

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁRCIA HOLSBACH BELTRAME

**ESTUDO DE POPULAÇÕES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES E EVOLUÇÃO
DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CD80* E *CD86***

CURITIBA

2008

MÁRCIA HOLSBACH BELTRAME

**ESTUDO DE POPULAÇÕES DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES EVOLUÇÃO
DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CD80* E *CD86***

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-
Eler

**CURITIBA
2008**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Beltrame, Márcia Holsbach

Estudo de populações de diferentes ancestralidades e evolução de polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86*. / Márcia Holsbach Beltrame. – Curitiba, 2008.

89 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Luiza Petzl-Erler

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

1. Genética de populações 2. Evolução (Biologia) 3. Hereditariedade
I. Título II. Petzl-Erler, Maria Luiza III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

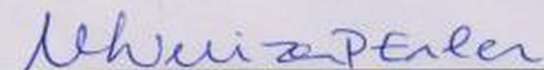
CDD (20. ed.) 575.15

PARECER

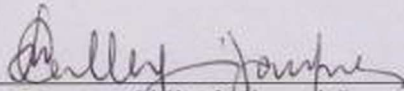
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **MÁRCIA HOLSBACH BELTRAME** para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

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

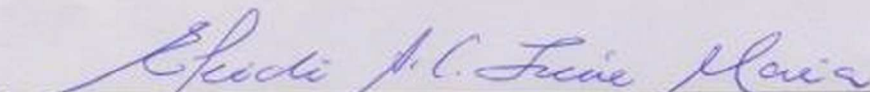
Curitiba, 24 de Novembro de 2008



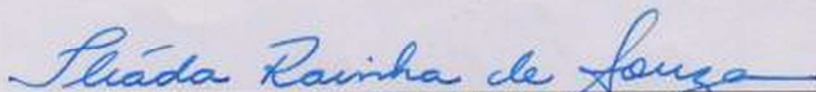
Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Orientadora e Presidente



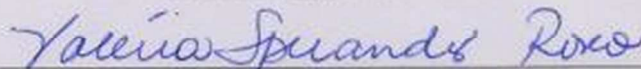
Professora Doutora Sidia Callegari-Jacques
Membro Titular (*ad hoc*)



Professora Doutora Eleidi Alice Chautard Freire-Maia
Membro Titular



Professora Doutora Iliada Rainha de Souza
Membro Suplente



Professora Doutora Valéria M. M. Sperandio Roxo
Membro Suplente

Visto:



Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPQ e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

A todos os voluntários que doaram preciosas amostras de sangue para que pudéssemos realizar nossos projetos. À professora Eleidi Freire-Maia, pelas amostras de afro-brasileiros e à professora Luiza Tamie Tsuneto pelas amostras de descendentes de japoneses.

À professora Maria Luiza, pela orientação atenciosa, por todos os ensinamentos, pela compreensão e incentivo nestes quase cinco anos.

Aos professores Valéria Roxo, Enilze Ribeiro, Eleidi Freire-Maia, Marcelo Mira e Maria da Graça pelas correções e sugestões na banca de acompanhamento e de progressão. Ao professor Ricardo pela ajuda com as análises estatísticas.

Às professoras Sidia Callegari-Jacques, Eleidi Freire-Maia e Ilíada Rainha de Souza pelas correções e valiosas sugestões para este trabalho.

Aos meus colegas do LGMH, pela ajuda em todos os momentos. Ao Ricardo, pelo apoio com as genotipagens, a redação do artigo, as discussões e sugestões, as coletas e por sempre se preocupar comigo; à Márcia Pincerati, por ter iniciado o estudo dos genes *CD80* e *CD86*, por todo o apoio, pelas correções e sugestões, pelas risadas. À Liana, pela leitura crítica, sugestões e correções de todos os trabalhos, especialmente do artigo, pelas discussões científicas, pela ajuda com os dot-blots, por aquele bolo delicioso no domingo à tarde. Gabriel, especialmente pela revisão do artigo. Tânia, Paloma, Mathias e Rafael Domingues, por me ajudarem com a confecção e leitura dos dot-blots. Danillo, por compartilhar a luta diária que foi chegar até aqui, sempre com muito bom humor. Karen, Dani e Karin, por todos os ensinamentos e por todo o apoio, mesmo que à distância.

Aos colegas e professores do departamento de genética, sempre prontos para um café com discussões científicas ou um momento de descontração. Ao meu vizinho de laboratório, Gabardo, pelas risadas contagiantes e pelo consolo.

À minha amiga Priscila, por compreender a minha falta de tempo. À Mix, por estar sempre pronta pra ajudar e ouvir minhas queixas.

À minha família, que me apóia mesmo sem entender meu trabalho e sempre torce pelo meu sucesso. Por compreenderem minha falta de tempo e meu nervosismo. Obrigada por tudo.

A todos os apaixonados por genética
de populações.

“A dupla hélice é realmente uma molécula extraordinária”

Francis Crick.

RESUMO

Os genes *CD80* e *CD86* estão ligados no braço curto do cromossomo 3 e codificam glicoproteínas estruturalmente relacionadas, membros da superfamília das imunoglobulinas, expressas na membrana de células apresentadoras de antígenos, que desempenham papel essencial na ativação e inibição da proliferação de células T. A ativação completa das células T requer um sinal antígeno específico, derivado da interação entre o complexo peptídeo/MHC e o receptor de célula T, e sinais coestimuladores, dentre os quais o mais bem caracterizado é dado pela ligação das moléculas B7 (*CD80* e *CD86*) ao receptor *CD28*, nas células T. Já a interação entre B7 e *CTLA-4*, um receptor inibidor, interrompe a resposta imune. Neste estudo foram analisados polimorfismos da região promotora do gene *CD80* (c.-557-561insCATGA, c.-454C>A, c.-387T>C, c.-232G>A, c.-79C>G, c.-7T>C, c.5C>A) e do éxon 8 do gene *CD86* (c.1057G>A) em três amostras da população brasileira (de ancestralidade predominantemente europeia, de ancestralidade mista europeia e africana e descendentes de japoneses), em ameríndios de três grupos Guarani e dois grupos Kaingang e em africanos, totalizando 1100 indivíduos. A técnica utilizada para genotipagem foi PCR-SSOP (*polymerase chain reaction – sequence specific oligonucleotide probes*). Todos os alelos e haplótipos foram encontrados em africanos, portanto foi possível concluir que os polimorfismos analisados surgiram no continente africano antes das migrações humanas para fora da África. A origem dos alelos da região promotora do gene *CD80* foi hipotetizada e o alelo ancestral é mais provavelmente o promotor 2 (-557-561*del,-454*C,-387*C,-232*G,-79*C,-7*T+5C) ou o promotor 3 (-557-561*del,-454*C,-387*T,-232*G,-79*C,-7*T,+5C). Os alelos promotores 1 e 4 originaram-se a partir do promotor 3. O nucleotídeo -79 é monomórfico em quatro populações ameríndias analisadas e o alelo G ocorre provavelmente apenas por fluxo gênico com não indígenas. Para o SNP 1057G>A, o alelo A é o mais comum em descendentes de japoneses e o alelo G é o mais freqüente nas demais populações, portanto, provavelmente a alteração das freqüências alélicas, com o alelo A tornando-se o mais comum, ocorreu recentemente nas populações do leste asiático. A diversidade observada em ameríndios para os genes *CD80* e *CD86* é, em geral, menor e o desequilíbrio de ligação (DL) é maior do que o observado em populações não indígenas, como é esperado para populações historicamente pequenas e isoladas, devido aos efeitos da deriva genética e ao reduzido fluxo gênico.

Palavras chave: *CD80*, *CD86*, ameríndios, populações

ABSTRACT

CD80 and *CD86* are closely linked genes on chromosome 3 and encode for structurally related glycoproteins, members of the immunoglobulin superfamily, expressed on the cell surface of antigen presenting cells, which play essential roles on stimulation and inhibition of T cells. The full activation of T cells requires several signals, one antigen-specific derived from the MHC/peptide and TCR interaction, and the second derived from costimulatory B7 molecules (*CD80* and *CD86*) through binding with *CD28* receptor, on T cells. On the other hand, the interaction between B7 and *CTLA-4*, an inhibitory T cell receptor, interrupts the response. In the present study, *CD80* promoter c.-557-561insCATGA, c.-454C>A, c.-387T>C, c.-232G>A, c.-79C>G, c.-7T>C, c.5C>A and *CD86* exon 8 c.1057G>A polymorphisms were analyzed in three samples of the Brazilian population (of predominantly European, of mixed African and European, and of Japanese ancestry), in Brazilian Amerindian populations from three Guarani and two Kaingang groups, and in Africans, totaling 1,100 individuals. Polymerase chain reactions followed by hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP) were performed to genotype these polymorphisms. All alleles and haplotypes were found in African individuals, so it was possible to conclude that the polymorphisms analyzed originated in the African continent before the human migrations out of Africa. The origin of *CD80* promoter alleles was hypothesized, and either promoter 2 (-557-561*del,-454*C,-387*C,-232*G,-79*C,-7*T+5C) or promoter 3 (-557-561*del,-454*C,-387*T,-232*G,-79*C,-7*T,+5C) is most likely the ancestral allele, and alleles promoter 1 and 4 emerged both from promoter 3. Nucleotide -79 was found to be monomorphic in four Amerindian populations analyzed and the presence of the G allele in these populations is probably due to gene flow from non-Amerindians. For the *CD86* 1057G>A SNP, the A allele is the most common in Japanese descendants while G is the most frequent allele in all other populations, so the shift in allele frequencies probably occurred recently in Eastern Asian populations. The diversity observed in Amerindians for the *CD80* and *CD86* genes is usually lower and linkage disequilibrium (LD) is usually higher than in non-Amerindian populations, as expected for historically small and isolated populations, because of the significant effects of random genetic drift and the reduced gene flow.

Key words: *CD80*, *CD86*, Amerindians, populations

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	41
TABELA 2 – SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA E TEMPERATURA DE ALTA ESTRINGÊNCIA PARA TIPAGEM DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	44
TABELA 3 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES (%) DAS VARIANTES DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	51
TABELA 4 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES (%) DAS VARIANTES DO SNP 1057G>A, ÉXON 8 DO GENE <i>CD86</i>	54
TABELA 5 – VALORES DE <i>P</i> PARA O TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL.....	55
TABELA 6 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DAS VARIANTES DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i> E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i> EM AFRICANOS (<i>n</i> = 15).....	56
TABELA 7 – FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS (OU HAPLÓTIPOS DE SNP) DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	59
TABELA 8 – VALORES DE <i>P</i> , <i>D'</i> E <i>R</i> ² PARA DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	60
TABELA 9 – FREQUÊNCIAS (%) DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELAS COMBINAÇÕES ENTRE AS VARIANTES DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	61
TABELA 10 – VALORES DE <i>P</i> , <i>D'</i> E <i>R</i> ² PARA DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i> E AS VARIANTES DO SNP 1057G>A DO GENE <i>CD86</i>	63
TABELA 11 – FREQUÊNCIAS (%) DAS VARIANTES DO SNP 1057G>A, ÉXON 8 DO GENE <i>CD86</i>	68
TABELA 12 – FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGÜÍSTICO MACRO-JÊ, DENTRE OS QUAIS OS DIALETOS KAINGANG DAS POPULAÇÕES ANALISADAS NESTE ESTUDO	19
FIGURA 2 – FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGÜÍSTICO TUPI, DENTRE OS QUAIS OS DIALETOS GUARANI DAS POPULAÇÕES ANALISADAS NESTE ESTUDO: GURANI M'BYÁ, KAIOWÁ E ÑANDEVÁ.....	21
FIGURA 3 – PAPEL DAS MOLÉCULAS B7 (CD80 e CD86) NA ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO DAS CÉLULAS T.....	23
FIGURA 4 – MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS DAS FAMÍLIAS B7 E CD28	24
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE <i>CD80</i> , MOSTRANDO ÉXONS E ÍNTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASES OU KILOBASES.....	26
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE <i>CD86</i> , MOSTRANDO ÉXONS E ÍNTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASES OU KILOBASES.....	29
FIGURA 7 – MAPA FÍSICO DA AMÉRICA DO SUL, MOSTRANDO EM DESTAQUE A LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS DE RESERVA ONDE VIVEM AS POPULAÇÕES INDÍGENAS ANALISADAS NESTE ESTUDO	35
FIGURA 8 – MAPA FÍSICO DO CONTINENTE AFRICANO.....	36
FIGURA 9 – SEQÜÊNCIA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i> (DE 5'A 3'), MOSTRANDO O SEGMENTO AMPLIFICADO POR PCR E AS POSIÇÕES DAS SONDAS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	38
FIGURA 10 – SEQÜÊNCIA DO ÉXON 8 DO GENE <i>CD86</i> (DE 5'A 3'), MOSTRANDO O SEGMENTO AMPLIFICADO POR PCR E AS POSIÇÕES DAS SONDAS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	39
FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE 1% APÓS CORRIDA ELETROFORÉTICA DE PRODUTOS DE PCR DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i> , CORADO COM GELRED E FOTOGRAFADO SOB LUZ ULTRAVIOLETA.....	42
FIGURA 12 – <i>DOT BLOTS</i> PARA A TIPAGEM DO DNA DE 25 INDIVÍDUOS, HIBRIDADOS COM AS SONDAS PARA A POSIÇÃO -387 DO GENE <i>CD80</i> , ALELOS a) T E b) C ; O INDIVÍDUO NA POSIÇÃO A1 É HETEROZIGOTO, NA POSIÇÃO A3 É HOMOZIGOTO PARA O ALELO T E NA POSIÇÃO A5 É HOMOZIGOTO PARA O ALELO C.....	47
FIGURA 13 –DENDROGRAMA CONSTRUÍDO ATRAVÉS DO MÉTODO <i>NEIGHBOR-JOINING</i> E BASEADO NA DISTÂNCIA GENÉTICA DE CAVALLI-SFORZA MODIFICADA (NEI, TAJIMA E TATENO, 1983) PARA OS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i> E ÉXON 8 DO GENE <i>CD86</i>	65
FIGURA 14 – HIPÓTESE DE ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	71

