

MÁRCIA HOLSBACH BELTRAME

**DIVERSIDADE DOS GENES REGULADORES DA RESPOSTA DE
LINFÓCITOS T, *CD80* E *CD86*, NA POPULAÇÃO DA REGIÃO
METROPOLITANA DE CURITIBA**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Luiza Petzl-
Erlar

CURITIBA

2006

AGRADECIMENTOS

À professora Luiza, pela orientação, compreensão, incentivo e amizade nestes dois anos e meio de trabalho.

Aos meus amigos do LGMH, pelo companheirismo em todos os momentos: Rafa, Letícia, Danillo, Cintia e Gabriel; Karen, Liana, Marcinha, Dani e Karin especialmente pelas cuidadosas correções e sugestões para meu trabalho.

Aos professores da minha banca, Nina e João Carlos, por aceitarem avaliar meu trabalho e por todas as contribuições.

Ao pessoal do Departamento de Genética; Anilda e Valéria, por me ajudarem sempre que precisei; aos professores, pelos ensinamentos transmitidos todos estes anos e pelo apoio, incentivo e amizade que sempre tiveram por mim. Em especial aos queridos amigos Gabardo e Karam. E aos colegas, pela alegria e pelas festas.

Aos meus colegas de turma, em especial minhas amigas Alessandra, Tissa, Fer e Paty, por todos os momentos de estudo e descontração.

À minha família, que me apóia mesmo sem entender meu trabalho e sempre torce pelo meu sucesso. Obrigada pelo amor e por tudo.

Ao Marcelo, pelo apoio e incentivo desde o início, e principalmente, por gostar de mim e estar ao meu lado há quase três anos.

“A dupla hélice é realmente uma
molécula extraordinária.”

Francis Crick.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	3
2.2 MODELO DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T.....	4
2.3 <i>CD80 (B7-1)</i>	7
2.4 <i>CD86 (B7-2)</i>	9
2.5 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO A DOENÇAS.....	11
3 OBJETIVOS	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 AMOSTRA.....	14
4.2 METODOLOGIA DE TIPAGEM.....	14
4.2.1 Amplificação Gênica.....	16
4.2.2 Confeção dos Dot-Blots.....	17
4.2.3 Marcação dos Oligonucleotídeos-Sonda.....	17
4.2.4 Hibridação.....	18
4.2.5 Desibridação.....	20
4.2.6 Soluções Utilizadas.....	21
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5 RESULTADOS	23
5.1 METODOLOGIA.....	23
5.2 ANÁLISE POPULACIONAL.....	25
5.2.1 <i>CD80</i>	25
5.2.2 <i>CD86</i>	28
6 DISCUSSÃO	30
6.1 <i>CD80</i>	31
6.2 <i>CD86</i>	33
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – FREQUÊNCIAS (EM %) DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELA COMBINAÇÃO DOS SNPs -454_-387_-232_-79_-7_+5 E INSERÇÃO -558 LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	9
TABELA 2 – FREQUÊNCIAS (EM %) DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELA COMBINAÇÃO DOS SNPs -454_-387_-232_-79_-7 LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	9
TABELA 3 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	16
TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA E TEMPERATURAS DE ALTA ESTRINGÊNCIA CALCULADAS E OTIMIZADAS PARA TIPAGEM DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	20
TABELA 5 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -387 (T, C), LOCALIZADO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	26
TABELA 6 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GEOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DOS SNPs -7 (T, C) E +5(A,C), LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	27
TABELA 7 – FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELA COMBINAÇÃO DOS SNPs -387_-7_+5, LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	27
TABELA 8 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DOS SNPs -232 E INSERÇÃO -558, LOCALIZADAS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	28
TABELA 9 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DOS SNP 1057 (A, G), LOCALIZADO NO EXON 8 DO GENE <i>CD8629</i>	
TABELA 10 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DOS SNP -387 (T, C) DO GENE <i>CD80</i>	32
TABELA 11 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -7 (T, C) DO GENE <i>CD80</i>	32
TABELA 12 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DAS VARIANTES DO SNP +5 (A, C) E INSERÇÃO DA POSIÇÃO -558 DO GENE <i>CD80</i>	32
TABELA 13 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -232 (A, G), DO GENE <i>CD80</i>	33
TABELA 14 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP 1057 (A, G), EXON 8 DO GENE <i>CD86</i>	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PAPEL DAS MOLÉCULAS B7 (CD80 e CD86), NA ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO DAS CÉLULAS T	6
FIGURA 2 – MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS DAS FAMÍLIAS B7 E CD28	7
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE <i>CD80</i> , MOSTRANDO EXONS E INTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASE	8
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE <i>CD86</i> , MOSTRANDO EXONS E INTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASE	10
FIGURA 5 – SEQUÊNCIA AMPLIFICADA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	15
FIGURA 6 – SEQUÊNCIA AMPLIFICADA DO GENE <i>CD86</i>	16
FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DE GEL DE AGAROSE APÓS CORRIDA ELETOFORÉTICA COM PRODUTOS AMPLIFICADOS DOS GENES <i>CD80</i> (a) E <i>CD86</i> (b) E MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR	23
FIGURA 8 – MEMBRANAS TESTE DAS SONDAS PARA A POSIÇÃO -387 DO GENE <i>CD80</i> . SÃO MOSTRADAS AS HIBRIDAÇÕES COM AS SONDAS ESPECÍFICAS PARA OS ALELOS T E C, RESPECTIVAMENTE	26

RESUMO

Os genes *CD80* e *CD86* estão ligados no braço longo do cromossomo 3 (3q13-3q21). Codificam glicoproteínas semelhantes às imunoglobulinas, expressas na membrana das células apresentadoras de antígeno (APC). Essas moléculas atuam como co-estimuladoras, participando do segundo sinal na ativação dos linfócitos T. Devido ao importante papel que possuem nas respostas imunes, os genes que as codificam são considerados candidatos a estarem associados a doenças, especialmente as auto-imunes. Vários polimorfismos já foram descritos nesses genes, porém poucas populações foram caracterizadas para a maior parte deles. O estudo de genética de populações possui diversas aplicações, trazendo informação sobre a ação de fatores evolutivos em seqüências genômicas e auxiliando na determinação da história biológica das populações. A população brasileira é miscigenada, formada pela contribuição de europeus, africanos e ameríndios, em diferentes proporções em cada região do país. Na região sul, onde foi realizado o presente estudo, o componente europeu é predominante. Neste estudo foram analisados seis SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único), nas posições -454 (A, C), -387 (C, T), -232 (A, G), -79 (G, C), -7 (C, T) e +5 (A, C), e uma inserção na posição -558 (CATGA), localizados na região promotora do gene *CD80* e um SNP no exon 8 do gene *CD86*. O objetivo foi otimizar a técnica de tipagem e determinar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas desses polimorfismos na população da região metropolitana de Curitiba. A técnica escolhida foi a PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide Probes*). Essa técnica consiste na amplificação por PCR do fragmento correspondente ao gene e fixação do produto de PCR em membranas de nylon. Em seguida é feita a hibridação com oligonucleotídeos-sonda marcados com biotina para a discriminação dos genótipos. Os resultados obtidos foram bons, com sinais fortes e dicotômicos, porém, sem reprodutibilidade. As soluções, membranas e sondas utilizadas foram testadas novamente e não houve melhora nos resultados. Para as posições -387, -7 e +5 do gene *CD80*, foi possível tipar toda a amostra. Já para as posições -588, -232 do gene *CD80* e 1057 do gene *CD86*, apenas uma parte da amostra foi analisada, e as frequências encontradas podem não ser representativas da nossa população. As frequências alélicas em euro-brasileiros são: -387*T 46,0%, -7*C_+5*A 11,4%, -558*INS 13,9%, -232*A 27,5% e 1057*A 28,3%. A amostra encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos analisados. Para as posições -454 e -79 não obtivemos bons resultados na hibridação. As variantes das posições -387, -7 e +5 estão em desequilíbrio de ligação absoluto. As frequências encontradas assemelham-se às descritas para populações européias ou de ascendência européia e diferem da população japonesa para a maior parte dos polimorfismos analisados, com exceção das posições -232 e -558 do gene *CD80*.

1 INTRODUÇÃO

A imunidade natural é a primeira linha de defesa contra microrganismos, porém as respostas específicas são fornecidas pela imunidade adquirida, que é composta por duas linhas de atuação: humoral e celular. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, produzidos pelos linfócitos B. Já a imunidade celular é mediada pelos linfócitos T (ou células T) e atua contra microrganismos intracelulares, destruindo-os ou destruindo as células infectadas. Os linfócitos T reconhecem apenas peptídeos antigênicos ligados à molécula de MHC do hospedeiro, que são expressos na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Este reconhecimento é feito através do receptor de célula T (TCR). Para que ocorra a ativação dos linfócitos T, é necessário um segundo sinal, co-estimulador, enviado pela mesma APC. Este sinal ocorre pela ligação das moléculas B7 (CD80 e CD86), nas APCs, ao receptor CD28, nas células T (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Uma vez que as moléculas co-estimuladoras são essenciais para o desenvolvimento das respostas imunológicas, variantes alélicas dos genes que as codificam podem estar relacionadas a muitas doenças de etiologia complexa, especialmente as auto-imunes. Portanto esses genes são considerados candidatos para estudos de associação a doenças.

As frequências alélicas podem diferir entre populações, e alelos muito comuns em um grupo podem ser raros ou mesmo ausentes em outro, especialmente quando as populações analisadas são relativamente isoladas. O estudo da diversidade de genes em populações possui uma série de aplicações, auxiliando no entendimento da evolução humana, da história demográfica das populações e da ação de fatores evolutivos em seqüências genômicas. Quanto maior for o número de polimorfismos e populações analisadas, maior será nosso conhecimento a respeito da história da evolução humana.

A população brasileira é de origem bastante heterogênea, com contribuição de ameríndios, africanos e europeus, e posteriormente, de migrantes da Ásia e da Europa. O estudo de polimorfismos genéticos pode auxiliar na compreensão da composição da

nossa população, determinando a contribuição de cada um desses povos na formação da população brasileira. Alguns polimorfismos que melhor caracterizam grupos étnicos podem ser utilizados como marcadores genéticos na definição da ancestralidade de indivíduos.

