. **Genes and Immunity**, v.5, pp.76-79, 2004.
- STARIKOVSKAYA, Y.B.; SUKERNIK, R.I.; SCHURR, T.G.; KOGELNIK, A.M.; WALLACE, D.C. mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of Ancient Beringia and the peopling of the New World. **American Journal of Human Genetics**, v.63, pp.1473-1491, 1998.
- STEELE, D.G.; POWELL, J.F. Peopling of the Americas: paleobiological evidence. **Human Biology**, v.64, pp.303-336, 1992.
- STENZEL, A.; LU, T.; KOCH, W.A.; HAMPE, J.; GUENTHER, S.M.; de la VEGA, F.M.; KRAWCZAK, M.; SCHREIBER, S. Patterns of linkage disequilibrium in the MHC region on the human chromosome 6p. **Human Genetics**, v.114, pp.377-385, 2004.

- TARAZONA-SANTOS, E.; CARVALHO-SILVA, D.R.; PETTENER, D.; LUISELLI, D.; De STEFANO, G.F.; LABARGA, C.M.; RICKARDS, O.; TYLER-SMITH, C.; PENA, S.D.; SANTOS, F.R. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. **American Journal of Human Genetics**, v.68, pp.1485-1496, 2001.
- THE MHC SEQUENCING CONSORTION. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature**, v.401, pp.921-923, 1999.
- THOMAS, W.; FULLAN, A.; LOEB, D.B.; McCLELLAND, E.E.; BACON, B.R.; WOLFF, R.K. A haplotype and linkage disequilibrium analysis of the hereditary hemochromatosis gene region. **Human Genetics**, v.102, pp.517-525, 1998.
- TIAN, W.; BOGGS, D.A.; UKO, G.; ESSIET, A.; INYAMA, M.; BANJOKO, B.; ADEWOLE, T.; DING, W.Z.; MOHSENI, M.; FRITZ, R.; CHEN, D.F.; PALMER, L.J.; FRASER, P.A. MICA, HLA-B haplotypic variation in five population groups of sub-Saharan African ancestry. **Genes and Immunity**, v.4, pp.500-505, 2003.
- TIAN, W.; LI, L.X.; WANG, F.; LUO, Q.Z.; YAN, M.Y.; YU, P.; GUO, S.S.; CAO, Y. MICA-STR, HLA-B haplotypic diversity and linkage disequilibrium in the Hunan Han population of southern China. **International Journal of Immunogenetics**, v.33, pp.241-245, 2006.
- TRIPODIS, N.; MASON, R.; HUMPHRAY, S.J.; DAVIES, A.F.; HERBERG, J.A.; TROWSDALE, J.; NIZETIC, D.; SENGER, G.; RAGOUSIS, J. Physical map of human 6p21.2-6p21.3: region flanking the centromeric end of the major histocompatibility complex. **Genome Research**, v.8, pp.631-643, 1998.
- TSUJIMURA, A.; OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; SADA, M.; MIURA, H.; MATSUMIYA, K.; GOTOH, R.; NAKATANI, T.; OKUYAMA, A.; TAKAHARA, S. Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia located near HLA-DR and -DQ loci in the HLA class II region. **Human Genetics**, v.110, pp.192-197, 2002.
- TSUNETO, L.T.; PROBST, C.M.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M.; RODRIGUEZ-DELFIN, L.A.; ZAGO, M.A.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.C.; PETZL-ERLER, M.L. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. **Tissue Antigens**, v.62, pp.512-526, 2003.
- TUGLULAR, S.; BERTHOUX, P.; BERTHOUX, F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor alpha gene at position -308 and TNFd microsatellite in primary IgA nephropathy. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v.18, pp.724-731, 2003.
- UDALOVA, I.A.; NEDOSPASOV, S.A.; WEBB, G.C.; CHAPLIN, D.D.; TURETSKAYA, R.L. Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. **Genomics**, v.16, pp.180-186, 1993.