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA HIBRIDAÇÃO E REVELAÇÃO DAS SONDAS.....	45
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES	14
2.1.1 A população brasileira	16
2.1.2 Populações indígenas	17
2.1.3 As populações indígenas Kaingang e Guarani.....	18
2.2 MODELO DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T	22
2.3 <i>CD80 (B7-1)</i>	25
2.4 <i>CD86 (B7-2)</i>	28
2.5 POLIMORFISMOS DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i> E DOENÇAS	30
3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 AMOSTRA.....	33
4.2 METODOLOGIA DE TIPAGEM.....	37
4.2.1 Amplificação gênica	40
4.2.2 Confeção dos <i>dot blots</i>	43
4.2.3 Hibridação	43
4.2.4 Desibridação	48
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	49
5.1 DIVERSIDADE DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	49
5.2 HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	57
5.3 DENDROGRAMA DE POPULAÇÕES COM BASE NAS FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	64
6 DISCUSSÃO	66
6.1 POLIMORFISMO DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	66
6.2 ORIGEM DOS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>CD80</i>	69
6.3 DENDROGRAMA DE POPULAÇÕES COM BASE NAS FREQUÊNCIAS DOS GENES <i>CD80</i> E <i>CD86</i>	72
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

O estudo da diversidade de genes em populações possui uma série de aplicações, auxiliando no entendimento da evolução humana, da origem e história demográfica das populações e da ação de fatores evolutivos em seqüências genômicas. As populações podem diferir quanto às freqüências alélicas, e alelos muito comuns em um grupo podem ser raros ou mesmo ausentes em outro, especialmente quando as populações analisadas são relativamente isoladas. Alguns polimorfismos que melhor caracterizam grupos étnicos podem ser utilizados como marcadores genéticos na definição da ancestralidade de indivíduos e de populações.

A população brasileira é de origem bastante heterogênea, formada pela miscigenação de ameríndios, europeus e africanos, e mais recentemente, de imigrantes principalmente da Europa e da Ásia. O estudo de polimorfismos genéticos pode auxiliar na compreensão da origem da nossa população, determinando a contribuição desses povos na formação da população brasileira.

A caracterização genética de populações indígenas é bastante informativa, pois são populações isoladas, nas quais o fluxo gênico recente é bem menos intenso se comparado ao que vem ocorrendo durante os últimos séculos para as populações urbanas. Estudos genéticos de populações ameríndias, aliados a abordagens arqueológicas e lingüísticas, levaram à elaboração de hipóteses sobre o povoamento das Américas. Trabalhos que investiguem a diversidade genética de populações ameríndias podem contribuir significativamente para a elucidação da história das populações.

A caracterização de populações para genes que atuam no sistema imune tem uma aplicação adicional: a de servir como referência para estudos de associação a doenças, pois esses genes podem ter um papel importante na patogênese, e seus polimorfismos podem estar associados à maior ou menor susceptibilidade de indivíduos ao desenvolvimento dessas doenças. Como as freqüências alélicas podem diferir entre populações, a caracterização das populações para esses polimorfismos é essencial para a interpretação dos resultados encontrados em estudos de associação a doenças (PETZL-ERLER, 1999).

A imunidade natural é a primeira linha de defesa contra microrganismos, porém as respostas específicas são fornecidas pela imunidade adquirida, que didaticamente é dividida em 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 MHC do hospedeiro, que são expressos na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Esse reconhecimento é feito pela célula T, através do seu receptor (TCR). Para que ocorra a ativação dos linfócitos T são necessários outros sinais, co-estimuladores, enviados pela mesma APC. O mais bem caracterizado é a ligação das moléculas B7 (principalmente CD80 e CD86), nas APCs, ao receptor CD28, nas células T. O controle da resposta proliferativa é dado pela ligação das mesmas moléculas B7 ao receptor CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), nos linfócitos T (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Neste trabalho foram analisados polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86* em populações urbanas de diferentes ancestralidades e em populações indígenas das tribos Kaingang e Guarani. Esses genes estão ligados no braço longo do cromossomo 3, originaram-se por duplicação gênica e apresentam 25% de identidade nas seqüências de aminoácidos resultantes. Codificam glicoproteínas do tipo I pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, que compartilham os receptores CD28 e CTLA-4 e estão envolvidas na ativação das células T. O objetivo do presente estudo é a descrição das freqüências das variantes da região promotora do gene *CD80* e éxon 8 do gene *CD86*, e do desequilíbrio de ligação entre elas, em populações de diferentes ancestralidades, para auxiliar na compreensão da história evolutiva desses polimorfismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A genética de populações é 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 esse fim.

Polimorfismo é a existência de pelo menos dois alelos em um loco em uma população, sendo que nenhum deles ocorre com frequência superior a 99%. Há vários tipos de polimorfismos, dentre os quais o número variável de repetições em tandem (VNTR) e os indel (inserção ou deleção de poucos pares de bases), 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 par de nucleotídeos.

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 et al., 1998). Essas 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 não ligados. 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).

As populações também podem diferir quanto ao padrão de desequilíbrio de ligação (DL), principalmente se apresentam histórias evolutivas diferentes. O homem surgiu na África, e a partir desse continente povoou a Ásia, Europa e posteriormente a América. Assim, individualmente as populações não africanas apresentam, em geral, um subconjunto da diversidade genética encontrada nas populações africanas, onde, além de maior diversidade, observam-se menores blocos de

desequilíbrio de ligação. Durante as migrações humanas para fora da África, as populações sofreram efeito de deriva genética devido à redução do tamanho efetivo da população (efeito gargalo de garrafa), com conseqüente diminuição da diversidade genética e aumento do desequilíbrio de ligação entre os locos (KIDD et al., 1998; CAVALLI-SFORZA e FELDMAN, 2003; LONJOU et al., 2003).

A caracterização genética das populações humanas é importante na reconstrução da história da fundação ou migração e investigação da estrutura genética das populações. Além disso, o estudo de polimorfismos é informativo também para o conhecimento do gene e da origem e dinâmica dos seus polimorfismos, auxiliando na compreensão dos mecanismos evolutivos que atuam nesses genes. No entanto, há poucos estudos com os genes *CD80* e *CD86*, e apenas algumas populações foram caracterizadas para os polimorfismos desses genes.

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 esse importante papel na imunidade, alguns estudos buscaram polimorfismos nos genes que codificam essas moléculas, pois esses poderiam não só auxiliar na compreensão de possíveis funções adicionais das proteínas *CD80* e *CD86*, como também poderiam estar envolvidos na patogênese de muitas doenças. Esses estudos são recentes, mas algumas variações já foram descritas, e algumas delas estão associadas à rejeição de transplantes e esclerose sistêmica (MARÍN et al., 2005 e ABDALLAH et al., 2006).

Estudos populacionais sobre os genes *CD80* e *CD86* são importantes na caracterização das populações e melhor compreensão das variações gênicas, contribuindo para o melhor entendimento das implicações funcionais de sua variabilidade. É preciso analisar um maior número de populações para que seja possível realizar comparações entre elas e fazer inferências a respeito da evolução desses genes e seus polimorfismos e também sobre a evolução das populações.

2.1.1 A população brasileira

A população brasileira é miscigenada, composta por indivíduos de ascendência 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 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007), a população da região sul do Brasil é composta por 78,7% de brancos, 4,3% de pretos, 16,3% de pardos e 0,7% de amarelos e indígenas. Porém a auto-classificação dos indivíduos em brancos, mulatos e negros não corresponde às mesmas proporções de ancestralidade européia e africana em diferentes regiões do país, mostrando que a cor da pele é um marcador pouco informativo da ancestralidade genômica de indivíduos (PARRA et al., 2002; PIMENTA et al., 2006).

Em dois estudos foi analisado o polimorfismo dos genes *HLA* como marcadores de ancestralidade 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). Em outro estudo foram analisados genes *HLA* de classe I e II, mostrando 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 análise de polimorfismos de herança uniparental, localizados no cromossomo Y e no DNA mitocondrial (DNAMt), revelou a diferença entre as contribuições materna e paterna na formação da população brasileira. A ancestralidade européia é consideravelmente maior nas linhagens de cromossomo Y do que nas linhagens de DNAMt, e esta, por sua vez, apresenta ancestralidade ameríndia e africana em maior proporção do que a encontrada no cromossomo Y (GONÇALVES et al., 2007).

2.1.2 Populações indígenas

O estudo de populações indígenas é de especial interesse por serem populações isoladas, nas quais o fluxo gênico recente é bem menos intenso que em populações urbanas. Estudos genéticos de populações ameríndias, aliados a abordagens arqueológicas, paleontológicas e lingüísticas, levaram à elaboração de hipóteses sobre o povoamento das Américas. O continente americano foi o último a ser povoado, e a hipótese consenso entre os cientistas é de que o homem veio da Sibéria para a América, durante a última glaciação, através do estreito de Bering. Ainda hoje não há um consenso sobre a data da primeira migração, número de migrações e rotas utilizadas e análises de DNA mitocondrial, cromossomo Y e outras regiões polimórficas apóiam mais de uma hipótese.

Os resultados obtidos através do seqüenciamento do genoma mitocondrial humano completo em nativos americanos sugerem que o povoamento do continente ocorreu por uma única onda migratória originada provavelmente no nordeste asiático há cerca de 20 mil anos. Antes da entrada na América, ocorreu um confinamento por cerca de 5 mil anos na Beríngia, evidenciado por um efeito de gargalo de garrafa pequeno. A entrada no continente americano ocorreu há aproximadamente 18 a 19 mil anos, quando houve um grande aumento populacional (FAGUNDES et al., 2008; FAGUNDES, KANITZ e BONATTO, 2008).

Dados obtidos a partir da análise da morfologia de crânios indicam que pelo menos duas populações biologicamente distintas colonizaram as Américas durante a transição do Pleistoceno para o Holoceno. A primeira teria a morfologia do crânio similar à encontrada hoje na África e Austrália, e a segunda teria a morfologia similar à encontrada no nordeste asiático (NEVES, HUBBE e PILÓ, 2007; NEVES E HUBBE, 2005).

Entretanto, em uma revisão que uniu dados de morfologia e de genética, foi sugerido que a população que colonizou a América apresentava grande diversidade craniofacial, e as morfologias craniofaciais paleoamericanas e mongolóides são, na realidade, extremos de uma variação morfológica contínua (GONZÁLEZ-JOSÉ et al., 2008).

Após a entrada no continente americano, as migrações ocorreram do norte em direção ao sul, mas não há consenso a respeito das rotas utilizadas. Evidências

genéticas e de morfologia craniofacial indicam a existência de duas rotas costeiras, uma pelo oceano Pacífico e outra pelo oceano Atlântico (PUCCIARELLI et al., 2008).

No Brasil, estima-se que havia mais de 1000 povos indígenas na época da chegada dos europeus, mas hoje restaram 225, totalizando cerca de 460 mil indivíduos (0,25% da população brasileira). Dentre esses, cerca de 30 mil são Guarani, 23 mil são Ticuna e 20 mil são Kaingang. No Paraná existem 10.375 indígenas em 17 áreas, incluindo as etnias Kaingang, Guarani (Ñandeva e M'byá) e Xetá. No Mato Grosso do Sul vivem nove etnias indígenas, dentre as quais Guarani Kaiowá e Ñandeva, com aproximadamente 55 mil indivíduos. Guarani e Kaingang são as duas principais tribos indígenas do sul do Brasil. Possuem língua e cultura distintas e, mesmo quando habitam a mesma reserva indígena, moram em aldeias diferentes e tendem a permanecer endogâmicos. (FUNAI; Instituto Socioambiental).