Nesse trabalho foram analisados polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86* na população da região metropolitana de Curitiba, que é de origem predominantemente européia. Esses genes estão ligados no braço longo do cromossomo 3 e apresentam 25% de homologia em suas seqüências. Codificam glicoproteínas tipo I semelhantes às imunoglobulinas, que compartilham os ligantes CD28 e CTLA-4 e estão envolvidas na ativação das células T. O objetivo do presente estudo é a caracterização da população para os genes selecionados, com a determinação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A genética de populações surgiu baseada no teorema de Hardy-Weinberg e teve um grande desenvolvimento na década de 1930, com Chetverikov, Wright, Fisher e Haldane. É definida como o estudo da origem e dinâmica da variação genética nas populações, e tem como um de seus objetivos compreender a ação dos fatores que determinam a evolução. Os polimorfismos genéticos são bastante informativos para este fim.

Polimorfismo é a existência de um locus com pelo menos dois alelos em uma população, sendo que nenhum deles ocorre com frequência superior a 99% (Beiguelman, 1994). Há vários tipos de polimorfismos, porém os mais comuns são os SNPs (*single nucleotide polymorphism* ou polimorfismo de nucleotídeo único), que consistem em troca, perda ou adição de um único nucleotídeo.

Embora a maior parte da variação genética seja encontrada dentro das populações (85%), as frequências alélicas variam entre as populações (8% entre populações locais e 7% entre as principais raças geográficas) (SUZUKI, 1998). Estas variações ocorrem devido à ação de fatores evolutivos, de acordo com a história de cada população. Para compreender a história e evolução das populações é necessário estudar um grande número de polimorfismos. E para compreender a história dos polimorfismos, é necessário estudar um grande número de populações. Antes do advento da genética molecular, as análises dos genótipos eram indiretas e limitadas a um pequeno número de marcadores, denominados polimorfismos clássicos. Hoje temos a análise direta do DNA, que é mais informativa (CAVALLI-SFORZA, 1998; CAVALLI-SFORZA e FELDMAN, 2003).

A população brasileira é miscigenada, composta por indivíduos de ascendências européia, africana sub-saariana, ameríndia e oriental, em diferentes proporções dependendo da região estudada. Na região sul, onde foi realizado o presente estudo, há predominância do componente europeu. Segundo o último censo

demográfico (IBGE, 2000), a população da região sul do Brasil é composta por 83,6% de brancos, 11,5% de pardos, 3,7% de negros, 0,4% de amarelos, e 0,3% de indígenas. A população da região metropolitana de Curitiba (com 1.727.010 habitantes) é composta por 84,65% de brancos, 11,34% de pardos, 2,49% de negros e 1,07% de amarelos. Para o percentual restante não foi feita declaração. Estes dados mostram a origem bastante heterogênea de nossa população, porém esta classificação não revela os diferentes graus de mistura. Dois estudos analisaram o polimorfismo dos genes *HLA* na população de Curitiba. Um deles, realizado com genes *HLA* de classe I, mostrou que não só para os brancos, mas também para os mulatos, o componente europeu é predominante. A contribuição de europeus, africanos e ameríndios foi, respectivamente, 94%, 3% e 3% para brancos e 57%, 39% e 4% para mulatos (BRAUN-PRADO et al., 2000). Um outro estudo analisou genes *HLA* de classe I e II, e mostrou que o componente europeu é predominante entre os brancos (80,6%), sendo que a contribuição de africanos é de 12,5% e a de ameríndios é de 7,0%. Já para os mulatos o componente predominante foi o africano (49,5%), sendo as contribuições européia de 41,8% e ameríndia de 8,7% (PROBST et al., 2000).

A caracterização genética das populações humanas é importante na reconstrução da história da fundação ou migração e investigação da estrutura genética das populações. Além da importância para estudos evolutivos, a análise de genes que atuam na resposta imune é útil para estudos de associação a doenças complexas, especialmente as auto-imunes, pois estes genes podem fazer parte do componente genético da doença. No entanto, ainda há poucos estudos com os genes *CD80* e *CD86*, e apenas algumas populações foram caracterizadas para os polimorfismos destes genes. Quase todos os trabalhos realizados são estudos de associação a doenças.

2.2 MODELO DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T

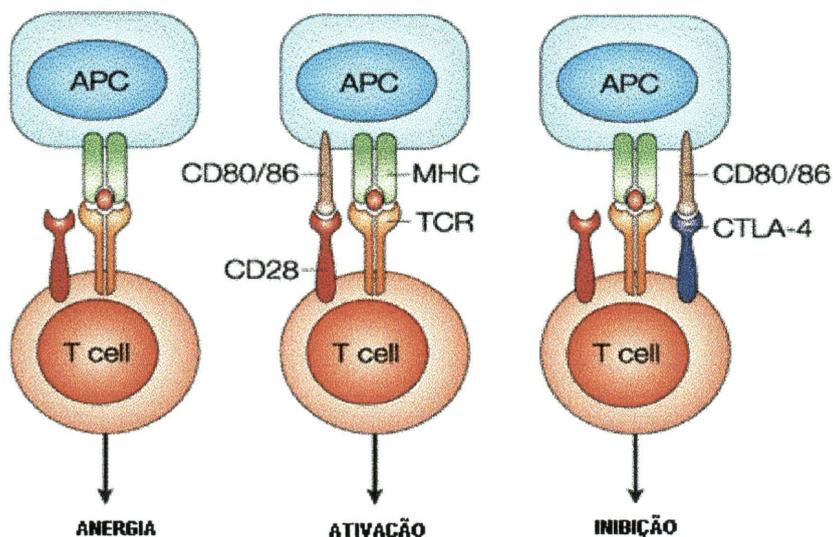
Para que ocorra a ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T virgens em células efectoras, são necessários dois sinais enviados pela célula apresentadora de antígeno profissional (FIGURA 1). O primeiro sinal é antígeno-

específico e é dado pela ligação do TCR (receptor de célula T) e dos co-receptores CD4 ou CD8 ao complexo peptídeo-MHC. O segundo sinal, co-estimulador, ocorre pela ligação das moléculas B7 (CD80 e CD86) ao receptor CD28, no linfócito T. Sem o segundo sinal não ocorre a ativação e a célula T torna-se anérgica (PARHAM, 2001).

Após a ativação, a célula T passa a expressar uma variedade de moléculas que contribuem para a sustentação ou modificação dos sinais co-estimuladores. A expressão de interleucina-2 pelas células T ativadas estimula sua proliferação e diferenciação (JANEWAY, 2002).

A ligação das moléculas B7 ao receptor CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), expresso na membrana dos linfócitos T ativos, leva à inativação dos mesmos, interrompendo a resposta imune (FIGURA 1). Esta ligação ocorre com cerca de 20 vezes mais avidéz do que a ligação de B7 a CD28 e é essencial para a limitação da resposta proliferativa das células T. Acredita-se que a regulação negativa possa ser promovida não por sinais negativos enviados através da ligação de CTLA-4, mas pela exclusão dos complexos CD28/B7 e/ou por competição direta pela ligação das moléculas B7 (BHATIA et al., 2006). Assim, as moléculas CD28 e CTLA-4, através da ligação às moléculas B7, regulam as respostas imunes contra antígenos próprios e estranhos controlando a ativação antígeno-específica das células T (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

FIGURA 1 – PAPEL DAS MOLÉCULAS B7 (CD80 e CD86), NA ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO DAS CÉLULAS T



FONTE: ALEGRE, FRAUWIRTH e THOMPSON, 2001

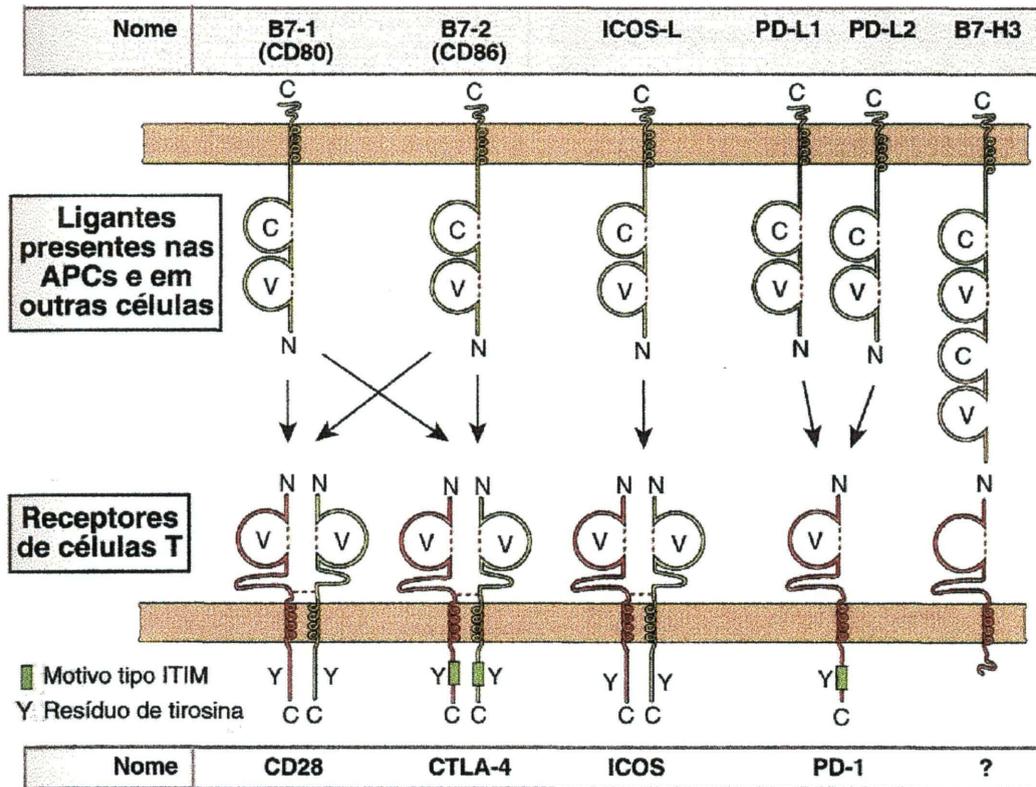
APC: CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO

MHC: COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

TCR: RECEPTOR DE CÉLULA T

Embora as vias de ativação das células T que envolvem as moléculas co-estimuladoras B7 sejam as mais conhecidas, recentemente foram descobertas outras moléculas que atuam neste processo (FIGURA 2). Dentro da família CD28 temos os receptores ICOS (co-estimulador induzido), que promove sinal de ativação e PD-1 (morte programada 1), que atua como inibidor. Na família B7 existem os ligantes ICOS-L, PD-L1 e PD-L2 e B7-H3, cujo receptor é desconhecido. A contribuição destas moléculas nas respostas imunes ainda não foi totalmente esclarecida, mas sabe-se que há diferenças importantes com relação à atuação destas e de CD80 e CD86 na ativação dos linfócitos T (GREENWALD, FREEMAN e SHARPE, 2005; KEIR e SHARPE, 2005).