- VORECHOVSKY, I.; KRALOVICOVA, J.; LAYCOCK, M.D.; WEBSTER, A.D.; MARSH, S.G.; MADRIGAL, A.; HAMMARSTROM, L. Short tandem repeat (STR) haplotypes in HLA: an integrated 50-kb STR/linkage disequilibrium/gene map between the RING3 and HLA-B genes and identification of STR haplotype diversification in the class III region. **European Journal of Human Genetics**, v.9, pp.590-598, 2001.
- WALLACE, D.C.; TORRONI, A. American Indian prehistory as written in the Mitochondrial DNA: a review. **Human Biology**, v.64, pp.403-416, 1992.

- WALLACE, G.R.; VERITY, D.H.; DELAMAINE, L.J.; OHNO, S.; INOKO, H.; OTA, M.; MIZUKI, N.; YABUKI, K.; KONDIATIS, E.; STEPHENS, H.A.; MADANAT, W.; KANAWATI, C.A.; STANFORD, M.R.; VAUGHAN, R.W. MIC-A allele profiles and HLA class I associations in Behcet's disease. **Immunogenetics**, v.49, pp.613-617, 1999.
- WEBER, J.L.; KWITEK, A.E.; MAY, P.E.; ZOGHBI, H.Y. Dinucleotide repeat polymorphism at the D6S105 locus. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.968, 1991.
- WEG-REMERS, S.; BRENDEN, M.; SCHWARZ, E.; WITZEL, K.; SCHNEIDER, P.M.; GUERRA, L.K.; REHFELDT, I.R.; LIMA, M.T.; HARTMANN, D.; PETZL-ERLER, M.L.; de MESSIAS, I.J.; MAUFF, G. Major histocompatibility complex (MHC) class III genetics in two Amerindian tribes from Southern Brazil: the Kaingang and the Guarani. **Human Genetics**, v.100, pp.548-556, 1997.
- WORWOOD, M.; CHODHURY, R.R.; ROBSON, K.J.H.; POINTON, J.; SHEARMAN, J.D.; DARKE, C. The HLA A1-B8 haplotype extends 6 Mb beyond HLA-A: associations between HLA-A, B, F and 15 microsatellite markers. **Tissue Antigens**, v.50, pp.521-526, 1997.
- YABUKI, K.; MIZUKI, N.; OTA, M.; KATSUYAMA, Y.; PALIMERIS, G.; STAVROPOULOS, C.; KOUMANTAKI, Y.; SPYROPOULOU, M.; GIZIAKI, E.; KAKLAMANI, V.; KAKLAMANI, E.; INOKO, H.; OHNO, S. Association of MICA gene and HLA-B\*5101 with Behcet's disease in Greece. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.40, pp.1921-1926, 1999a.
- YABUKI, K.; OTA, M.; GOTO, K.; KIMURA, T.; NOMURA, E.; OHNO, S.; MIZUKI, N.; KATSUYAMA, Y.; MAKYSYMWOWYCH, W.P.; BAHRAM, S.; KIMURA, M.; INOKO, H. Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative caucasian patients with ankylosing spondylitis. **Human Immunology**, v.60, pp.83-86, 1999b.
- YU, H.X.; REN, E.C.; CHAN, S.H. Associations of HLA microsatellites with rheumatoid arthritis in Singaporean Chinese. **Tissue Antigens**, v.62, pp.133-138, 2003.
- YU, H.X.; THAI, A.C.; CHAN, S.H. HLA microsatellite association with insulin-dependent diabetes mellitus in Singaporean Chinese. **Human Immunology**, v.60, pp.894-900, 1999.
- ZHANG, Y.; LAZARO, A.M.; ZOU, Y.; LAVIGNIA, B.; MORAES, E.M.; MORAES, R.J.; STASTNY, P. MICA polymorphism in South American Indians. **Immunogenetics**, v.53, pp.900-906, 2002.