2.1.3 As populações indígenas Kaingang e Guarani

Até o contato com os colonizadores, os Kaingang ocupavam grandes áreas no sul do Brasil (sempre na região central dos estados) e na Argentina. Viviam principalmente da agricultura, além da caça, pesca e coleta. Eram semi-nômades e guerreiros. Hoje estão restritos a 30 terras indígenas, muitas vezes compartilhadas com outras tribos, e são a terceira maior etnia indígena no Brasil. A tribo é dividida em dois grupos, Kamé e Kairu, e os indivíduos de um grupo devem se casar com os do grupo oposto. Os descendentes recebem a filiação paterna, ou seja, as famílias são patrilineares. Sua língua é o Kaingang, classificado na família Jê, tronco lingüístico Macro-Jê (FIGURA 1, FUNAI).

Neste estudo foram analisados Kaingang residentes em duas áreas de reserva indígenas: Rio das Cobras (25°18'S, 52°32'O), a maior do Paraná, com 18.681,98 ha, localizada no município de Nova Laranjeiras, que abriga aproximadamente de 1.600 indivíduos dos quais cerca de um terço são Kaingang e os demais são Guarani e Xetá; e área indígena Ivaí (24°30'S, 51°40'O), localizada no município de Manoel Ribas, com 7.306,34 ha, que abriga cerca de 700 pessoas.

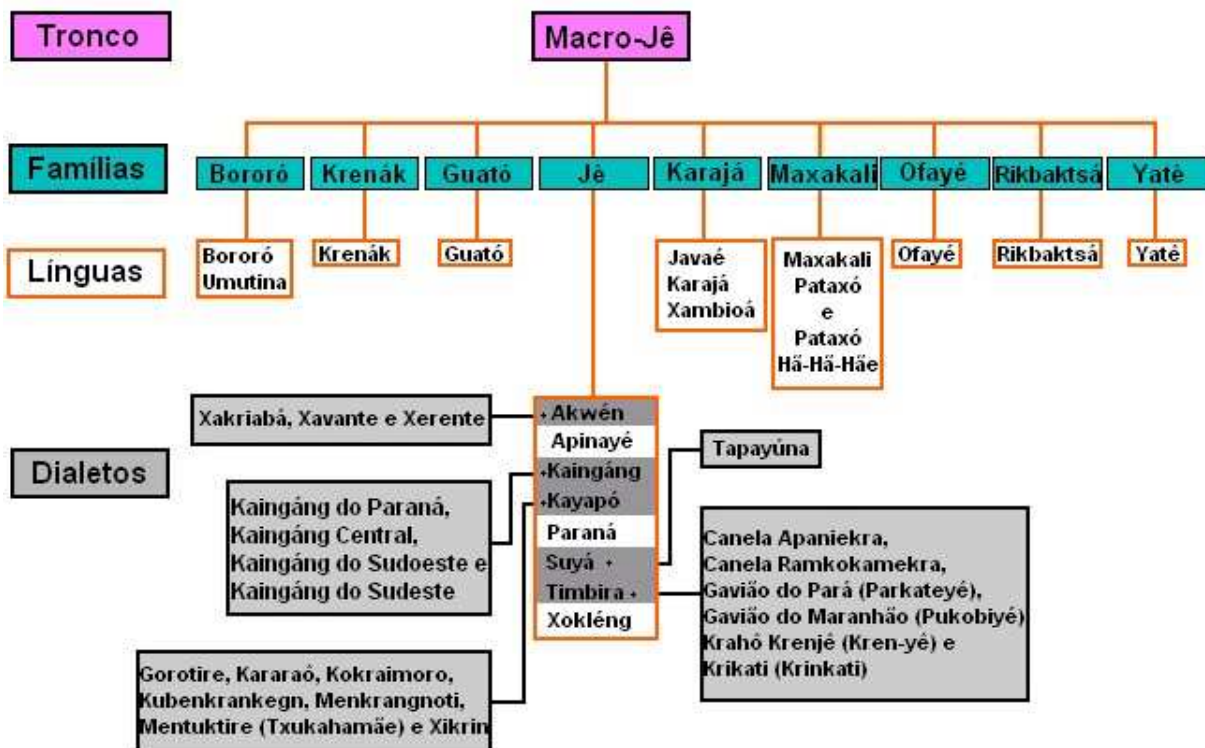


FIGURA 1 – FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGÜÍSTICO MACRO-JÊ, DENTRE OS QUAIS OS DIALETOS KAINGANG DAS POPULAÇÕES ANALISADAS NESTE ESTUDO

FONTE: INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL

Os Guarani eram nômades antes da colonização, viviam principalmente da agricultura e habitavam uma grande área na região litorânea dos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, além de países vizinhos. Hoje vivem no sul e sudeste do Brasil, Paraguai, Argentina e Bolívia, e são a maior etnia indígena brasileira. Sua língua é o Guarani, da família Tupi-Guarani, tronco lingüístico Tupi. Os Guarani analisados neste estudo pertencem a três grupos distintos, nomeados pelo dialeto que falam (FIGURA 2): Guarani M'byá (da área indígena Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras, PR); Guarani Kaiowá, das aldeias Amambai (23°06'S; 55°12'O) e Limão Verde (23°12'S; 55°06'O), que abrigam cerca de 4.500 e 460 indivíduos, respectivamente, localizadas no município de Amambai, Mato Grosso do Sul; e Guarani Ñandeva, de Amambai e Porto Lindo (23°48'S; 54°30'O), MS, que a briga aproximadamente 1.600 pessoas.

Vários estudos analisaram o polimorfismo dos genes *HLA*, outros genes do MHC e marcadores da região nas populações indígenas. Os resultados mostraram que a diversidade dos locos analisados em populações indígenas é menor do que o de outras populações, e o desequilíbrio de ligação entre os locos é maior. Dentre as populações ameríndias foram encontrados alelos *HLA* novos e exclusivos dessas populações, que surgiram a partir dos alelos fundadores principalmente por eventos de conversão gênica (PARHAM et al., 1997).

Estudos realizados com tribos Kaingang e Guarani mostraram que, além da diferença entre populações indígenas e urbanas, elas são geneticamente diferentes entre si, apesar de atualmente conviverem em muitas áreas de reserva indígena (PETZL-ERLER et al., 1993; WEG-REMERS et al., 1997). Guarani e Kaingang também diferem quanto às frequências de linhagens de DNAm e em menor grau quanto a haplogrupos de cromossomo Y. A quantidade de variação intrapopulacional também difere entre as duas tribos, resultado compatível com dados lingüísticos e históricos, que indicam que a migração do grupo Tupi foi mais antiga do que a do grupo Jê (MARRERO et al., 2007).

O fluxo gênico entre populações indígenas e não-indígenas é muito baixo, e a taxa de miscigenação estimada através da análise de genes *HLA* de classe II foi de 7% para Kaingang, 4% para Guarani M'byá, 14% para Guarani Ñandeva e ausente para Guarani Kaiowá (TSUNETO et al., 2003).

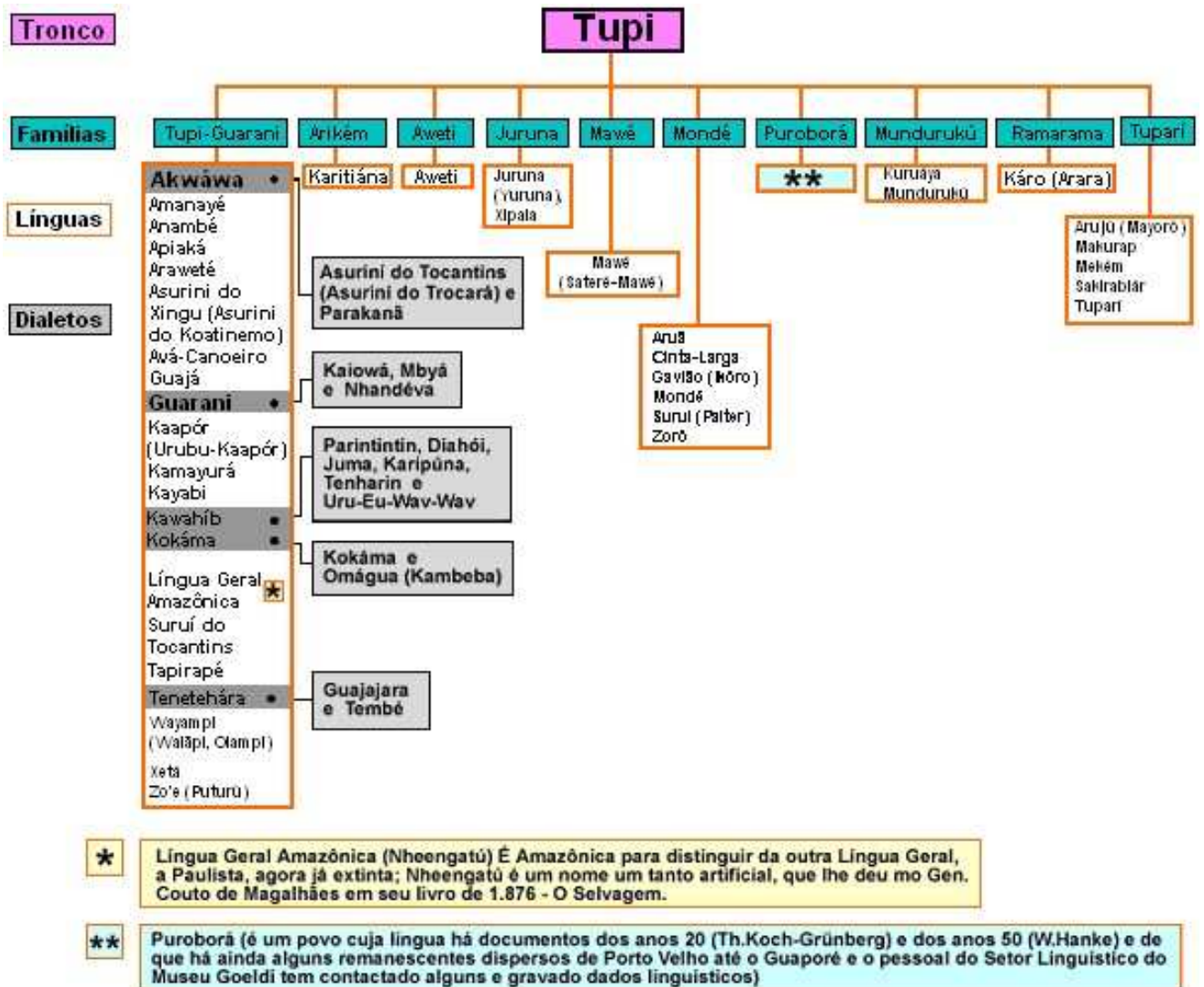


FIGURA 2 – FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGÜÍSTICO TUPI, DENTRE AS QUAIS OS DIALETOS GUARANI DAS POPULAÇÕES ANALISADAS NESTE ESTUDO: GUARANI M'BYÁ, KAIOWÁ E ÑANDEVA
 FONTE: INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL

2.2 MODELO DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T

Para que ocorra a ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T virgens em células efectoras, pelo menos dois sinais enviados pela célula apresentadora de antígeno profissional são de fundamental importância (FIGURA 3). 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 (incluindo CD80 e CD86) ao receptor CD28, no linfócito T. Sem o segundo sinal não ocorre 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 et al., 2002).

O controle da resposta proliferativa, essencial na manutenção da tolerância periférica e prevenção da autoimunidade, é dado pela ligação das moléculas B7 ao receptor CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), expresso na membrana dos linfócitos T ativos. Essa ligação leva à inativação das células T, interrompendo a resposta imune e ocorre com cerca de 20 vezes mais avidéz do que a ligação de B7 a CD28 (FIGURA 3). 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).

Embora as vias de ativação das células T que envolvem as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 sejam as mais conhecidas, recentemente foram descobertas outras moléculas que atuam nesse processo (FIGURA 4). Enquanto CD80 e CD86 possuem expressão restrita a células linfóides, outras moléculas (ICOS-L, PD-L1, B7-H3 e B7-H4) são expressas também em células não linfóides, o que sugere que essas moléculas têm papéis diferentes no sistema imune (COLLINS, LING e CARRENO, 2005).