FIGURA 2 – MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS DAS FAMÍLIAS B7 E CD28

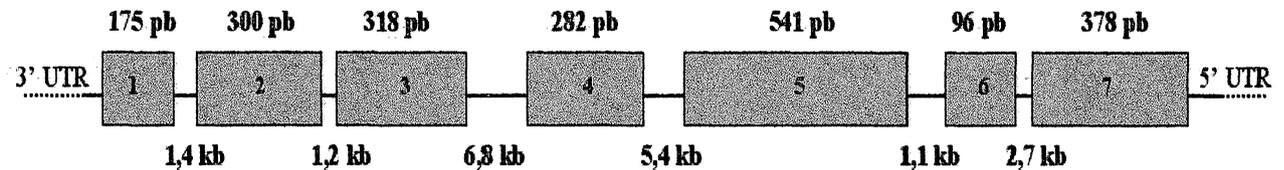


2.3 CD80 (B7-1)

O gene *CD80* localiza-se no cromossomo 3 (posição 3q13), e contém sete exons, possuindo cerca de 32Kb de DNA (FIGURA 3). Codifica uma glicoproteína de mesmo nome, que apresenta dois domínios extracelulares estruturalmente similares aos das imunoglobulinas, codificados pelos exons 3 e 4, uma região transmembrana codificada pelo exon 5 e um curto domínio citoplasmático correspondente ao exon 6. O exon 1 não é traduzido, o exon 2 contém o códon de iniciação AUG e codifica o peptídeo sinal (SELVAKUMAR et al., 1992). Essa molécula é expressa predominantemente na forma de dímeros na membrana das células apresentadoras de antígeno profissionais (APC), como células dendríticas, monócitos e células B ativadas. É estável por 4 a 5 dias. A ligação de CD80 a CD28 leva à diferenciação dos linfócitos T em células Th1. CD80 é o ligante preferencial de CTLA-4, principalmente devido à lenta cinética de expressão apresentada por estas moléculas (a indução de

CTLA-4 e CD80 é simultânea na progressão da ativação das células T). Além disso, CTLA-4 tem maior afinidade e avidéz na ligação com CD80 do que com CD86 (BHATIA et al., 2006; SAMSON, MANZOTTI e ZHENG, 2003).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE *CD80*, MOSTRANDO EXONS E INTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASE.



Foram descritos seis polimorfismos na região promotora deste gene, localizados nas posições -454 (A, C), -387 (C, T), -232 (A, G), -79 (G, C), -7 (C, T), e uma inserção de 5pb (CATGA), na posição -558. Um SNP foi identificado na região 5' não traduzida, posição +5 (A, C). Outros quatro polimorfismos foram encontrados em regiões codificadoras: as posições 452 (G, A) e 614 (C, G), no exon 3; a posição 864 (A, G), no exon 4, que leva a substituição de aminoácido (N186D) e posição 1018-12 (T, G), no intron 5 (MATSUSHITA et al., 2000). Outras cinco variações foram identificadas neste gene, sendo quatro transições e uma deleção, localizados no intron 2, posição -56 (A, G); exon 3, posição 138 (G, A) e 144 (G, A), ambas silenciosas; exon 6, posições 333 (A, G) e 424 (deleção C), região 3' não traduzida (WEINSHENKER et al., 2000). Embora nenhum desses SNPs altere a função da proteína, variantes localizadas na região 3' não traduzida do gene (3' UTR) podem influenciar a estabilidade do RNA mensageiro.

A região promotora do gene *CD80* foi estudada em uma população japonesa (MATSUSHITA et al., 2000) e foram identificados quatro haplótipos (TABELA 1). Como todos eles apresentaram frequências elevadas, o autor sugere que estes alelos estejam sob efeito de seleção balanceadora, porém, para compreender melhor as vias evolutivas destes alelos, novos estudos devem ser realizados em outras populações. Posteriormente, cinco destes SNPs foram estudados em uma população australiana (TEUTSCH et al., 2004) e quatro haplótipos foram observados (TABELA 2).

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS (EM %) DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELA COMBINAÇÃO DOS SNPs -454_-387_-232_-79_-7_+5 E INSERÇÃO -558 LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

Haplótipos	Japoneses (n=270)
Promotor 1 (CTGGTC)	37
Promotor 2 (CCGCTC)	24
Promotor 3 (CTGCTC)	21
Promotor 4 (inserçãoCATGA+ATACCA)	18

FONTE: MATSUSHITA et al., 2000

TABELA 2 - FREQUÊNCIAS (EM %) DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELA COMBINAÇÃO DOS SNPs -454_-387_-232_-79_-7 LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

Haplótipos	Australianos (n=118)
Haplótipo 1 (CTGGT)	10
Haplótipo 2 (CCGCT)	62
Haplótipo 3 (CTGCT)	21
Haplótipo 4 (ATACC)	7

FONTE: TEUTSCH et al., 2004

2.4 *CD86* (B7-2)

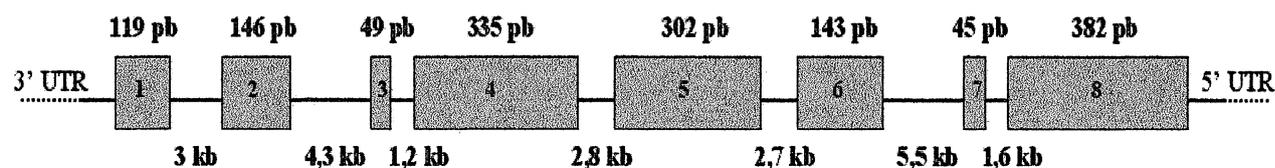
O gene *CD86*, assim como o gene *CD80*, localiza-se no cromossomo 3 (3q21), e contém oito exons, possuindo mais de 22Kb de DNA (FIGURA 4). Há um sítio de recomposição alternativa entre os exons 1 e 2. O exon 3 corresponde ao peptídeo sinal e os exons 4 e 5 aos domínios extracelulares. O exon 6 codifica a região transmembrana e junto com os exons 7 e 8, a cauda citoplasmática. Ao contrário da molécula *CD80*, a glicoproteína *CD86* é expressa constitutivamente em baixos níveis na membrana das células apresentadoras de antígeno, na forma de monômeros, e induz a diferenciação de linfócitos T em células Th2 (BHATIA et al., 2006; SAMSON, MANZOTTI e ZHENG, 2003).

Possui uma rápida cinética de associação e dissociação e sua expressão máxima ocorre em torno de 24 a 48 horas após a ativação dos linfócitos T. Acredita-se que seja o ligante preferencial de *CD28*, pois ambos são expressos constitutivamente, e, portanto, estão disponíveis no momento inicial da ativação das células T, ao contrário de *CD80* (JELLIS et al., 1995). A molécula *CD86* possui três sítios de

fosforilação pela proteína quinase C (PKC) em sua cauda citoplasmática, e é possível que apresente função de transdução de sinal nas células B (JUNE et al., 1994).

Uma molécula solúvel de CD86 (CD86deltaTM) é resultado de uma recomposição que causa a deleção da região transmembrana (exon 6). Esta molécula foi encontrada no soro humano e é funcional, sendo capaz de transmitir sinal co-estimulador às células T de memória (JEANNIN et al., 2000). Uma outra molécula de CD86 (CD86ΔEC) é formada por recomposição alternativa, com a deleção dos exons 4 e 5, que codificam os domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulina, nos quais localizam-se os sítios de ligação aos receptores CD28 e CTLA-4. Há a hipótese de que esta molécula possa interferir na ligação de CD86 a CD28, agindo como regulador negativo da ativação das células T. As três variações da molécula CD86 são produzidas por monócitos não ativados, porém após a ativação, a molécula completa é preferencialmente expressa (MAGISTRELLI et al., 2001).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE *CD86*, MOSTRANDO EXONS E INTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASE



Cinco polimorfismos foram descritos no gene *CD86*. O primeiro, um SNP na posição 1057 (G, A) exon 8, é o único polimorfismo não sinônimo conhecido para este gene. Leva à substituição do aminoácido alanina por treonina (A304T), introduzindo um potencial sítio de fosforilação na região citoplasmática da molécula (DELNESTE et al., 2000). Outros três polimorfismos foram descritos, nas posições +51 (A, G) exon 1, +19 (G, A) exon 2 e -819 (T, C), na região promotora. Recentemente foi descrita uma deleção na região 5' não traduzida, posição -359 (del AAG), próxima ao exon 2 (TEUTSCH et al., 2004). Os SNPs dos exons 1 e 8 estão em desequilíbrio de ligação absoluto na população finlandesa (TURPEINEN et al., 2002).

2.3 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO A DOENÇAS

A ativação dos linfócitos T é crucial para o desencadeamento de uma resposta imune celular efetiva. Neste processo as moléculas co-estimuladoras são essenciais, e por isso alguns estudos investigaram polimorfismos dos genes que as codificam. Essas variantes podem estar relacionadas a mudanças na função ou nível de expressão destas moléculas, interferindo na susceptibilidade a diversas doenças, em especial as auto-imunes e inflamatórias crônicas. Assim, os genes *CD80*, *CD86*, *CD28* e *CTLA-4* são considerados candidatos para estudos de associação a doenças.

Alguns estudos analisaram polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86* em doenças auto-imunes em diferentes populações. Em um estudo do gene *CD86* na população da Grã-Bretanha, foi encontrada forte associação entre esclerose sistêmica e o haplótipo que contém o alelo -3479*G, mais freqüente em pacientes do que em controles (ABDALLAH et al., 2006). Também foi encontrada associação entre o alelo A e o genótipo AA da posição 1057 do gene *CD86* e risco reduzido de rejeição aguda a transplantes em espanhóis (MARÍN et al, 2005).

Em estudos com esclerose múltipla não foi encontrada associação com as variantes da região promotora do gene *CD80* e as posições 1057 e -359 do gene *CD86* em australianos (TEUTSCH et al., 2004), ou a deleção da posição 424 do gene *CD80* em norte-americanos (WEINSHENKER et al., 2000).