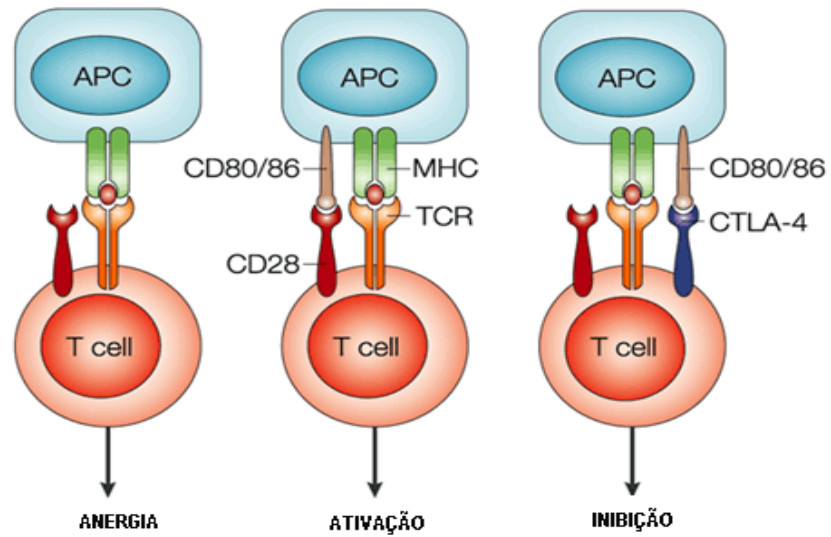


FIGURA 3 – PAPEL DAS MOLÉCULAS B7 (CD80 e CD86) NA ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO DAS CÉLULAS T

FONTE: ALEGRE, FRAUWIRTH e THOMPSON, 2001

NOTA: APC: CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO; MHC: COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE; TCR: RECEPTOR DE CÉLULA T

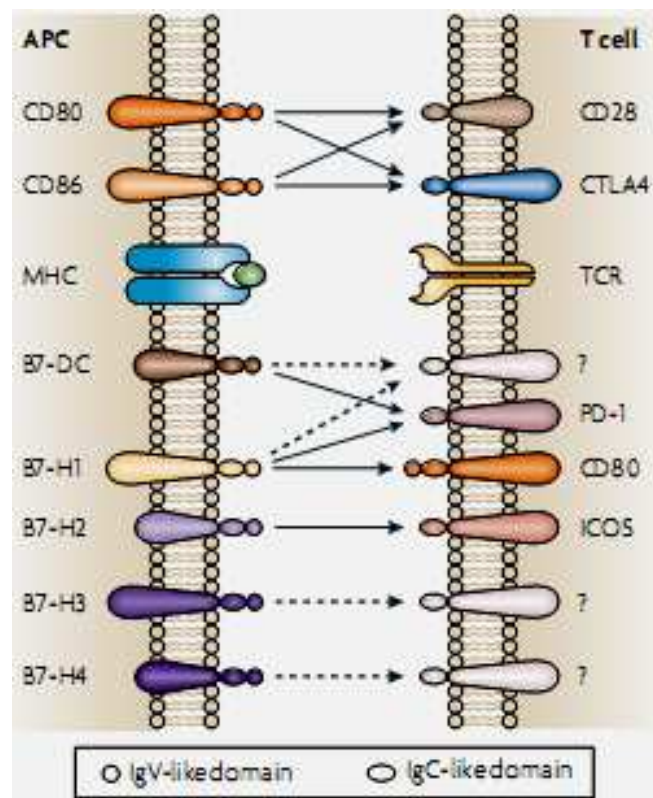


FIGURA 4 – MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS DAS FAMÍLIAS B7 E CD28
 FONTE: ZOU e CHEN, 2008
 NOTA: APC: CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO

Na família CD28 temos os receptores ICOS (co-estimulador induzido), que promove sinal de ativação e PD-1 (morte programada 1), também chamado CD279, que atua como inibidor.

Na família B7 já foram descritos sete ligantes e, com exceção de B7-H4, que é ligado à membrana celular por glicosilfosfatidilinositol (GPI), todas são proteínas transmembrânicas caracterizadas por domínios extracelulares semelhantes aos domínios variáveis (IgV) e constantes (IgC) das imunoglobulinas, cada um codificado por um único éxon. Apresentam caudas citoplasmáticas curtas, variando de 19 a 62 aminoácidos, que podem ser codificadas por múltiplos éxons (COLLINS, LING e CARRENO, 2005).

Além de CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), fazem parte da família B7 as proteínas B7-H1 (também nomeada CD274 e PD-L1, por ser ligante de PD-1), B7-H2 (ou ICOS-L, por ser ligante de ICOS), B7-H3 (também conhecida como CD276), cujo receptor é desconhecido, B7-H4 (denominada também B7S1 ou B7x), sem receptor descrito e B7 –DC (também conhecida como CD273 e PD-L2), ligante de PD-1. A contribuição dessas moléculas nas respostas imunes ainda não foi totalmente esclarecida, mas sabe-se que há diferenças importantes com relação à atuação dessas e de CD80 e CD86 na ativação dos linfócitos T (COLLINS, LING e CARRENO, 2005; GREENWALD, FREEMAN e SHARPE, 2005; KEIR e SHARPE, 2005; ZOU E CHEN, 2008).

ICOS e seu ligante ICOS-L são moléculas de função co-estimuladora, enquanto B7-H4, apesar de não ter nenhum receptor descrito, deve ser um ligante co-inibidor. Todos os outros membros da família B7 são moléculas co-estimuladoras e co-inibidoras (COLLINS, LING e CARRENO, 2005).

2.3 CD80 (B7-1)

O gene *CD80* localiza-se no cromossomo 3 (posição 3q21) e contém sete éxons, com cerca de 32Kb de DNA (FIGURA 5). Codifica uma glicoproteína de mesmo nome, que possui dois domínios extracelulares estruturalmente similares aos das imunoglobulinas, codificados pelos éxons 3 e 4, uma região transmembrânica codificada pelo éxon 5 e um curto domínio citoplasmático correspondente ao éxon 6.

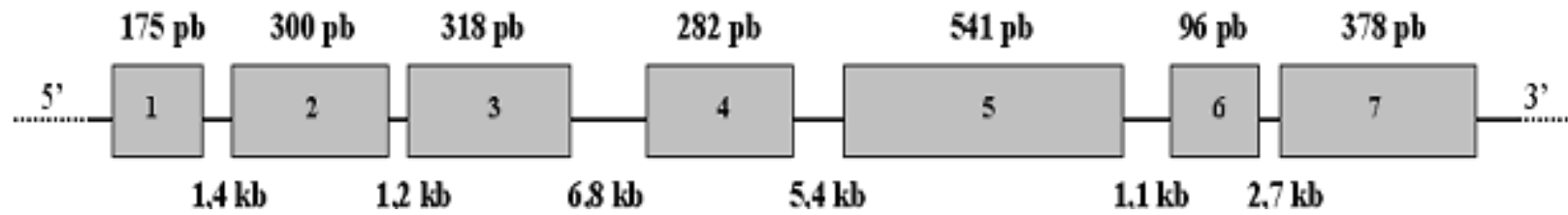


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE *CD80*, MOSTRANDO ÉXONS E ÍNTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASES OU KILOBASES
FONTE: O autor (2008)

O éxon 1 não é traduzido e o éxon 2 contém o códon de iniciação AUG e codifica o peptídeo sinal (SELVAKUMAR et al., 1992). A molécula CD80 é expressa predominantemente na forma de dímeros na membrana das células apresentadoras de antígeno profissionais, como células dendríticas, monócitos e células B ativadas. Apresenta lenta cinética de expressão e é estável por 4 a 5 dias. A ligação de CD80 a CD28 leva à formação de resposta Th1 na diferenciação dos linfócitos T. CD80 é o ligante preferencial de CTLA-4, com maior afinidade e avidéz na ligação se comparada à ligação de CTLA-4 com CD86 (SAMSON, MANZOTTI e ZHENG, 2003; BHATIA et al., 2006).

Foram descritos seis polimorfismos na região promotora deste gene, localizados nas posições c.-454A>C, c.-387T>C, c.-232A>G, c.-79G>C, c.-7C>T, e uma inserção de 5pb, c.-557_-561insCATGA. Um SNP foi identificado na região 5' não traduzida, posição c.5A>C. Outros quatro polimorfismos foram encontrados em regiões codificadoras: nas posições 452G>A e 614C>G, no éxon 3; na posição 864A>G, no éxon 4, que leva à substituição de aminoácido (N186D) e posição 1018-12T>G, no íntron 5 (MATSUSHITA et al., 2000). Outras cinco variações foram identificadas nesse gene, sendo quatro transições e uma deleção, localizadas no íntron 2, posição -56A>G; no éxon 3, posições 138G>A e 144G>A, ambas silenciosas; no éxon 6, posição 333A>G e 424delC, na 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 apenas quatro haplótipos. Como todos eles apresentaram freqüências elevadas, os autores sugerem que estejam sob efeito de seleção balanceadora, porém, para compreender melhor as vias evolutivas desses alelos, novos estudos devem ser realizados em outras populações. Posteriormente, cinco desses SNPs foram estudados em uma população australiana (TEUTSCH et al., 2004) e os mesmos quatro haplótipos foram observados.

Um estudo populacional do nosso grupo analisou a posição 864, éxon 4 do gene *CD80*, em três populações indígenas do Estado do Paraná (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 864*A foi de 100%, mostrando que esta posição é monomórfica para as populações analisadas

(PINCERATI, 2004). Este polimorfismo foi descrito na população japonesa com baixa frequência do alelo 864*G, encontrado em 1,2% dos indivíduos analisados (MATSUSHITA et al., 2000).

2.4 CD86 (B7-2)

O gene *CD86*, assim como o gene *CD80*, localiza-se no cromossomo 3 (3q21), e contém oito éxons, possuindo mais de 22Kb de DNA (FIGURA 6). Há um sítio de recomposição alternativa entre os éxons 1 e 2. O éxon 3 corresponde ao peptídeo sinal e os éxons 4 e 5 aos domínios extracelulares. O éxon 6 codifica a região transmembrânica e junto com os éxons 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 resposta celular do tipo Th2 nos linfócitos T (SAMSON, MANZOTTI e ZHENG, 2003; BHATIA et al., 2006).

A molécula CD86 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 apresenta maior afinidade com esse receptor do que CD80. Ambos, CD86 e CD28, 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 acredita-se 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 transmembrânica (éxon 6). Essa 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).

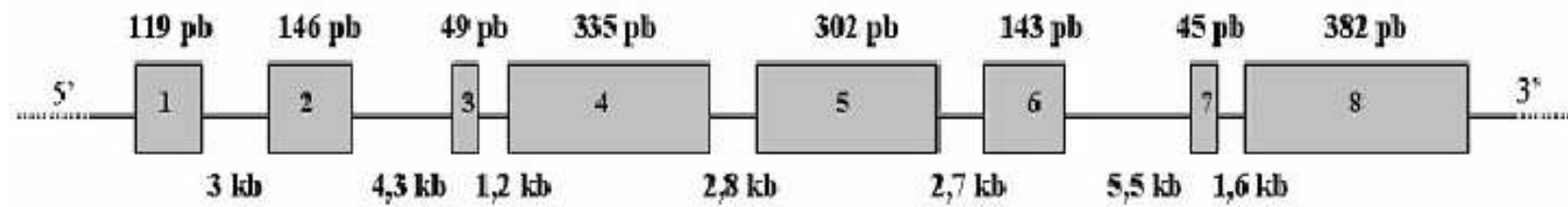


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO INTERNA DO GENE *CD86*, MOSTRANDO ÉXONS E INTRONS COM SEUS TAMANHOS EM PARES DE BASES OU KILOBASES
FONTE: O autor (2008)

Uma outra molécula de CD86 (CD86 Δ EC) é formada por recomposição alternativa, com a deleção dos éxons 4 e 5, que codificam os domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, nos quais localizam-se os sítios de ligação aos receptores CD28 e CTLA-4. Há a hipótese de que essa 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).

Seis polimorfismos foram descritos no gene *CD86*. O primeiro, um SNP na posição 1057G>A éxon 8, é um polimorfismo não sinônimo. Já foi analisado em franceses, bretões, finlandeses, australianos e japoneses (TABELA 9). Leva à substituição do aminoácido alanina por treonina (A304T), introduzindo um sítio potencial de fosforilação na região citoplasmática da molécula (DELNESTE et al., 2000). Outros três polimorfismos foram descritos, nas posições 51A>G éxon 1, 19G>A éxon 2 e -819T>C na região promotora. Foi descrita também uma deleção na região 5' não traduzida, posição -359delAAG, próxima ao éxon 2 (TEUTSCH et al., 2004). Outro SNP descrito recentemente no éxon 5 é também um polimorfismo não sinônimo, que leva à troca de aminoácido (Ile179Val), sendo que o alelo que contém valina foi associado ao aumento na produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 (CORYDON et al., 2007). Os SNPs dos éxons 1 e 8 estão em desequilíbrio de ligação absoluto na população finlandesa (TURPEINEN et al., 2002).

2.5 POLIMORFISMOS DOS GENES *CD80* E *CD86* E DOENÇAS

A ativação dos linfócitos T é crucial para o desencadeamento de uma resposta imune celular efetiva. Nesse 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 dessas moléculas, interferindo na susceptibilidade a diversas doenças, em especial as auto-imunes e inflamatórias crônicas. Assim, os genes *CD80* e *CD86* são considerados candidatos para estudos de associação a doenças e tanto estudos populacionais quanto estudos de associação podem auxiliar na

compreensão das diferenças funcionais entre os alelos e das funções desempenhadas pelas moléculas CD80 e CD86.

Em um estudo caso-controle de associação com a doença auto-imune pênfigo foliáceo na população brasileira, nosso grupo de pesquisa encontrou associação negativa com o genótipo A/A do SNP 1057G>A do gene *CD86* (OR = 0,26) e mostrou que o alelo 1057*G confere susceptibilidade tanto em homozigose (OR = 4,36) quanto em heterozigose (OR = 3,08). Para as variantes da região promotora do gene *CD80*, observou-se associação negativa com o genótipo homozigoto para o alelo promotor 4 (OR = 0,26) e também com os indivíduos portadores do alelo promotor 4 (OR = 0,34). O alelo promotor 3 confere susceptibilidade tanto no genótipo homozigoto (OR = 1,97) quanto nos portadores do alelo (OR = 2,51). Os efeitos se anulam em indivíduos que possuem os alelos promotor 3 e 4 (resultados não publicados).

Em um estudo com o 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).

Não foi encontrada associação das variantes das posições 51 e 1057 do gene *CD86* em 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). Também não foi encontrada associação entre as variantes da posição 1057 do gene *CD86* e a recorrência de hepatite B em pacientes chineses transplantados (JIANG et al., 2007).

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Os genes *CD80* e *CD86* codificam moléculas que possuem papel fundamental nas respostas imunológicas e seus polimorfismos já foram associados ao desenvolvimento de algumas doenças. São genes ligados, que surgiram por duplicação gênica, e possivelmente estão sujeitos a pressões seletivas diferenciadas, o que é evidenciado pela importância da presença das duas moléculas, *CD80* e *CD86*. Entretanto, poucas populações foram investigadas para os polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86*, e dentre elas apenas populações de ancestralidade européia, europeus e orientais, que foram analisadas em estudos de associação a doenças. Estudos populacionais, além de elucidar a diversidade do gene em diversas populações, podem revelar a origem de seus polimorfismos, os fatores evolutivos à que eles estão sujeitos e até mesmo aspectos das relações entre as populações.

O objetivo geral deste trabalho foi analisar polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86* em populações de diferentes ancestralidades, visando auxiliar no entendimento da origem e evolução desses polimorfismos. Foram escolhidos seis SNPs e uma inserção na região promotora do gene *CD80* e um SNP no éxon 8 do gene *CD86*. Os objetivos específicos foram:

- Estimar as freqüências alélicas, genotípicas, haplotípicas e de portadores dos alelos;
- Verificar se as freqüências genotípicas encontram-se de acordo com as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Verificar se as variantes analisadas estão em desequilíbrio de ligação e estimar o valor de P , D' e r^2 ;
- Comparar as freqüências encontradas nas diferentes populações;
- Estimar as distâncias genéticas entre as populações e construir um dendrograma para as freqüências alélicas dos genes *CD80* e *CD86*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Foram analisados 1100 indivíduos pertencentes a quatro populações urbanas e quatro nativas americanas. As amostras da população urbana brasileira foram subdivididas em indivíduos de ancestralidade predominantemente europeia (EUR-BR, n = 157), ancestralidade mista europeia e africana (AFR-BR, n = 252) e descendentes de japoneses (JAP-BR, n = 101). Os euro-brasileiros são da região metropolitana de Curitiba e as coletas foram realizadas a partir de 1994 pela equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH). As amostras de afro-brasileiros foram cedidas pelo Laboratório de Polimorfismos e Ligação, do departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As amostras de descendentes de japoneses foram cedidas pela professora Luiza Tamie Tsuneto, da Universidade Estadual de Maringá.

A populações indígenas pertencem aos grupos Guarani M'byá (GRC, n = 89), Guarani Kaiowá (GKW, n = 161), Guarani Nandeva (GND, n = 84) e Kaingang (KRC, n = 110 e KIV, n = 131). As amostras de GRC e KRC foram coletadas na área de reserva indígena Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras, Paraná (FIGURA 7), e as de KIV na área de reserva Ivaí, município de Manoel Ribas, PR. As amostras de GKW são das áreas Amambaí e Limão Verde, no município de Amambaí, Mato Grosso do Sul e as de GND são de Amambaí e Porto Lindo, MS. As coletas foram realizadas a partir de 1988 pela equipe do LGMH.

Foram analisados ainda indivíduos africanos que vivem no Brasil (AFRI, n = 15), provenientes dos países Angola, Guiné Bissau, Gana e Camarões (FIGURA 8). As coletas foram realizadas em Curitiba, no ano de 2008, pela equipe do LGMH.

O DNA foi extraído a partir do sangue total, através dos métodos fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (13° IHWC, 2000) ou salting-out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991) e a concentração foi ajustada para 20 µg/ml. Os indivíduos foram voluntários e assinaram um termo de consentimento para participação em pesquisa (ANEXO 1) e um questionário para obtenção de dados pessoais (ANEXO 2). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres

Humanos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, e no caso dos indígenas também pela Fundação Nacional do Índio (FUNAI) e pelos líderes das tribos. As amostras colhidas anteriormente à resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde, quando ainda não se obtinha o consentimento informado individual por escrito, seguiram os preceitos de informação prévia dos participantes e seus líderes comunitários, aquiescência voluntária e garantia de anonimato.



FIGURA 7 - MAPA FÍSICO DA AMÉRICA DO SUL, MOSTRANDO EM DESTAQUE A LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS DE RESERVA ONDE VIVEM AS POPULAÇÕES INDÍGENAS ANALISADAS NESTE ESTUDO

FONTE: ADAPTADO DE: OLIVEIRA et al., 2008

NOTA: 1: ÁREA DE RESERVA IVAÍ, MUNICÍPIO DE NOVA LARANJEIRAS, ESTADO DO PARANÁ; 2: ÁREA DE RESERVA RIO DAS COBRAS, MUNICÍPIO DE MANOEL RIBAS, PR; 3: ÁREAS AMAMBAI E LIMÃO VERDE, MUNICÍPIO DE AMAMBAI, ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL; 4: ÁREA DE RESERVA INDÍGENA PORTO LINDO, MS

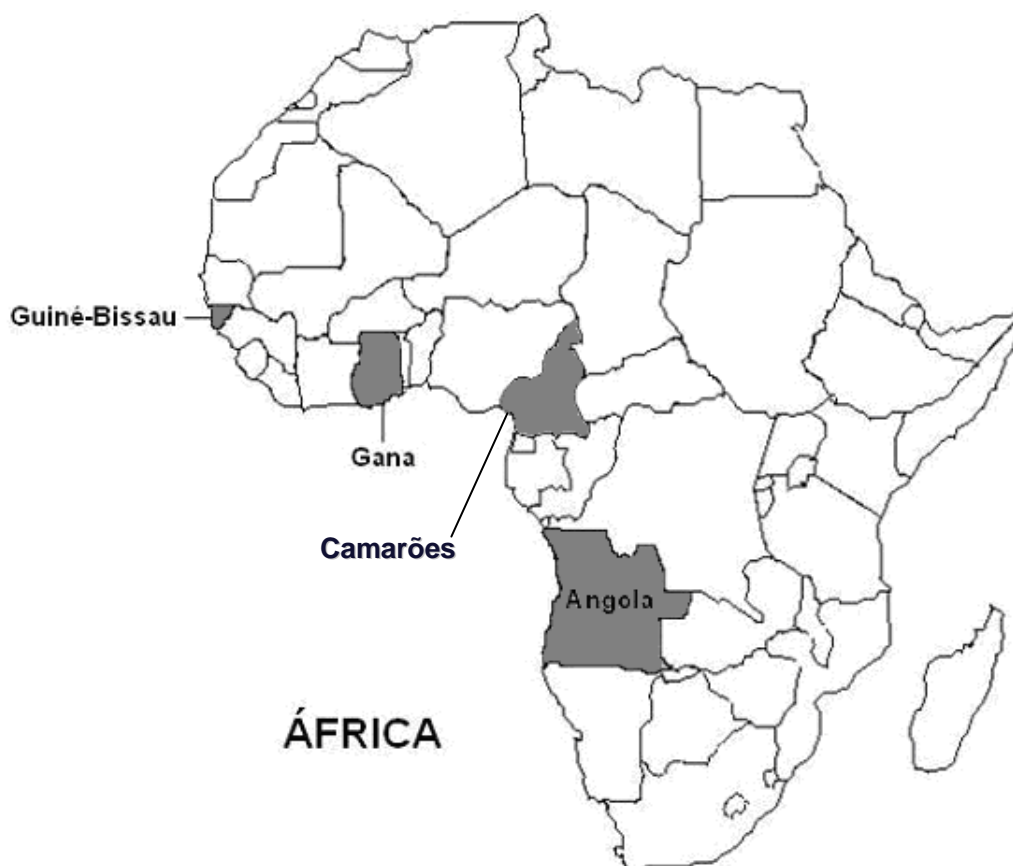


FIGURA 8 - MAPA FÍSICO DO CONTINENTE AFRICANO

FONTE: ADAPTADO DE <clio.rediris.es/actividades/africa/africa.htm>

NOTA: EM DESTAQUE OS PAÍSES DE ORIGEM DOS AFRICANOS ANALISADOS NESTE ESTUDO: GUINÉ-BISSAU, GANA E ANGOLA

4.2 METODOLOGIA DE TIPAGEM

A técnica escolhida para genotipagem dos polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86* foi a PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotides Probes*), que consiste na amplificação por PCR do fragmento correspondente ao gene e fixação do produto de PCR em membranas de nylon, resultando em *dot blots*, também denominados macro-arranjos. 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 (SNPs) localizados na região promotora do gene, c.-454A>C, c.-387T>C (dbSNP ref: rs1880661), c.-232A>G, c.-79G>C, c.-7C>T e c.+5C>A, e um polimorfismo de inserção/deleção, c.-557_-561insCATGA, anteriormente denominado -558ins (FIGURA 9). Este polimorfismo foi descrito como uma inserção CATGA (MATSUSHITA et al., 2000), porém não é possível determinar se a seqüência da inserção é CATGA ou TGACA.

Devido a possíveis variações de qualidade do DNA e dos produtos de PCR, a intensidade dos sinais na membrana pode variar, e nem sempre é possível distinguir sinais positivos fracos de sinais negativos. Como controle dessa variação, foi utilizado um oligonucleotídeo-sonda que é complementar a uma seqüência monomórfica, da posição – 607 à -593.

No gene *CD86* foi analisado um SNP, localizado no éxon 8, posição 1057G>A (dbSNP ref: rs1129055), que leva à substituição de aminoácido (Ala304Thr). Foi utilizado também um oligonucleotídeo-sonda que é complementar a uma seqüência monomórfica, da posição 1083 à 1097 (FIGURA 10).