Também não foi encontrada associação com as posições 51 e 1057 do gene *CD86* e diabetes tipo I em finlandeses (TURPEINEN et al., 2002), ou das variantes da região promotora do gene *CD80* e posição 1057 do gene *CD86*, com artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico em japoneses (MATSUSHITA et al., 2000).

Um estudo populacional analisou a posição 864, exon 4 do gene *CD80*, em três populações indígenas do Estado do Paraná, das tribos Kaingang e Guarani e em euro-brasileiros da região metropolitana de Curitiba, totalizando 429 indivíduos. Em todas as populações analisadas a freqüência do alelo A foi de 100%, mostrando que esta posição é monomórfica para as populações analisadas (PINCERATI, 2004), embora este polimorfismo tenha sido descrito na população japonesa (MATSUSHITA

et al., 2000), porém com baixa frequência (o alelo 864*G foi encontrado em 1,2% dos indivíduos analisados).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi analisar polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86* em uma amostra de indivíduos residentes na região metropolitana de Curitiba, para compreensão da diversidade destes genes em nossa população e comparação com frequências descritas em outras populações. Foram escolhidos seis SNPs e uma inserção na região promotora do gene *CD80* e um SNP no exon 8 do gene *CD86*. Os objetivos específicos são:

- otimizar o método de tipagem dos polimorfismos escolhidos;
- estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas;
- verificar se as frequências genotípicas encontram-se de acordo com as esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- verificar se as variantes analisadas estão em desequilíbrio de ligação e estimar o valor de D' .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Neste trabalho foram analisados 188 indivíduos residentes na região metropolitana de Curitiba, pertencentes ao Painel do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH). Desses indivíduos, 148 são euro-brasileiros, ou seja, de origem predominantemente européia; 18 são afro-brasileiros, de origem européia e africana, mulatos claros em sua maioria, mas também mulatos médios, escuros e negros; 16 são de origem oriental e outros 6 de origem mestiça variada (européia e oriental, européia e indígena, africana e indígena). Dos indivíduos analisados, 37 são consangüíneos entre si e foram utilizados apenas para confirmação dos genótipos, sendo excluídos da análise.

Todos os indivíduos foram voluntários e assinaram um termo de consentimento para participação em pesquisa. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Paraná.

As amostras foram coletadas a partir de 1994 pela equipe do LGMH. O DNA foi extraído a partir do sangue total, através dos métodos Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (13° IHWC, 2000) e salting-out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991). A concentração do DNA foi sempre ajustada para 20 µg/ml.

4.2 METODOLOGIA DE TIPAGEM

A técnica escolhida para tipagem dos genes *CD80* e *CD86* foi a PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotides Probes*). Essa técnica consiste na amplificação por PCR do fragmento correspondente ao gene e fixação do produto de PCR em membranas de nylon. Em seguida é feita a hibridação com oligonucleotídeos-sonda marcados com biotina para a discriminação dos genótipos.

Para o gene *CD80* foram escolhidos seis polimorfismos de nucleotídeo único localizados na região promotora do gene, nas posições -454 (A, C), -387 (C, T), -232 (A, G), -79 (G, C), -7 (C, T) e +5 (A, C), e uma inserção (CATGA), localizada na posição -558 (FIGURA 5). Devido a possíveis variações de qualidade do DNA e, portanto, dos produtos de PCR, a intensidade dos sinais na membrana pode variar, e nem sempre é possível distinguir sinais positivos fracos de sinais negativos. Para que houvesse um controle desta variação, foi utilizado um oligonucleotídeo-sonda que hibridiza em uma seqüência monomórfica, na posição - 607.

FIGURA 5 – SEQUÊNCIA AMPLIFICADA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

```

-637 aagtacactg gtccagcatg ggtcagctgc tcaactcacag gggctccaga atcctacaaa
      tg gcatgacaac cta
-577 gggacacaca ggggtgggtg gcaacctagt tggaaatggg agtgatgggc atgactaaa
-517 tcttctcat cccaccagag ggcactcaa ctgtggctag ggtgaccaga attcactgtc
      a
-457 cagcgtggct ggccaggagcc cactctctga agatgggtggg attcagaggt gggagtagag
      c
-397 ttgggtggct ttgtgagctg agcactctcc caaaagtgtc ccctacatat gaggttgaca
-337 gcttattcct gcagggactc aggagtaact ctgggtgcta aaacaaaact tgagaccagc
-277 acagaaacag ccagcccatg aagctggcct cccatcacac agcaaggcta gccagatgcc
      a
-217 cctcactctt ctcgggcacc attcttctcc tcccctagge cgctggtgc tcgtggtgtt
-157 tcatgtttgt tagtccatgc acggtggtga gggaggctgc tgtgtgattt gcccagcca
-97 cagcctctac aaaagcaact agaagaagac ggcagcagag ggcgcttctt caaacaccct
      g
-37 gtccaactcc tggcactgac aagtactgag tgaactcAAA CCCTCTGTAA AGTAACAGAA
      c A
+24 GTTAGAAGGG GAAATGTCGC CTCTCTGAAG
  
```

FONTE: GenBank

NOTA: Em vermelho, localização dos oligonucleotídeos iniciadores (de 5' a 3').

Realçado em azul escuro, região de hibridação da sonda monomórfica.

Realçado em vermelho, região de hibridação das sondas para a inserção CATGA, posição -558.

Realçado em rosa, região de hibridação das sondas para a posição -454.

Realçado em amarelo, região de hibridação das sondas para a posição -387.

Realçado em cinza, região de hibridação das sondas para a posição -232.

Realçado em verde claro, região de hibridação das sondas para a posição -79.

Realçado em azul claro, região de hibridação das sondas para as posições -7 e +5.

Em maiúscula, início do exon 1.

Sublinhado, nucleotídeos variáveis.

No gene *CD86* foi analisado um SNP, localizado no exon 8, posição 1057 (G, A) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – SEQUÊNCIA AMPLIFICADA DO GENE *CD86*

```
ctcaaatgtg aaatatcacc taatcttttc ttctatttct ccagagaaaa aatccatata
cctgaaagat ctTGATGAAG CCCAGCGtgt ttttaaaagt tcgaagacat cttcatgcga
caaaagtgat acatggtttt aattaaagag taaagcccat acaagta
```

FONTE: GenBank

NOTA: **Em vermelho**, localização dos oligonucleotídeos iniciadores (de 5' a 3').

Realçado em cinza, região de hibridação das sondas para a posição variável.

Sublinhado, a posição variável analisada, nucleotídeo 1057 (G, A).

Em azul, início do exon 8.

4.2.1 Amplificação Gênica

Para a análise do gene *CD80*, uma única PCR foi realizada, englobando todos os polimorfismos da região promotora (e a posição monomórfica), originando um fragmento de 690 a 695 pb (variação devida à inserção de 5pb na posição -558). Para o gene *CD86*, a região amplificada do exon 8 contém 166 pb.

A mistura de reação nos dois casos foi: tampão 1X, (Tris-HCl 75mM pH 9,0, MgCl₂ 2mM, KCl 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM), 0,2mM de dNTP, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (TABELA 3), 0,75U de Tth DNA polimerase (*Thermus thermophilus*, Biotools), 100ng de DNA genômico e H₂O ultra-pura q.s.p. 20 µl.

As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 9 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C (para *CD80*) e 52°C (para *CD86*) por 30 segundos e a 60° por 15 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; 24 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 52°C (para *CD80*) e 50°C (para *CD86*) por 45 segundos e a 65°C por 15 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 45 segundos; a etapa final de alongamento, a 72°C por 10 minutos.

A qualidade de amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Foram aplicados 4,5 µl do produto amplificado e 2 µl de tampão (0,25% azul de bromofenol, 40% p/v sucrose em H₂O bidestilada). A corrida eletroforética foi

realizada a 90 V/cm^2 por 30-40 min. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml) por aproximadamente 20 min e fotografado em luz ultravioleta.

TABELA 3 - SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *CD80* E *CD86*

LOCALIZAÇÃO	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (de 5' a 3')
Região Promotora de <i>CD80</i>	CD80PROFOR: AAGTACACTGGTCCAGCATG
	CD80PROREV: CTTTCAGAGAGGCGACATTTC
Exon 8 de <i>CD86</i>	CD86EX8FOR: CTCAAATGTGAAATATCACC
	CD86EX8REV: TACTTGTATGGGCTTTACTC

4.2.2 Confeção dos Dot-Blots

Inicialmente as membranas de nylon carregadas positivamente (Hybond N+ Amersham) foram quadriculadas manualmente ($0,25\text{cm}^2$), identificadas e recortadas. Em seguida foram hidratadas em SSPE 3X, por 15 min com agitação branda e secadas à temperatura ambiente. Foram então aplicados $1,5\mu\text{l}$ do produto de PCR de cada indivíduo nas respectivas posições (dot-blots) e as membranas secaram a 37°C por 30 min. Os produtos de PCR foram desnaturados agitando suavemente as membranas em NaOH 0,4 N por 5 minutos. Foi feita a neutralização em SSPE 3X por 10 minutos com agitação suave. Depois de bem secas, as membranas foram levadas à luz U.V. (ultravioleta) por 3 minutos a 0,120 joules ou à temperatura de 80°C por 2 horas, para fixação do DNA.

4.2.3 Marcação dos Oligonucleotídeos-Sonda

Para que seja possível visualizar o resultado da hibridação é necessário fazer a marcação dos oligonucleotídeos-sonda. Há vários tipos de detecção, porém neste trabalho optamos pela detecção por reação colorimétrica, utilizando marcação dos oligonucleotídeos-sonda com biotina. Neste processo, deoxinucleotídeos ligados à biotina (Biontin-11-dUTP) são incorporados à extremidade 3'-OH do oligonucleotídeo-sonda pela enzima Tdt (terminal transferase), na reação de marcação.

A mistura de reação utilizada foi: tampão de reação 1X, 5mM de CoCl_2 , 0,1mM de Biotin-11-dUTP (PerkinElmer), 200U de Tdt (Roche), 1 μ M do oligonucleotídeo-sonda e H_2O ultra-pura q.s.p. 10 μ l. Esta solução permaneceu em banho-maria a 37°C por 1h30min, sendo agitada e centrifugada a cada 20min.

4.2.4 Hibridação

Para realizar a hibridação, as membranas foram acondicionadas em frascos próprios para os fornos de hibridação (Hybaib). Primeiramente foram hidratadas e neutralizadas em 10ml de SSPE 4X por 10 minutos a 42°C. Esta solução foi descartada e em seguida a membrana foi tratada com solução de bloqueio (10ml de solução de hibridação com caseína), por 30 minutos a 42°C. Esta etapa foi realizada para impedir um sinal de fundo durante a revelação, o que poderia dificultar a visualização dos resultados. A hibridação das sondas foi realizada adicionando-se a cada frasco 5 picomoles do oligonucleotídeo biotilado. Esta solução permaneceu na membrana por no mínimo 1h30min a 42°C. Depois foi armazenada a -20°C, para posterior reutilização.

Transcorrida a etapa de hibridação, realizaram-se duas lavagens de baixa estrigência com 10ml de SSC 2X por 10 min a 37°C, por duas vezes. A lavagem de alta estrigência foi feita com 10ml de SSPE 5X SDS 0,1% por 20 min. A temperatura utilizada variou conforme a sonda (TABELA 4). Para o cálculo desta temperatura (T_m - *melting temperature* ou temperatura de fusão), a temperatura na qual 50% dos oligonucleotídeos-sonda está ligada ao alvo específico, foi utilizado o programa *Oligo Analyzer 3.0 (Integrated DNA Technologies)*, que considera propriedades da seqüência da sonda. Este cálculo também foi realizado manualmente a partir da fórmula $T_m = 2x(T+A) + 4x(C+G)$, que considera apenas a composição da seqüência. Partiu-se desta temperatura para a realização dos testes, até que fosse determinada empiricamente a temperatura ideal de cada sonda.

Foi realizada então a lavagem de membrana, com 10ml SSPE 3X SDS 0,5% por 10 min a 37°C. Em seguida acrescentou-se 10ml de SSPE 3X SDS 0,5% e 4 μ g do

conjugado HRP-SA (enzima peroxidase de raiz forte ligada ao anticorpo estreptoavidina – 1 mg/ml), por 30 min a 37°C. Nesta etapa, a estreptoavidina liga-se à biotina.

Foram feitas duas lavagens com 10ml SSPE 1X SDS 0,1% por 10 min a 37°C para retirar o excesso de conjugado, seguido da acidificação das membranas com 5ml de tampão citrato, por 5 min a 37°C. A revelação foi feita com solução de reação colorimétrica: 5ml de tampão citrato, 4µl H₂O₂ 3% e 150µl de TMB (tetrametilbenzeno, 2mg/ml) por 5 min a 37°C, no escuro. Nesta etapa, a enzima HRP reage com o substrato TMB em meio ácido e o TMB precipita sob a cor azul. A reação foi interrompida com H₂O dd e as membranas foram armazenadas em H₂O dd a 4°C.

Dois resultados eram possíveis: a presença de sinal apenas no dot-blot hibridado com o oligonucleotídeo-sonda específico para um dos alelos (indivíduos homocigotos para este alelo) ou presença de sinal nos dois dot-blots (indivíduos heterocigotos). Como há variações na intensidade de sinal, foram consideradas na interpretação dos resultados a qualidade do produto amplificado por PCR, a comparação entre a intensidade de sinal em cada dot-blot hibridado com sondas para a mesma posição e ainda, a intensidade de sinal do dot-blot hibridado com a sonda monomórfica (no caso do gene *CD80*).

TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA E TEMPERATURAS DE ALTA ESTRINGÊNCIA CALCULADAS E OTIMIZADAS PARA TIPAGEM DOS GENES *CD80* E *CD86*

LOCALIZAÇÃO	OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA (de 5' a 3')	T _m ¹	T _m ²	T ³
<i>CD80</i> posição - 558	CD80PRO84: GGTGGCAACCTAGTT	48,0°C	46 °C	54 °C
	CD80PROINS: TGG CATG ACAACCTA	46,4°C	44 °C	56 °C
<i>CD80</i> posição - 454	CD80PRO184C1: TGTCCAG CGT GGCTG	55,5°C	50 °C	-
	CD80PRO184A2: TGTCCAG AGT GGCTG	50,8°C	48 °C	-
<i>CD80</i> posição - 387	CD80PRO251T1: GGTGGT CTT GTGAGC	49,7°C	48 °C	56 °C
	CD80PRO251C2: GGTGGT CCT GTGAGC	52,2°C	50 °C	56 °C
<i>CD80</i> posição - 232	CD80PRO406G1: ACAGCAA GG CTAGCC	51,7°C	48 °C	56 °C
	CD80PRO406A2: ACAGCAA AG CTAGCC	48,9°C	46 °C	52 °C
<i>CD80</i> posição - 79	CD80PRO559G1: AAAGCAA GT AGAAGA	39,6°C	40 °C	-
	CD80PRO559C2: AAAGCAA CT AGAAGA	39,6°C	40 °C	-
<i>CD80</i> posições - 7 e +5	CD80PRO631T1: GAGTGA ACT CAAAC CTC	50,0°C	54 °C	56 °C
	CD80PRO631C2: GAG CGA ACTCAAAC ACTC	50,3°C	54 °C	56 °C
<i>CD80</i> posição - 607	CD80PROSON+: TCACTCACAGGGGCT	52,5°C	48 °C	52 °C
<i>CD86</i> posição 1057	CD86EX8SA1: TGATGAA ACC CAGCG	52,1°C	46 °C	48 °C
	CD86EX8SG2: TGATGAA AGC CCAGCG	48,9°C	48 °C	48 °C

T_m¹= T_m calculada pelo programa *Oligo Analyzer 3.0*

T_m²= T_m calculada pela fórmula 2x(T+A) + 4x(C+G)

T³= Temperatura de alta estringência otimizada.

4.2.5 Desibridação

As membranas podem ser reutilizadas para hibridações posteriores, desde que desibridadas. Foram testados quatro protocolos, com variações nas soluções e temperaturas utilizadas. Os dois que forneceram melhores resultados foram:

Descolorir a membrana com etanol 80% até que não reste nenhuma cor. Nesta etapa retira-se o TMB que está precipitado sobre a membrana. Para desibridar a sonda, as membranas ficam em solução de desibridação I por 30 min em banho-maria a 56°C, com agitação suave. Em seguida é feita uma lavagem com solução de desibridação II nas mesmas condições. As membranas são colocadas em H₂O dd para retirar o excesso de solução e então armazenadas em H₂O dd a 4°C.

Em um outro protocolo (13° IHWC, 2000), a sonda é desibridada em solução de 500 ml de H₂O dd e 0,5 ml de SDS 10%. Esta solução é previamente fervida por 5min em microondas. Após 10 min nesta solução, são feitas duas lavagens com SSC 2X a temperatura ambiente. Esse protocolo foi escolhido para a continuidade do trabalho por não utilizar NaOH e, portanto, danificar menos a membrana.

4.2.6 Soluções Utilizadas

<u>SSPE 20X</u>	Quantidade	Concentração final
NaCl	175,32g	3M
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	27,6g	0,2M
EDTA-Na ₂	7,4g	0,02M
H ₂ Odd	q.s.p. 1L	

Ajustar para pH 7,4 adicionando NaOH 10N.

<u>SSC 20X</u>	Quantidade	Concentração final
NaCl	175,3g	3M
Citrato de sódio 2H ₂ O	88,2g	0,3M
H ₂ Odd	q.s.p. 1L	

Ajustar para pH 7,0 adicionando HCl 1M.

<u>Solução de hibridação com caseína</u>	Quantidade	Concentração final
SSC 20X	250ml	5X
Caseína	2,5g	0,25%
N Lauril sarcosil 10%	10ml	0,1%
SDS 10%	2ml	0,02%
H ₂ Odd	q.s.p. 1L	

<u>Tampão Citrato</u>	Quantidade	Concentração final
Citrato trissódico 2 H ₂ O	29,4g	0,1M
H ₂ Odd	q.s.p. 1L	

Ajustar para pH 5,0 adicionando ácido cítrico H₂O

<u>Solução de desibridação I</u>	Quantidade	Concentração final
NaOH	16g	0,4N
SDS 10%	10ml	0,1%
H ₂ Odd	q.s.p. 1L	

<u>Solução de desibridação II</u>	Quantidade	Concentração final
TrisHCl 2M pH7,5	100ml	0,2M
SSPE 20X	5ml	0,1X
SDS 10%	50ml	0,5%
H ₂ Odd	q.s.p. 1L	

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

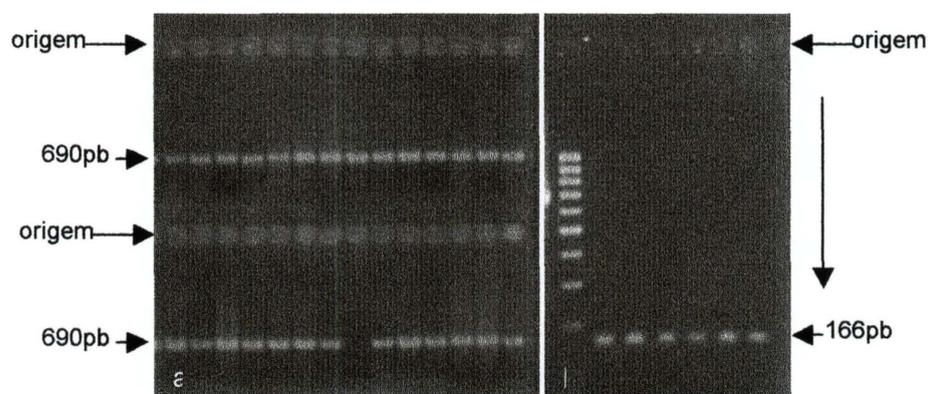
Os genótipos foram incluídos no banco de dados do LGMH, no formato Access. Através do programa CONVERT 1.1 (PROBST, 1998), foram obtidas as frequências genotípicas. Através do pacote de programas ARLEQUIN v. 2.000 (SCHNEIDER et al., 2000) foram calculadas as frequências alélicas, por contagem direta, e haplotípicas, pelo método de máxima verossimilhança empregando o algoritmo EM (maximização da expectativa). Neste mesmo programa foi realizada a estimativa do valor de D' . O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado pela comparação da frequência observada dos genótipos com aquela esperada em equilíbrio através do teste de GUO e THOMPSON (1992). A comparação da população estudada com outras populações foi realizada através do teste de qui-quadrado utilizando tabelas de contingência, com o auxílio do programa RXC (MILLER, 1997), adotando limite de significância $P=0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 METODOLOGIA

A amplificação por PCR foi concluída com sucesso para os dois genes, sendo mais eficiente com o uso da Tth DNA polimerase do que com a Taq DNA polimerase. A amplificação da região promotora do gene *CD80* gerou um fragmento de 690 a 695 pb. Já para o gene *CD86* o fragmento amplificado por PCR contém 166 pb (FIGURA 7).

FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DE GEL DE AGAROSE APÓS CORRIDA ELETOFORÉTICA COM PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE *CD80* (a) E *CD86* (b) E MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR



Para a escolha do protocolo a ser utilizado na hibridação foram testados três protocolos com variações em cada um deles, alterando as soluções e as concentrações utilizadas e também o lote dos reagentes. Após vários testes o protocolo de hibridação foi definido, apresentando bons resultados para as sondas testadas. Porém, não havendo boa reprodutibilidade de resultados, novos testes foram realizados.

Dois problemas principais foram detectados. O primeiro foi a presença de sinais muito fracos ou mesmo ausência de sinal nos dot-blots e o segundo foi a falha na desibridação, impedindo a posterior reutilização dos dot-blots para outras sondas.

Esses problemas podem estar relacionados às soluções utilizadas na hibridação e desibridação das membranas. Assim, a possibilidade de erro na concentração e

composição das soluções foi considerada, porém descartada, pois todas as soluções foram refeitas e o resultado da hibridação não se alterou.

A baixa intensidade de sinal na hibridação pode ocorrer se parte dos oligonucleotídeos-sonda não tiver sido marcada com biotina na reação de marcação e, portanto, a sonda liga-se ao alvo, mas não é detectada. A concentração dos oligonucleotídeos-sonda foi quantificada novamente e as marcações com biotina também foram repetidas seguindo-se três protocolos e reagentes de diferentes lotes e, portanto, estas variáveis também foram descartadas como possíveis causas do problema.

Os sinais fracos também podem ocorrer devido a falhas na etapa de revelação, na reação colorimétrica. Para investigar esta possibilidade, diferentes alíquotas dos reagentes HRP-SA (conjugado) e TMB (substrato) foram testadas, também sem melhora na qualidade de hibridação.

Outro fator considerado, tanto para a intensidade baixa de sinal nos dot-blots quanto para a desibridação, é o lote de membranas utilizado. Um teste foi realizado comparando dois lotes de membranas e o resultado da hibridação foi pior nas membranas utilizadas neste trabalho, embora ainda houvesse resquícios da sonda em todas as membranas. Esta pode ser uma das causas da dificuldade de desibridação das sondas.

Na tentativa de solucionar a falha nas desibridações, quatro protocolos de desibridação (incluindo variações no tempo e temperatura de cada um deles) foram testados realizando-se uma hibridação, desibridação e nova hibridação sem a adição dos oligonucleotídeos-sonda, a fim de detectar se havia resquícios de sonda da hibridação anterior ligada aos produtos na membrana. Nenhum dos protocolos de desibridação eliminou completamente as sondas, embora alguns apresentassem resultados mais eficazes do que os outros.

Para a solução desses problemas, serão testados novos lotes de membrana e reagentes. Se os resultados forem positivos, serão confeccionadas novas membranas para a realização das hibridações.

5.2 ANÁLISE POPULACIONAL

Para a amostra de euro-brasileiros foram calculadas as frequências alélicas, genotípicas e de indivíduos portadores dos alelos. A amostra encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos analisados: *CD80*, posição -558 e -387 ($P \sim 1$), -232 ($P=0,58866$), -7/+5 ($P=0,15756$) e *CD86*, posição 1057 ($P=0,62683$). Para as amostras de afro-brasileiros, descendentes de orientais e mestiços, as análises estatísticas também foram realizadas, mas por se tratar de um número muito pequeno de indivíduos os resultados podem não ser representativos destes grupos, como indica o grande desvio encontrado para as frequências alélicas. O mesmo ocorre para as posições -232 e -558 do gene *CD80* e a posição 1057 do exon 8 do gene *CD86*, sendo necessário aumentar o tamanho da amostra analisada. A análise dos 37 indivíduos consanguíneos não mostrou nenhuma incoerência nas tipagens.

5.2.1 *CD80*

Na hibridação da sonda monomórfica foi obtido um excelente resultado, propiciando boa discriminação de sinais positivos e negativos para as demais sondas, com um bom controle de amplificação. Porém não houve reprodutibilidade de resultados, como já foi citado anteriormente (página 23).

Na análise da posição -387 da região promotora do gene *CD80* foram alcançados excelentes resultados, com dot-blots bastante dicotômicos e de sinal forte, facilitando a leitura (FIGURA 8). A temperatura de alta estringência (T_m) otimizada para as sondas desta posição foi de 56 °C, sendo que as temperaturas calculadas foram 49,7 °C para a sonda do alelo T e 52,5 °C para o alelo C. A variação de intensidade de sinal encontrada deve-se a diferenças na qualidade do DNA amplificado. As frequências encontradas são mostradas na tabela 5.

FIGURA 8 – MEMBRANAS TESTE DAS SONDAS PARA A POSIÇÃO -387 DO GENE *CD80*. SÃO MOSTRADAS AS HIBRIDAÇÕES COM AS SONDAS ESPECÍFICAS PARA OS ALELOS T E C, RESPECTIVAMENTE

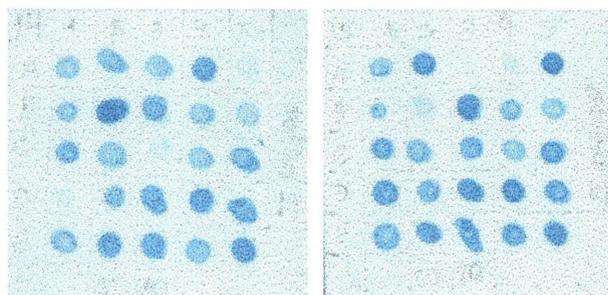


TABELA 5 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -387 (T, C), LOCALIZADO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

	Euro-brasileiros (n=125)	Afro-brasileiros (n=13)	Descendentes de orientais (n=13)	Mestiços (n=6)
Alélicas				
CD80PRO – 387*T	115 (46,0 ± 3,1)	17 (65,4 ± 9,5)	18 (69,2 ± 9,2)	7 (58,3 ± 14,1)
CD80PRO – 387*C	135 (54,0 ± 3,1)	9 (34,6 ± 9,5)	8 (30,8 ± 9,2)	5 (41,7 ± 14,1)
Genotípicas				
TT	26 (20,8)	N.A.	N.A.	N.A.
TC	63 (50,4)	N.A.	N.A.	N.A.
CC	36 (28,8)	N.A.	N.A.	N.A.
Portadores				
CD80PRO – 387*T	89 (71,2)	N.A.	N.A.	N.A.
CD80PRO – 387*C	99 (79,2)	N.A.	N.A.	N.A.
<i>P</i> (H-W)	~ 1	N.A.	N.A.	N.A.

NOTA: Entre parênteses, frequência relativa em porcentagem ± desvio; NA: não analisado. *P* (H-W): valor de *P* no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Devido a proximidade das posições -7 e +5 do gene *CD80*, estes SNPs foram analisados simultaneamente com o uso de oligonucleotídeos-sonda cuja seqüência abrange as duas posições. Uma vez que já foi relatado desequilíbrio de ligação absoluto entre as variantes destes SNPs na população japonesa, apenas duas sondas foram empregadas na tipagem, com a combinação -7*T₋+5*C e -7*C₋+5*A. Futuramente serão utilizadas sondas para as outras duas combinações genotípicas, pois estas podem ocorrer em outras populações. Para estas sondas o resultado obtido nos testes de hibridação foi excelente, com sinais fortes e bem dicotômicos. Porém não foi possível obter reprodutibilidade de resultados, e nas hibridações posteriores a intensidade do sinal nos dot-blots encontrou-se bastante reduzida. Mesmo assim, a dicotomia apresentada foi considerada suficiente para que se pudesse realizar

discriminação alélica, e a leitura das membranas foi facilitada pela utilização da sonda monomórfica. Essa sonda ajudou a diferenciar sinais positivos de negativos através da comparação da intensidade de sinal entre a sonda monomórfica e a sonda a ser analisada. A temperatura de lavagem de alta estringência otimizada foi de 56 °C, sendo as temperaturas calculadas de 50 °C para a sonda T e 50,3 °C para a sonda C. As frequências encontradas são mostradas na tabela 6.

Foram obtidas também as frequências haplotípicas das posições -387, -7 e +5 da região promotora do gene *CD80* (TABELA 7). Estes SNPs encontram-se em desequilíbrio de ligação absoluto ($P \sim 0$ e $D' = 1$).

TABELA 6 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DOS SNPs -7 (T, C) E +5 (A, C), LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

	Euro-brasileiros (n=114)	Afro-brasileiros (n=11)	Descendentes de orientais (n=10)	Mestiços (n=5)
Alélicas				
CD80PRO -7*T +5*C	202 (88,6 ± 2,1)	17 (77,3 ± 9,1)	19 (95,0 ± 4,9)	9 (90,0 ± 9,7)
CD80PRO -7*C +5*A	26 (11,4 ± 2,1)	5 (22,7 ± 9,1)	1 (5,0 ± 4,9)	1 (10,0 ± 9,7)
Genotípicas				
- 7 TT / +5 CC	91 (79,8)	N.A.	N.A.	N.A.
- 7 TC / +5 CA	20 (17,5)	N.A.	N.A.	N.A.
-7CC / +5 AA	3 (2,6)	N.A.	N.A.	N.A.
Portadores				
CD80PRO -7*T +5*C	111 (97,4)	N.A.	N.A.	N.A.
CD80PRO -7*C +5*A	23 (20,2)	N.A.	N.A.	N.A.
<i>P</i> (H-W)	0,15756	N.A.	N.A.	N.A.

NOTA: Entre parênteses, frequência relativa em porcentagem ± desvio; NA: não analisado. *P* (H-W): valor de *P* no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

TABELA 7 – FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELA COMBINAÇÃO DOS SNPs -387 -7 +5, LOCALIZADOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

Haplótipo	Euro-brasileiros (n=114)
-387*C -7*T +5*C	54,4 ± 3,5
-387*T -7*C +5*A	11,4 ± 2,1
-387*T -7*T +5*C	34,2 ± 3,2

NOTA: Frequência relativa em porcentagem ± desvio.