-637 aagtacactg gtccagcatg ggtcagctgc tcactcacag gggctccaga atcctacaaa
 -577 gggacacaca ggggtg^{tg}ggtg^g gcaacctagt^g tggaaatggg agtgatgggc atgactaaag
 -517 tcttctcat cccaccagag gcgcactcaa ctgtggctag ggtgaccaga attcact^{tg}tc
 -457 ^acagcgtggct^c ggcaggagcc cactctctga agatgggtggg attcagaggt gggagtagag
 -397 ttg^cgggtggct^c ttgtgagc^ctg agcactctcc caaaagtgtc ccctacatat gaggttgaca
 -337 gcttatttct gcagggactc aggagtaact ctgggtgcta aaacaaaact tgagaccagc
 -277 acagaaacag ccagcccatg aagctggcct cccatc^aacac agcaaggcta gccagatgcc
 -217 cctcactctt ctcgggcacc attcttctcc tcccctaggc cgctggtgc tctgtgtgtt
 -157 tcatgtttgt tagtccatgc acggtgggtga gggaggctgc tgtgtgattt gccccagcca
 -97 cagcctctac ^gaaaagcaact^g agaagaa^ggac ggcagcagag ggcgcttctt caaacacct
 -37 gtccaactcc tggcactgac aag^ctactgag^c tgaactc^AAAA CCCTCTGTAA AGTAACAGAA
 +24 GTTAGAAGGG GAAATGTCGC CTCTCTGAAG

FIGURA 9 – SEQÜÊNCIA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80* (DE 5' A 3'), MOSTRANDO O SEGMENTO AMPLIFICADO POR PCR E AS POSIÇÕES DAS SONDAS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO

FORNE: GENBANK

NOTA: EM VERMELHO, LOCALIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

EM AZUL, SONDA MONOMÓRFICA

REALÇADO EM VERMELHO, SONDAS PARA A INSERÇÃO CATGA, POSIÇÃO -557_-561

REALÇADO EM ROSA, SONDAS PARA A POSIÇÃO -454

REALÇADO EM AMARELO, SONDAS PARA A POSIÇÃO -387

REALÇADO EM CINZA, SONDAS PARA A POSIÇÃO -232

REALÇADO EM VERDE CLARO, SONDAS PARA A POSIÇÃO -79

REALÇADO EM AZUL CLARO, SONDAS PARA A POSIÇÃO -7

EM ROSA, SONDAS PARA A POSIÇÃO +5

EM MAIÚSCULA, INÍCIO DO ÉXON 1

SUBLINHADO, NUCLEOTÍDEOS VARIÁVEIS

978 ctcaaatgtg **aaatatcacc** taatcttttc ttctatttct ccagAGAAAA AATCCATATA
 1038 CCTGAAAGAT CTTGATGAAG^A CCCAGCGTGT TTTTAAAAGT TCGAA**GACAT CTTCATGCGA**
 1098 CAAAAGTGAT ACATGTTTTT AATTAAAGAG **TAAAGCCCAT ACAAGTA**

FIGURA 10 – SEQÜÊNCIA DO ÉXON 8 DO GENE *CD86* (DE 5' A 3'), MOSTRANDO O SEGMENTO AMPLIFICADO POR PCR E AS POSIÇÕES DAS SONDAS UTILIZADAS NO PRESENTE TRABALHO

FONTE: GENBANK

NOTA: EM VERMELHO, LOCALIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

REALÇADO EM CINZA, SONDAS PARA A POSIÇÃO VARIÁVEL

REALÇADO EM VERDE, SONDA MONOMÓRFICA

EM MAIÚSCULA, INÍCIO DO ÉXON 8

SUBLINHADO, A POSIÇÃO VARIÁVEL ANALISADA, NUCLEOTÍDEO 1057G>A

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 c.-557_-561ins CATGA). Para o gene *CD86*, a região amplificada do éxon 8 contém 166 pb.

A mistura de reação para amplificação da região promotora do gene *CD80* foi: tampão 1X, (Tris-HCl 75mM pH 9,0, MgCl₂ 2mM, KCl 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM), 0,2mM de dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (TABELA 1), 0,75U de Tth DNA polimerase (*Thermus thermophilus*, Biotools) e 100ng de DNA genômico, em um volume final de 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, hibridação a 60° por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; 26 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação 65°C por 45 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 45 segundos; a etapa final de alongamento, a 72°C por 10 minutos.

Para amplificação do éxon 8 do gene *CD86*, a mistura de reação foi: tampão 1X, (Tris-HCl 75mM pH 9,0, MgCl₂ 2mM, KCl 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM), 0,2mM de dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (TABELA 1), 0,2U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 20ng de DNA genômico, em um volume final de 10 µl. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, hibridação a 56,7°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos e uma etapa final de alongamento, a 72°C por 10 minutos.

A amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% (FIGURA 11). Foram aplicados 2 µl do produto amplificado e 2 µl de GelRed (Biotools) diluído em tampão (0,2 ul de GelRed em 1 ml de tampão contendo 0,25% azul de bromofenol, 40% p/v sucrose em H₂O bidestilada). A corrida eletroforética foi realizada a 90 V/cm² por 30 a 40 min. O gel foi fotografado em luz ultravioleta.

TABELA 1 – SEQÜÊNCIA 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: CTTCAGAGAGGCGACATTC
Éxon 8 de <i>CD86</i>	CD86EX8FOR: CTCAAATGTGAAATATCACC CD86EX8REV: TACTTGTATGGGCTTTACTC

FONTE: MATSUSHITA et al., 2000

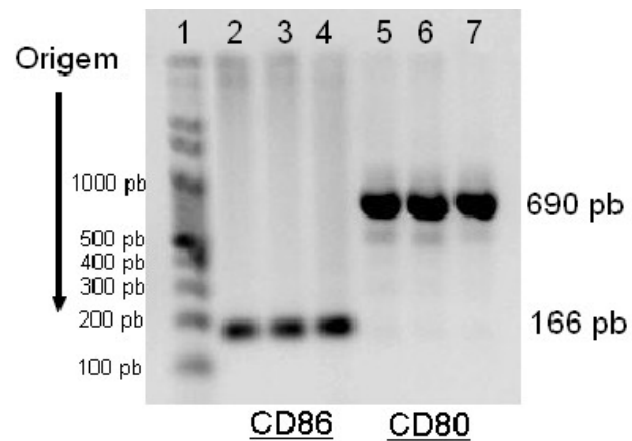


FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE 1% APÓS CORRIDA ELETOFORÉTICA DE PRODUTOS DE PCR DOS GENES *CD80* E *CD86*, CORADO COM GELRED E FOTOGRAFADO SOB LUZ ULTRAVIOLETA

NOTA: (1) MARCADOR DE TAMANHO; (2, 3 E 4) PRODUTOS AMPLIFICADOS DO ÉXON 8 DO GENE *CD86*, 166 pb; (5, 6 E 7) PRODUTOS AMPLIFICADOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*, 690 pb

FONTE: O autor (2008)

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 (QUADRO 1), 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 secas, as membranas foram submetidas à temperatura de 80°C por 2 horas, para fixação do DNA.

4.2.3 Hibridação

Para realizar a hibridação, os *dot blots* foram acondicionados em frascos próprios para os fornos de hibridação (Hybaib). Primeiramente foram hidratados e neutralizados em 10ml de SSPE 4X por 10 minutos a 37°C . Essa solução foi descartada e em seguida foi adicionada a solução de bloqueio (10 ml de solução de hibridação com caseína), por 30 minutos a 37°C . Essa etapa foi realizada para que não houvesse sinal de fundo durante a revelação, o que poderia dificultar a visualização dos resultados. A hibridação das sondas foi realizada adicionando-se 10 ml de solução de hibridação com caseína e 60 picomoles do oligonucleotídeo biotinilado a cada frasco, que permaneceu por no mínimo 1h30 min a 37°C . Essa solução foi armazenada a -20°C para posterior reutilização.

Transcorrida a etapa de hibridação, realizaram-se duas lavagens de baixa estringência, com 10 ml de SSC 2X por 10 min a 37°C , por duas vezes. A lavagem de alta estringência foi feita com 10ml de SSPE 5X SDS 0,1% por 20 min. A temperatura utilizada variou conforme a sonda (TABELA 2).

TABELA 2 – SEQÜÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA E TEMPERATURA DE ALTA ESTRINGÊNCIA PARA TIPAGEM DOS GENES *CD80* E *CD86*

LOCALIZAÇÃO	OLIGONUCLEOTÍDEO-SONDA (de 5' a 3')	T _m (°C)	To (°C)
<i>CD80</i> - 558	DEL: GGTGGCAACCTAGTT	48,0	52
	INS: TGG CATG ACAACCTA	43,6	42
<i>CD80</i> - 454	C1: TGTCCAG C GTGGCTG	55,5	48
	A2: TGTCCAG A GTGGCTG	50,8	52
<i>CD80</i> - 387	T1: GGTGGTCTTGTGAGC	49,7	52
	C2: GGTGGT C CTGTGAGC	52,5	52
<i>CD80</i> - 232	G1: ACACAGCA A GGCTAG	48,1	40
	A2: ACACAGCA A AGCTAG	45,3	38
<i>CD80</i> - 79	G1: AAAAGCA A GTAGAAGAA	42,3	46
	C2: AAAAGCA A CTAGAAGAA	42,3	46
<i>CD80</i> - 7	T1: TACTGAG T GAACTCA	41,6	36
	C2: TACTGAG C GAACTCA	45,7	42
<i>CD80</i> +5	C1: CTCAA A CCCTCTGTA	43,3	40
	A2: CTCAA A CTCTGTA	40,5	38
<i>CD80</i> promotor	PRO: TCACTCACAGGGGCT	52,5	42
<i>CD86</i> 1057	A1: TGATGAA A CCCAGCG	48,9	48
	G2: TGATGA A GCCAGCG	52,1	50
<i>CD86</i> éxon 8	EX8: GACATCTTCATGCGA	45,1	48

NOTA: T_m: TEMPERATURA DE ALTA ESTRINGÊNCIA CALCULADA NO PROGRAMA *OLIGO ANALIZER 3.0*; To: TEMPERATURA OTIMIZADA PARA LAVAGEM DE ALTA ESTRINGÊNCIA; EM NEGRITO, POSIÇÕES VARIÁVEIS

	Reagente	Quantidade	Concentração final
SSPE 20X	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.		
SSC 20X	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.		
Solução de hibridação com caseína	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	
Tampão Citrato	Citrato trissódico 2H ₂ O	29,4g	0,1M
	H ₂ Odd	q.s.p. 1L	
	Ajustar para pH 5,0 adicionando ácido cítrico monohidratado.		

QUADRO 1 – SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA HIBRIDAÇÃO E REVELAÇÃO DAS SONDAS

FONTE: O autor (2008)

Para o cálculo dessa temperatura (T_m - *melting temperature* ou temperatura de fusão), 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. Partiu-se desta temperatura para a realização dos testes, até que fosse determinada empiricamente a temperatura ideal para cada sonda.

Foi realizada, então, uma lavagem com 10 ml SSPE 3X SDS 0,5% por 10 min a 37°C. Em seguida acrescentaram-se 10 ml de SSPE 3X SDS 0,5% e 4 µg do conjugado HRP-SA (enzima peroxidase de raiz forte ligada ao anticorpo estreptoavidina – 1 mg/ml), por 30 min a 37°C. Nessa etapa o anticorpo 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 dos *dot blots* com 5 ml de tampão citrato, por 5 min a 37°C. A revelação foi feita através de reação colorimétrica: 5 ml de tampão citrato, 4 µl de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% e 150 µl de TMB (tetrametilbenzeno, 2 mg/ml), por 5 a 15 min a 37°C, no escuro. Nessa etapa, o peróxido de hidrogênio oxida o substrato TMB em meio ácido, reação catalizada pela enzima HRP, e o TMB precipita sob a cor azul. A reação foi interrompida com H_2O dd e as membranas foram armazenadas em H_2O dd a 4°C.

Três 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) (FIGURA 12). Como há variação na intensidade de sinal, foram consideradas na interpretação dos resultados a qualidade do produto amplificado por PCR, a comparação da intensidade de sinal entre *dot blots* hibridados com sondas para a mesma posição e ainda, a intensidade de sinal do *dot blot* hibridado com a sonda monomórfica.