Para as posições -558 e -232 da região promotora do gene *CD80* foram obtidos bons resultados nos testes de hibridação, com dot-blots apresentando sinal fraco, porém dicotômico. Como não houve reprodutibilidade de resultados, poucos

indivíduos foram tipados e as frequências encontradas (TABELA 8) podem não ser representativas da população analisada.

TABELA 8 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -232 (A, G) E INSERÇÃO -558, LOCALIZADAS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

Euro-brasileiros (n=18)		Euro-brasileiros (n=20)	
Alélicas		Alélicas	
CD80PRO -558*84	31 (86,1 ± 5,7)	CD80PRO -232*A	11 (27,5 ± 7,3)
CD80PRO - 558*INS	5 (13,9 ± 5,7)	CD80PRO - 232*G	29 (72,5 ± 7,3)
Genotípicas		Genotípicas	
84/84	13 (72,2)	A/A	2 (10,0)
84/INS	5 (27,8)	A/G	7 (35,0)
INS/INS	0	G/G	11 (55,0)
Portadores		Portadores	
CD80PRO -558*84	18 (100)	CD80PRO -232*A	9 (45,0)
CD80PRO - 558*INS	5 (27,8)	CD80PRO - 232*G	18 (90,0)
<i>P</i> (H-W)	~ 1	<i>P</i> (H-W)	0,58866

NOTA: Entre parênteses, frequência relativa em porcentagem ± desvio. *P* (H-W): valor de *P* no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para as posições -454 e -79 da região promotora do gene *CD80* as hibridações não apresentaram bons resultados, com sinais muito fracos e pouco dicotômicos nos dot-blots. Além dos problemas já discutidos, há a possibilidade de que estas sondas apresentem sinal fraco devido à própria sequência da sonda, que pode variar na sua capacidade de se ligar especificamente ao alvo.

5.2.2 *CD86*

Para o gene *CD86*, os resultados obtidos foram bons, com sinais razoavelmente fortes e bastante dicotômicos, o que é essencial para a discriminação dos genótipos. A temperatura de lavagem de alta stringência foi de 48 °C, sendo as temperaturas calculadas 52,1 °C para a sonda G e 48,9 °C para a sonda A. A sonda monomórfica já foi encomendada, porém não foi recebida a tempo para que pudessem ser iniciados os testes. Para este gene também não foi obtida a reprodutibilidade de resultados, o que impediu a tipagem da amostra total. As frequências apresentadas

referem-se ao número de indivíduos (n=23) utilizados nos testes de hibridação (TABELA 9).

TABELA 9 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP 1057 (A, G), LOCALIZADO NO EXON 8 DO GENE *CD86*

Euro-brasileiros (n=23)	
Alélicas	
CD86EX8+1057*A	13 (28,3 ± 6,7)
CD86EX8+1057*G	33 (71,7 ± 6,7)
Genotípicas	
A/A	1 (4,3)
A/G	11 (47,8)
G/G	11(47,8)
Portadores	
CD86EX8+1057*A	12 (52,2)
CD86EX8+1057*G	22 (95,6)
<i>P</i> (H-W)	0,62683

NOTA: Entre parênteses, frequência relativa em porcentagem ± desvio.
P (H-W): valor de *P* no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

6 DISCUSSÃO

Embora não se conheça todas as funções desempenhadas pelas moléculas CD80 e CD86, sabe-se que elas têm um papel crucial nas respostas imunes, participando da ativação dos linfócitos T. Devido a este importante papel na imunidade, iniciou-se uma busca por polimorfismos nos genes que codificam estas moléculas, pois estes poderiam não só auxiliar na compreensão da função das proteínas CD80 e CD86, como também poderiam estar envolvidos na patogênese de muitas doenças. Estes estudos são recentes, mas muitas variações já foram descritas, algumas delas estando associadas com rejeição de transplantes e esclerose sistêmica (MARÍN et al., 2005 e ABDLLAH et al., 2006).

Estudos populacionais envolvendo os genes *CD80* e *CD86* são importantes na caracterização das populações e melhor compreensão das variações gênicas, contribuindo para o melhor entendimento de suas funções. É preciso analisar um maior número de populações para que seja possível realizar comparações entre elas e fazer inferências a respeito da evolução destes genes e seus polimorfismos e também sobre a evolução das populações. A análise da população brasileira é de especial interesse devido ao alto grau de miscigenação e heterogeneidade, pois pode trazer mais informações a respeito de fatores evolutivos.

Os polimorfismos escolhidos para este estudo localizam-se na região promotora do gene *CD80* e no exon 8 do gene *CD86* e o método escolhido para a tipagem foi PCR-SSOP. A amplificação por PCR foi concluída com sucesso, porém algumas dificuldades foram encontradas na hibridação e desibridação das sondas, provavelmente relacionadas aos reagentes utilizados e às próprias membranas, fatores que levam a falta de reprodutibilidade dos resultados, com grandes variações na intensidade dos sinais nos dot-blots. Estes problemas serão solucionados através de testes utilizando-se novos reagentes e membranas.

6.1 *CD80*

No gene *CD80* foram selecionados sete polimorfismos localizados na região promotora. Os SNPs das posições -387, -7 e +5 foram tipados para a amostra total, com excelentes resultados na hibridação. Já os SNPs das posições -558 e -232 foram tipados em uma subamostra utilizada para os testes de hibridação, uma vez que não foi possível obter reprodutibilidade na intensidade de sinal dos dot-blots. Para as posições -454 e -79 os sinais na hibridação ficaram muito fracos e pouco dicotômicos, não sendo possível realizar as tipagens. Novos testes serão realizados e possivelmente outros protocolos de marcação de sonda serão testados.

As posições -558, -454, -387, -232, -79, -7 e +5 foram analisadas primeiramente na população japonesa, na qual foram descritas, porém apenas as frequências haplotípicas da região promotora estão disponíveis. Posteriormente estes SNPs (com exceção de -558 e +5) foram analisados em australianos (TABELAS 10, 11, 12 e 13). As frequências encontradas em nossa população de euro-brasileiros para as posições -387 e -7 não diferem estatisticamente das descritas para esta população ($P=0,152$ e $0,198$, respectivamente), porém diferem da população japonesa para as posições -387 ($P\sim 0$), -7 e +5 ($P=0,02412$). A semelhança com a população australiana era esperada, uma vez que a amostra da população australiana analisada é composta por indivíduos de ascendência européia, 90% do norte da Europa. As amostras de afro-brasileiros, descendentes de orientais e mestiços não foram comparadas estatisticamente devido ao pequeno tamanho das amostras.

Na comparação dos haplótipos da região promotora do gene *CD80*, as frequências da nossa população foram semelhantes às descritas em australianos ($P=0,37268$), porém foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre euro-brasileiros e japoneses ($P\sim 0$).

TABELA 10 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -387 (T, C) DO GENE *CD80*

	Euro-Brasileiros (n=125) (1)	Australianos (n=118) (2)	Japoneses * (n=270) (3)
Alélicas			
CD80PRO -387*C	135 (54,0)	143 (61,0)	130 (24,0)
CD80PRO -387*T	115 (46,0)	93 (39,0)	410 (76,0)
Genotípicas			
C/C	36 (28,8)	42 (36,0)	-
C/T	63 (50,4)	59 (50,0)	-
T/T	26 (20,8)	17 (14)	-
Portador			
C	99 (79,2)	101 (85,6)	-
T	89 (71,2)	76 (64,0)	-

FONTE: (1) Nosso estudo; (2) TEUTSCH et al., 2004; (3) MATSUSHITA et al., 2000

NOTA: Entre parênteses frequência relativa em porcentagem.

* frequências alélicas calculadas a partir das frequências haplotípicas.

TABELA 11 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -7 (T, C), DO GENE *CD80*

	Euro-brasileiros (n=115) (1)	Australianos (n=117) (2)	Japoneses* (n=270) (3)
Alélicas			
CD80PRO -7*T	202 (88,6)	216 (92,0)	443 (82,0)
CD80PRO -7*C	26 (11,4)	18 (8,0)	97 (18,0)
Genotípicas			
T/T	91 (79,8)	101 (86,0)	-
T/C	20 (17,5)	14 (12,0)	-
C/C	3 (2,6)	2 (2,0)	-
Portador			
T	111 (97,4)	115 (98,3)	-
C	23 (20,2)	16 (13,7)	-

FONTE: (1) Nosso estudo; (2) TEUTSCH et al., 2004; (3) MATSUSHITA et al., 2000

NOTA: Entre parênteses frequência relativa em porcentagem.

* frequências alélicas calculadas a partir das frequências haplotípicas.

TABELA 12 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DAS VARIANTES DO SNP +5 (A, C) E INSERÇÃO DA POSIÇÃO -558 DO GENE *CD80*

	Euro-brasileiros (n=115) (1)	Japoneses * (n=270) (2)
Alélicas		
CD80PRO +5*C	202 (88,6)	443 (82,0)
CD80PRO +5*A	26 (11,4)	97 (18,0)
CD80PRO -558*84	31 (86,1)	443 (82,0)
CD80PRO -558*INS	5 (13,9)	97 (18,0)

FONTE: (1) Nosso estudo; (2) MATSUSHITA et al., 2000

NOTA: Entre parênteses frequência relativa em porcentagem.

* frequências alélicas calculadas a partir das frequências haplotípicas.

Para a posição -232 as comparações também foram realizadas (TABELA 13) e as amostras de euro-brasileiros e australianos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P=0,00026$). Isto possivelmente deve-se ao pequeno tamanho da nossa amostra e a erros de tipagem, e estas freqüências podem não são representativas da população estudada. A amostra analisada de nossa população, diferentemente do resultado encontrado para outros polimorfismos analisados, foi semelhante aos japoneses para as posições -232 ($P=0,15376$) e -558 ($P=0,6558$). Após a análise da amostra total dos indivíduos, as comparações serão refeitas.