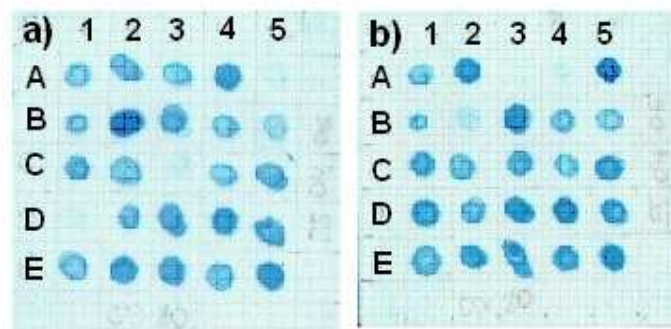


FIGURA 12 – *DOT BLOTS* PARA A TIPAGEM DO DNA DE 25 INDIVÍDUOS, HIBRIDADOS COM AS SONDAS PARA A POSIÇÃO -387 DO GENE *CD80*, ALELOS a) T E b) C; O INDIVÍDUO NA POSIÇÃO A1 É HETEROZIGOTO, NA POSIÇÃO A3 É HOMOZIGOTO PARA O ALELO T E NA POSIÇÃO A5 HOMOZIGOTO PARA O ALELO C
 FONTE: O autor (2008)

4.2.4 Desibridação

Os *dot blots* podem ser reutilizados para hibridações posteriores, desde que desibridados. Para tanto, foram descoloridos com etanol 80% até que não restasse nenhuma cor, retirando todo o TMB precipitado. A sonda é desibridada em solução de 500 ml de H₂O dd e 0,5 ml de SDS 10% fervida por 5min. Após 10 min nesta solução, são feitas duas lavagens com SSC 2X à temperatura ambiente (13°IHWC, 2000).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os genótipos foram incluídos no banco de dados do LGMH, no formato Microsoft Access versão 1997. As frequências alélicas, genotípicas e de portadores dos alelos (indivíduos que apresentam o alelo em homozigose ou heterozigose) foram obtidas por contagem direta com o auxílio do programa CONVERT 1.1 (PROBST, 1998) e do pacote de programas ARLEQUIN v. 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado através do algoritmo *random walk*, que utiliza uma versão modificada da cadeia de Markov (GUO e THOMPSON, 1992), também incluído no pacote de programas ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005). As frequências haplotípicas foram obtidas através do algoritmo ELB, no pacote de programas ARLEQUIN v. 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005), assim como os parâmetros estimados para o desequilíbrio de ligação (valor de P , D' e r^2). A comparação entre as populações foi realizada através teste exato de diferenciação populacional (MATIUZ et al., 1971). Valores de P abaixo de 0,05 foram considerados significantes. As distâncias genéticas entre as populações foram estimadas através da distância de Cavalli-Sforza modificada (NEI, TAJIMA e TATENO, 1983), e a partir desses dados foi construído um dendrograma utilizando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987), com o auxílio do programa DISPAN (OTA, 1993). Para o desenho do dendrograma foi utilizado o programa TreeView 1.6.6 (PAGE, 1996).

5 RESULTADOS

5.1 DIVERSIDADE DOS GENES *CD80* E *CD86*

Para o polimorfismo c.-557_-561insCATGA (anteriormente denominado -558), o alelo contendo a deleção é o mais comum em todas as populações analisadas. As populações indígenas, com exceção de Guarani Kaiowá (66,2%), apresentaram freqüências mais elevadas que as demais, sendo a mais alta em Guarani M'byá (97,7%). (TABELA 3). Entre as não ameríndias, a freqüência mais elevada foi a de EUR-BR (83,2%) e a mais baixa a de AFR-BR (75,9%).

Para o SNP c.-454C>A, o alelo C é o mais freqüente em todas as populações. Entre os ameríndios, as freqüências variaram de 66,2% em GKW a 97,4% em GRC. Nas demais populações a freqüência mais alta foi em EUR-BR (82,3%) e a mais baixa em AFR-BR (76,4%).

Para o SNP c.-387T>C, o alelo C é o mais freqüente em euro-brasileiros (53,6%) e em Ameríndios, com a freqüência mais baixa em Guarani Kaiowá (56,6%) e mais alta em Kaingang de Ivaí (86,4%). Entretanto, em afro-brasileiros e descendentes de japoneses o alelo T é o mais freqüente (64,3% e 75,0%, respectivamente). O valor mais alto de heterozigiosidade foi encontrado em euro-brasileiros (49,7%) e o mais baixo em Kaingang de Ivaí (22,4%).

Para o SNP c.-232G>A, o alelo G é o mais comum em todas as populações. Os indígenas, com exceção de GKW (66,2%), apresentaram freqüências superiores às das demais populações, sendo a mais elevada em GRC (97,6%). Entre os não ameríndios as freqüências variaram de 76,8% em AFR-BR a 83,1% em EUR-BR.

Em quatro das cinco populações indígenas analisadas neste estudo (totalizando 467 indivíduos), o nucleotídeo -79 é monomórfico, ou seja, a freqüência do alelo -79*C é superior a 99%. Em em Kaingang e em Guarani Kaiowá apenas o alelo -79*C foi encontrado. Três indivíduos ameríndios apresentaram o alelo G, todos em heterozigose, sendo dois Guarani M'byá e um Guarani Nãndeva. Entretanto, o SNP c.-79G>C é polimórfico em todas as populações urbanas investigadas, com heterozigiosidade de 19,0%, 27,1% e 45,0% em euro-brasileiros, afro-brasileiros e descendentes de japoneses, respectivamente. O alelo C é o mais

comum em todas estas populações, com a menor freqüência em JAP-BR (69,8%) e a maior em EUR-BR (90,5%).

Para o SNP c.-7T>C, o alelo T é o mais freqüente em todas as populações analisadas. Entre os indígenas, a freqüência mais elevada ocorre em GRC (97,4%) e mais baixa em GWK (66,2%). Entre as demais populações as freqüências variam de 76,6% em AFR-BR a 82,3% em EUR-BR.

O alelo 5'C do SNP c.5C>A é o mais comum entre as populações analisadas, atingindo freqüências mais elevadas nas populações indígenas, com exceção de GWK (66,2%), e a freqüência mais alta encontrada foi 97,6% (em GRC). Entre as populações não ameríndias, as freqüências variaram de 76,8% (em AFR-BR) a 83,7% (em EUR-BR).

TABELA 3: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES (%) DAS VARIANTES DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

	GRC	GND	GKW	KRC	KIV	EUR-BR	AFR-BR	JAP-BR
<i>-557_-561ins (-558)</i>	(n=88)	(n=84)	(n=160)	(n=103)	(n=127)	(n=149)	(n=243)	(n=92)
Alelos								
<i>CD80 -557_-561*del</i>	97,7	86,3	66,2	89,3	91,7	82,3	75,9	81,0
<i>CD80 -557_-561*ins</i>	2,3	13,7	33,7	10,7	8,3	16,8	24,1	19,0
Genótipos								
<i>del/del</i>	95,4	73,8	45,6	79,6	84,2	71,1	57,6	66,3
<i>del/ins</i>	4,5	25,0	41,3	19,4	15,0	24,2	36,6	29,3
<i>ins/ins</i>	0,0	1,2	13,1	1,0	0,8	4,7	5,8	4,3
Portadores								
<i>del</i>	100	98,8	86,9	99,0	99,2	95,3	94,2	95,6
<i>ins</i>	4,5	26,2	54,4	20,4	15,7	28,9	42,4	33,7
<i>P- HW</i>	~1	~1	0,38	~1	0,59	0,13	~1	0,73
<i>-454C>A</i>	(n=77)	(n=84)	(n=160)	(n=98)	(n=120)	(n=141)	(n=235)	(n=90)
Alelos								
<i>CD80 -454*C</i>	97,4	86,3	66,2	88,8	91,2	82,3	76,4	80,6
<i>CD80 -454*A</i>	2,6	13,7	33,7	11,2	8,7	17,7	23,6	19,4
Genótipos								
<i>C/C</i>	94,8	73,8	45,6	78,6	83,3	69,5	57,9	65,5
<i>C/A</i>	5,2	25,0	41,2	20,4	15,8	25,5	37,0	30,0
<i>A/A</i>	0,0	1,2	13,1	1,0	0,8	5,0	5,1	4,4
Portadores								
<i>C</i>	100	98,8	86,9	99,0	99,2	95,0	94,9	95,5
<i>A</i>	5,2	26,2	54,4	21,4	16,7	30,5	42,1	34,4
<i>P- HW</i>	~1	~1	0,38	~1	~1	0,15	0,86	0,74
<i>-387T>C</i>	(n=86)	(n=84)	(n=160)	(n=103)	(n=125)	(n=153)	(n=242)	(n=92)
Alelos								
<i>CD80 -387*C</i>	73,3	73,8	56,6	79,6	86,4	53,6	35,7	25,0
<i>CD80 -387*T</i>	26,7	26,2	43,4	20,4	13,6	46,4	64,3	75,0
Genótipos								
<i>C/C</i>	59,3	51,2	36,2	62,1	75,2	28,8	14,0	10,9
<i>C/T</i>	27,9	45,2	40,6	34,9	22,4	49,7	43,4	28,3
<i>T/T</i>	12,8	3,6	23,1	2,9	2,4	21,6	42,6	60,9
Portadores								
<i>C</i>	87,2	96,4	76,9	97,1	97,6	78,4	57,4	39,1
<i>T</i>	40,7	48,8	63,7	37,9	24,8	71,2	85,9	89,1
<i>P- HW</i>	0,01	0,16	0,04	0,55	0,70	~1	0,40	0,02
<i>-232G>A</i>	(n=82)	(n=84)	(n=160)	(n=101)	(n=124)	(n=148)	(n=239)	(n=92)
Alelos								
<i>CD80 -232*G</i>	97,6	86,3	66,2	89,1	91,5	83,1	76,8	81,0
<i>CD80 -232*A</i>	2,4	13,7	33,7	10,9	8,5	16,9	23,2	19,0
Genótipos								
<i>G/G</i>	95,1	73,8	45,6	79,2	83,9	70,9	58,6	66,3
<i>G/A</i>	4,9	25,0	41,2	19,8	15,3	24,3	36,4	29,3
<i>A/A</i>	0,0	1,2	13,1	1,0	0,8	4,7	5,0	4,3
Portadores								
<i>G</i>	100	98,8	86,9	99,0	99,2	95,3	95,0	95,6
<i>A</i>	4,9	26,2	54,4	20,8	16,1	29,0	41,4	33,7
<i>P- HW</i>	~1	~1	0,38	~1	~1	0,14	0,86	0,73

continua

TABELA 3: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES (%) DAS VARIANTES DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

	conclusão							
	GRC	GND	GKW	KRC	KIV	EUR-BR	AFR-BR	JAP-BR
<i>-79(C>G)</i>	(n=82)	(n=84)	(n=160)	(n=101)	(n=122)	(n=147)	(n=240)	(n=91)
Alelos								
<i>CD80 -79*C</i>	98,8	99,4	100	100	100	90,5	84,8	69,8
<i>CD80 -79*G</i>	1,2	0,6	0,0	0,0	0,0	9,5	15,2	30,2
Genótipos								
<i>C/C</i>	97,6	98,8	100	100	100	80,9	71,2	47,2
<i>C/G</i>	2,4	1,2	0,0	0,0	0,0	19,0	27,1	45,0
<i>G/G</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	7,7
Portadores								
<i>C</i>	100	100	100	100	100	100	98,3	92,3
<i>G</i>	2,4	1,2	0,0	0,0	0,0	19,0	28,7	52,7
<i>P - HW</i>	~1	~1	N.A.	N.A.	N.A.	0,36	0,62	0,62
<i>-7T>C</i>	(n=78)	(n=84)	(n=160)	(n=99)	(n=119)	(n=141)	(n=235)	(n=92)
Alelos								
<i>CD80 -7*T</i>	97,4	86,3	66,2	88,9	91,2	82,3	76,6	81,0
<i>CD80 -7*C</i>	2,6	13,7	33,7	11,1	8,8	17,7	23,4	19,0
Genótipos								
<i>T/T</i>	94,9	73,8	45,6	78,8	83,2	69,5	58,3	66,3
<i>T/C</i>	5,1	25,0	41,2	20,2	16,0	25,5	36,6	29,3
<i>C/C</i>	0,0	1,2	13,1	1,0	0,8	5,0	5,1	4,3
Portadores								
<i>T</i>	100	98,8	86,9	99,0	99,2	95,0	94,9	95,6
<i>C</i>	5,1	26,2	54,4	21,2	16,8	30,5	41,7	33,7
<i>P - HW</i>	~1	~1	0,37	~1	~1	0,15	0,86	0,73
<i>5C>A</i>	(n=83)	(n=84)	(n=160)	(n=100)	(n=123)	(n=147)	(n=239)	(n=91)
Alelos								
<i>CD80 5*C</i>	97,6	86,3	66,2	89,5	91,5	83,7	76,8	80,8
<i>CD80 5*A</i>	2,4	13,7	33,7	10,5	8,5	16,3	23,2	19,2
Genótipos								
<i>C/C</i>	95,2	73,8	45,6	80,0	83,7	71,4	58,6	65,9
<i>C/A</i>	4,8	25,0	41,2	19,0	15,4	24,5	36,4	29,7
<i>A/A</i>	0,0	1,2	13,1	1,0	0,8	4,1	5,0	4,4
Portadores								
<i>C</i>	100	98,8	86,9	99,0	99,2	95,9	95,0	95,6
<i>A</i>	4,8	26,2	54,4	20,0	16,3	28,6	41,4	34,1
<i>P - HW</i>	~1	~1	0,38	~1	~1	0,22	0,86	0,73

NOTA: GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESSES; *P*-HW: VALOR DE *P* PARA O TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG; N.A.: NÃO ANALISADO

Para o SNP c.1057G>A do éxon 8 do gene *CD86* (TABELA 4), o alelo G é o mais comum em EUR-BR, AFR-BR e nas populações ameríndias. A frequência mais elevada foi 98,9%, em GRC e a mais baixa 69,1%, em KIV. O maior valor de heterozigosidade foi encontrado em KIV (49,6%), e o menor em GRC (2,2%). As frequências genóticas foram similares entre GRC e GND ($P = 0,27$), entre KRC e EUR-BR ($P = 0,11$), entre GKW e GND ($P = 0,17$) e entre EUR-BR e AFR-BR ($P = 0,58$) (TABELA 5).