TABELA 13 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP -232 (A, G), DO GENE *CD80*

	Euro-brasileiros (n=20) (1)	Australianos (n=116) (2)	Japoneses* (n=270) (3)
Alélicas			
CD80PRO -232*A	11 (27,5)	16 (7,0)	97 (18,0)
CD80PRO -232*G	29 (72,5)	216 (93,0)	443 (82,0)
Genotípicas			
A/A	2 (10,0)	1 (1,0)	-
A/G	7 (35,0)	14 (12,0)	-
G/G	11 (55,0)	101 (87,0)	-
Portador			
A	9 (45,0)	15 (12,9)	-
G	18 (90,0)	115(99,0)	-

FONTE: (1) Nosso estudo; (2) TEUTSCH et al., 2004; (3) MATSUSHITA et al., 2000

NOTA: (E) representa a amostra euro-brasileira;

Entre parênteses, freqüência relativa em porcentagem.

* freqüências alélicas calculadas a partir das freqüências haplotípicas.

6.2 *CD86*

No gene *CD86* foi analisado um polimorfismo localizado no exon 8, posição 1057, que causa uma substituição de nucleotídeo (A304T), introduzindo um potencial sítio de fosforilação na região citoplasmática da molécula. Entretanto, não sabemos se esta variação leva a alguma diferença funcional. Este SNP foi analisado em cinco populações (TABELA 14). Na comparação das freqüências obtidas para euro-brasileiros, foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas com a amostra de japoneses da cidade de Tokyo ($P\sim 0$). Dentre as demais populações, a finlandesa foi a que mais se diferenciou da brasileira ($P=0,5251$).

Embora a amostra analisada de euro-brasileiros seja pequena, as frequências encontradas provavelmente são representativas da população, uma vez que são muito semelhantes às encontradas em outras populações européias ou de ascendência européia da Austrália ($P \sim 1$), França ($P \sim 1$), Grã-Bretanha ($P = 0,86474$) e Finlândia ($P = 0,5251$). A população japonesa difere muito de todas as demais populações já estudadas para este polimorfismo, sendo a única na qual o alelo A é o mais freqüente.

TABELA 14 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DO SNP 1057 (A, G), EXON 8 DO GENE *CD86*

	Euro-brasil. (n=23) (1)	Franceses (n=60) (2)	Bretões (n=227) (3)	Finlandeses (n=611) (4)	Australianos (n=116) (5)	Japoneses (n=168) (6)
Alélicas						
CD86EX8 1057*G	33 (71,7)	87 (72,5)	331 (73,0)	807 (66,0)	167 (72,0)	113 (34,0)
CD86EX8 1057*A	13 (28,3)	33 (27,5)	123 (27,0)	415 (34,0)	65 (28,0)	223 (66,0)
Genotípicas						
G/G	11(47,8)	31 (51,7)	118 (52,0)	263 (43,0)	59 (51,0)	18 (10,7)
G/A	11 (47,8)	25 (41,7)	95 (42,0)	284 (46,5)	49 (42,0)	77 (45,8)
A/A	1 (4,3)	4 (6,6)	14 (6,0)	64 (10,5)	8 (7,0)	73 (43,5)
Portador						
G	22 (95,6)	56 (93,3)	213 (94,0)	547 (89,5)	108 (93,0)	95 (56,5)
A	12 (52,2)	9 (48,3)	109 (48,0)	348 (57,0)	57 (49,1)	150 (89,3)

FONTE: (1) Nosso estudo; (2) DELNESTE et al., 2000; (3) ABDALLAH et al., 2006; (4)TURPEINEN et al., 2002; (5) TEUTSCH et al., 2004; (6) MATSUSHITA et al., 2000;

NOTA: (E) representa amostra euro-brasileira; Entre parênteses frequência relativa em porcentagem.

7 CONCLUSÃO

Foram obtidos bons resultados com a técnica de PCR-SSOP, porém não houve reprodutibilidade e, portanto, novos testes serão realizados.

As análises foram completadas para as posições -387, -7 e +5, porém apenas resultados parciais foram obtidos para -558 e -232. Para os SNPs -454 e -79 não foi possível realizar as tipagens.

As frequências em euro-brasileiros são: -387*T 46,0%, -7*C_+5*A 11,4%, -558*INS 13,9%, -232*A 27,5% e 1057*A 28,3%. As posições -387, -7 e +5 estão em desequilíbrio de ligação absoluto ($P \sim 0$ e $D' = 1$). A amostra encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos analisados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABDALLAH, A. M.; RENZONI, E. A.; ANEVIAVIS, S.; LAGAN, A. L.; MUNKONGE, F. M.; FONSECA, T. C.; BLACK, C. M.; BRIGGS, D.; WELLS, S. A. U.; MARSHALL, S. E.; McHUGH, N.; BOIS, R. M. du; WELSH, K. I. A polymorphism in the promoter region of the *CD86* (B7.2) gene is associated with systemic sclerosis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 33, p. 155-161, 2006.

ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-Cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Reviews**, v.1, p.220-228, 2001.

BATHIA, S.; EDININ, M.; ALMO, S.C.; NATHENSON, S.G. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. **Immunology Letters**, 2006.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos Genes nas Famílias e nas Populações**. 2 ed., Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

BRAUN-PRADO, K.; MION, A. L. V.; PEREIRA, N. F.; CULPI, L.; PETZLERER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v.56, p. 417-427, 2000.

CAVALLI-SFORZA, L. L. The DNA revolution in population genetics. v.14 n.2 **Trends Genetics**, v.14, p.60-65, 1998.

CAVALLI-SFOZA, L.L.; FELDMAN, M.W. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. **Nature genetics supplement**, v. 33, 2003.

DELNESTE, Y.; BOSOTTI, R.; MAGISTRELLI, G.; BONNEFOY, J.Y; GAUCHAT, J.F. Detection of a polymorphism in éxon 8 of the human *CD86* gene. **Immunogenetics**, v.51, p. 762-763, 2000.

GenBank. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em:28.06.2006.

GREENWALD, R.J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 Family Revisited. **Annual Reviews Immunology**, v.23 p.515-548, 2005.

SUZUKI, D.T.; GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Introdução à Genética. 6 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

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

HLA Class I and II DNA-Based Typing, Sequence specific Oligonucleotide Probe Typing, Technical Manual/ Reference Protocols. **13^o International Histocompatibility Workshop**, version 1.1, 2000.

Instituto Brasileiro de geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2000**. Disponível em:<ftp://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Demografico_2000/populacao/Grandes_Regioes/>. Acesso em 09 de junho de 2006.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. O sistema immune na saúde e na doença. 5. ed., Porto Alegre: Artmed, 2002.

JEANNIN, P.; MAGISTRELLI, G.; AUBRY, J. P.; CARON, G.; GAUCHAT, J. F.; RENNO, T.; HERBAULT, N.; GOETSCH, L.; BLAECHE, A; DIETRICH, P. Y.; BONNEFOY, J. Y.; DELNESTE, Y. Soluble *CD86* is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. **Immunity**, v.13, p. 303-312, 2000.

JELLIS, C. L.; WANG, S. S.; RENNERT, P.; BORRIELLO, F.; SHARPE, A. H.; GREEN, N. R.; GRAY, G. S. Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (*CD86*). **Immunogenetics**, v.42, p. 85-89, 1995.

JUNE, C. H.; BLUESTONE, J. A.; NADLER, L. M.; THOMPSON, C. B. The B7 and CD28 receptor families. **Immunology Today**, v.15, p.321-330, 1994.

KEIR, E. M.; SHARPE, A. H. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. **Immunological Reviews**, v.204 p.128-143, 2005.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v.19, p. 5444, 1991.

MAGISTRELLI, G.; CARON, G.; GAUCHAT, J-F.; JEANNIN, P.; BONNEFOY, J-Y.; DELNESTE, Y. Identification of an Alternatively Spliced Variant of Human CD86 mRNA. **Biochemical and Biophysical Research communications.**, v.280, p.1211-1215, 2001.

MARÍN, L. A.; MOYA-QUILES, M. R.; MIRAS, M.; MRO, M.; MINGUELA, A.; BERMEJO, J.; RAMÍREZ, P.; GARCÍA-ALONSO, A. M.; PARRILLA, P.; ALVAREZ-LÓPEZ, M. R. Evaluation of *CD86* gene polymorphism at + 1057 position in liver transplant recipients. **Transplant immunology**, v.15, p. 69-74, 2005.

MATSUSHITA, M.; TSUCHIYA, N.; OKA, T.; TOKUNAGA, K. New polymorphisms of human *CD80* and *CD86*: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Genes and Immunity**, v.7, p. 428-434, 2000.

MILLER, M. P. RXC: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer. **Department of Biological Sciences**, Northern Arizona University, Flstaff, 1997.

Oligo Analyzer 3.0. Integrated DNA Technologies. Disponível em <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>>. Acesso em 28.06.2006.

PARHAM, P. **O Sistema Imune.** Tradução Bolner, A R. 1ª edição. Porto Alegre, 2001.

PINCERATI, M. R. **Polimorfismo do gene *CD80* em populações caucasóide e indígena do Estado do Paraná.** Curitiba, 2004. 34f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

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

PROBST, C.M.; BOMPEIXE, E.P.; PEREIRA, N.F.; DE O DALALIO M.M.; VISENTAINER, J.E.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. HLA polymorphisms and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Human Biology**, v.72, p.597-617, 2000.

SANSOM, D.M.; MANZOTTI, C.M.; ZHENG, Y. What's the difference between CD80 and CD86? **TRENDS in Immunology**, v.24, p.313-318, 2003.

SELVAKUMAR , A., MOHANRAJ, B. K.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; WHITE, P. C.; DUPONT, B. Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7. **Immunogenetics**, v.36, p. 175-181, 1992.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin v. 2.000**: a software for population genetic data analysis. Genebra: Genetics and Biometry Laboratory, Dept. of Anthropology, University of Genebra, 2000.

TEUTSH, S. M.; BOOTH, D. R.; BENNETTS, B. H.; HEARD, R. N. S.; STEWART, G. J. Association of common T cell activation gene polymorphism with multiple sclerosis in Australian patients. **Journal of Neuroimmunology**, v.148, p. 218-230, 2004.

TURPEINEN, H.; LAINE, A.-P.; NEJENTSEV, S.; SJÖROOS, M.; SIMELL, O.; VEIJOLA, R.; KNIP, M.; AKERBLOM, H. K.; ILONEN, J. *CD86* Gene polymorphisms: no association with Type I diabetes among Finnish subjects. **Diabetologia**, v.45, p.1041-1042, 2002.

WEINSHENKER, B. G.; HEBRINK, D. D.; KLEIN, C.; ATKINSON, E. J.; O'BRIEN, P. C.; McMURRAY, T. Genetic variation in the B7-1 gene in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.105, p. 184-188, 2000.