As frequências genóticas não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o SNP c.-387T>C em GRC ($P = 0,01$), GKW ($P = 0,04$) e JAP-BR ($P = 0,02$) e nas três amostras houve excesso de homozigotos para os dois alelos. Em todos os outros casos as frequências genóticas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os quinze indivíduos africanos analisados, embora constituindo uma amostra muito pequena e provavelmente não representativa do continente africano, apresentaram todos os alelos já descritos para os polimorfismos analisados e, ainda, todos os haplótipos encontrados para a combinação das variantes da região promotora do gene *CD80* (TABELA 6). Os alelos mais comuns foram: *CD80* -557_-561ins*Del, -454*C, -232*G, -79*C, -7*T e 5*C, assim como em todas as demais populações analisadas e -387*T, como em afro-brasileiros e descendentes de japoneses. Dentre os alelos da região promotora do gene *CD80*, o mais comum foi o promotor 3, diferente de todas as demais populações. Para o gene *CD86*, o alelo mais comum foi 1057*G, como em todas as demais populações, exceto descendentes de japoneses.

TABELA 4: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES (%) DAS VARIANTES DO SNP 1057G>A, ÉXON 8 DO GENE CD86

	GRC (n = 89)	GND (n = 83)	GKW (n = 161)	KRC (n = 110)	KIV (n = 131)	EUR-BR (n = 157)	AFR-BR (n = 252)	JAP-BR (n = 101)
Alelos								
CD86 1057*G	98,9	97,0	92,2	85,9	69,1	80,2	78,4	30,7
CD86 1057*A	1,1	3,0	7,8	14,1	30,9	19,7	21,6	69,3
Genótipos								
G/G	97,7	94,0	85,7	71,8	44,3	63,1	61,5	8,9
G/A	2,2	6,0	13,0	28,2	49,6	34,4	33,7	43,6
A/A	0,0	0,0	1,2	0,0	6,1	2,5	4,8	47,5
Portadores								
G	100	100	98,8	100	93,9	97,4	95,2	52,5
A	2,2	6,0	14,3	28,2	55,7	36,9	38,5	91,1
P - HW	~1	~1	0,24	0,12	0,10	0,45	~1	~1

NOTA: GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESES; P-HW: VALOR DE P PARA O TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

TABELA 5 - VALORES DE *P* PARA O TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL

	GRC	GND	GKW	KRC	KIV	EUR-BR	AFR-BR	JAP-BR
GRC		< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶
GND	0,26798		< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶
GKW	0,00120	0,04669		< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶
KRC	< 10 ⁻⁶	0,00032	0,01883		0,07514	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶
KIV	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶		< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶
EUR-BR	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	0,10499	0,00170		0,00001	< 10 ⁻⁶
AFR-BR	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	0,01825	0,00719	0,55271		0,00023
JAP-BR	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	< 10 ⁻⁶	

NOTA: NA PARTE DE BAIXO DA TABELA, DESTACADO EM CINZA, VALORES DE *P* PARA A COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *CD86*; NA PARTE DE CIMA DA TABELA, VALORES DE *P* PARA A COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*; GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESES

TABELA 6: FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DAS VARIANTES DOS GENES *CD80* E *CD86* E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80* EM AFRICANOS (n = 15)

<i>CD80</i> -557_-561		<i>CD80</i> -454		<i>CD80</i> -387		<i>CD80</i> -232		<i>CD80</i> -79		<i>CD80</i> -7		<i>CD80</i> 5		<i>CD80</i> Alleles		<i>CD86</i> 1057	
n		n		n		n		n		n		n		n*		n	
<i>DEL/DEL</i>	8	<i>C/C</i>	8	<i>T/T</i>	10	<i>G/G</i>	8	<i>C/C</i>	9	<i>T/T</i>	8	<i>C/C</i>	8	<i>Promotor 1</i>	7	<i>G/G</i>	8
<i>INS/DEL</i>	7	<i>C/A</i>	7	<i>T/C</i>	5	<i>G/A</i>	7	<i>C/G</i>	5	<i>T/C</i>	7	<i>C/A</i>	7	<i>Promotor 2</i>	4	<i>G/A</i>	7
<i>INS/INS</i>	0	<i>A/A</i>	0	<i>C/C</i>	0	<i>A/A</i>	0	<i>G/G</i>	1	<i>C/C</i>	0	<i>A/A</i>	0	<i>Promotor 3</i>	12	<i>A/A</i>	0
														<i>Promotor 4</i>	7		

NOTA: n: NÚMERO DE INDIVÍDUOS; n*: NÚMERO DE ALELOS

5.2 HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

As variantes da região promotora do gene *CD80* ocorrem em apenas quatro combinações haplotípicas (combinações de variantes de SNPs), que correspondem a alelos da região promotora do gene *CD80* (TABELA 7). O alelo denominado promotor 1 (MATSUSHITA et al., 2000) é virtualmente ausente em ameríndios devido ao monomorfismo da posição -79 nestas populações, com exceção de GRC, população na qual o alelo *G* apresenta frequência de 1,2%. Este alelo é o mais freqüente em descendentes de japoneses (30,9%) e o alelo *promotor 2* é o mais comum em todas as outras populações. Na comparação entre populações as frequências foram semelhantes apenas entre KIV e KRC ($P = 0,07$).

Todos os pares de SNPs do gene *CD80* estão em desequilíbrio de ligação absoluto ($D' = 1$), com valores de P estatisticamente significativos ($P < 0,05$) (TABELA 8). Os cálculos não foram realizados quando envolviam a posição -79 em ameríndios, pois o número de indivíduos portadores da variante *G* era muito pequeno sendo esse SNP, portanto, não informativo. Para os haplótipos formados pelas combinações das variantes das posições c.-557_-561insCATGA, c.-454C>A, c.-232G>A, c.-7T>C e c.5C>A, os valores de r^2 foram sempre iguais a 1. Para as combinações de variantes de outras posições, com exceção de GRC ($r^2 = 0,07$), os ameríndios apresentaram valores de r^2 mais elevados (0,44 a 0,66) do que demais populações (0,08 a 0,23). Entretanto, as análises de DL envolvendo a posição -387 devem ser interpretadas com cautela, pois para as amostras GRC, GKW e JAP-BR as frequências genotípicas não se distribuem de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para as combinações entre os alelos da região promotora do gene *CD80* e as variantes do SNP c.1057G>A do gene *CD86*, todos os oito haplótipos possíveis foram encontrados (TABELA 9). Todos os alelos da região promotora de *CD80* estão em acoplamento com o alelo *CD86 1057*G* em ameríndios, euro-brasileiros e afro-brasileiros, embora em KIV o alelo *CD80*promotor 2* ocorra com o alelo *CD86 1057*A* também em frequência elevada (31,5 % com o alelo *A* e 54,2% com o alelo *G*). Em descendentes de japoneses o alelo *CD86 1057*A* ocorre mais freqüentemente em cis com os alelos *CD80*promotor 1, 2 e 4* de *CD80* e o alelo

*CD80*promotor 3* ocorre em cis com *CD86 1057*A* e **G* com frequências similares (11,9 % e 13,6 %, respectivamente).

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS (OU HAPLÓTIPOS DE SNP) DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

	GRC (n=76)	GND (n=84)	GKW (n=160)	KRC (n=95)	KIV (n=119)	EUR-BR (n=139)	AFR-BR (n=233)	JAP-BR (n=89)
<i>Promotor 1</i> (DEL+CTGGTC)	1,3	0,6	0,0	0,0	0,0	9,7	15,7	30,9
<i>Promotor 2</i> (DEL+CCGCTC)	71,7	73,8	56,6	78,4	85,7	52,5	35,0	24,2
<i>Promotor 3</i> (DEL+CTGCTC)	24,3	11,9	9,7	11,0	5,5	20,5	25,7	25,3
<i>Promotor 4</i> (CATGA+ATACCA)	2,6	13,7	33,7	10,5	8,8	17,3	23,6	19,7

NOTA: GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESES

TABELA 8 - VALORES DE P, D' E r² PARA DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE CD80

	P	D'	r ²	P	D'	r ²	P	D'	r ²	P	D'	r ²	P	D'	r ²	P	D'	r ²
	-557_-561,-454			-557_-561, -387			-557_-561,-232			-557_-561,-7			-557_-561,5			-454,-387		
GRC	< 10 ⁻⁶	1	1	0,0013	1	0,07	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	0,0013	1	0,07
GND	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,45	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,45
GKW	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,66	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,66
KRC	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,44	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,45
KIV	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,58	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,58
EUR-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,23	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,23
AFR-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,17	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,17
JAP-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	0,0002	1	0,08	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	0,0002	1	0,08
	-454,-232			-454,-7			-454,5			-387,-232			-387,-7			-387,5		
GRC	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	0,0013	1	0,07	0,0013	1	0,07	0,0013	1	0,07
GND	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,45	< 10 ⁻⁵	1	0,45	< 10 ⁻⁵	1	0,45
GKW	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,66	< 10 ⁻⁵	1	0,66	< 10 ⁻⁵	1	0,66
KRC	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,44	< 10 ⁻⁵	1	0,44	< 10 ⁻⁵	1	0,44
KIV	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,58	< 10 ⁻⁵	1	0,58	< 10 ⁻⁵	1	0,58
EUR-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,23	< 10 ⁻⁵	1	0,23	< 10 ⁻⁵	1	0,23
AFR-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,17	< 10 ⁻⁵	1	0,17	< 10 ⁻⁵	1	0,17
JAP-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	0,0002	1	0,08	0,0002	1	0,08	0,0002	1	0,08
	-232,-7			-232,5			-7,5			-557_-561, -79			-454,-79			-387,-79		
GRC	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	N.A.			N.A.			N.A.		
GND	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	N.A.			N.A.			N.A.		
GKW	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	N.A.			N.A.			N.A.		
KRC	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	N.A.			N.A.			N.A.		
KIV	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	N.A.			N.A.			N.A.		
EUR-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	0,0125	1	0,02	0,0125	1	0,02	< 10 ⁻⁵	1	0,12
AFR-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,06	< 10 ⁻⁵	1	0,06	< 10 ⁻⁵	1	0,10
JAP-BR	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	1	< 10 ⁻⁵	1	0,11	< 10 ⁻⁵	1	0,11	< 10 ⁻⁵	1	0,14
										-232,-79			-79,-7			-79,5		
EUR-BR										0,0125	1	0,02	0,0125	1	0,02	0,0125	1	0,02
AFR-BR										< 10 ⁻⁵	1	0,06	< 10 ⁻⁵	1	0,06	< 10 ⁻⁵	1	0,06
JAP-BR										< 10 ⁻⁵	1	0,11	< 10 ⁻⁵	1	0,11	< 10 ⁻⁵	1	0,11

NOTA:GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESES; N.A.: NÃO ANALISADO

TABELA 9 – FREQUÊNCIAS (%) DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELAS COMBINAÇÕES ENTRE AS VARIANTES DOS GENES *CD80* E *CD86*

	GRC (n=74)	GND (n=83)	GKW (n=160)	KRC (n=95)	KIV (n=119)	EUR-BR (n=139)	AFR-BR (n=229)	JAP-BR (n=88)
<i>CD80</i> *promotor 1 / <i>CD86</i> 1057*A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	1,3	28,4
<i>CD80</i> *promotor 1 / <i>CD86</i> 1057*G	1,3	0,6	0,0	0,0	0,0	6,5	14,6	2,3
<i>CD80</i> *promotor 2 / <i>CD86</i> 1057*A	1,3	3,0	6,9	14,7	31,5	8,3	8,5	17,0
<i>CD80</i> *promotor 2 / <i>CD86</i> 1057*G	71,6	71,1	49,7	63,7	54,2	44,2	26,2	7,4
<i>CD80</i> *promotor 3 / <i>CD86</i> 1057*A	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	7,9	2,8	11,9
<i>CD80</i> *promotor 3 / <i>CD86</i> 1057*G	23,6	12,0	9,4	11,0	5,5	12,6	22,7	13,6
<i>CD80</i> *promotor 4 / <i>CD86</i> 1057*A	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,7	9,6	13,6
<i>CD80</i> *promotor 4 / <i>CD86</i> 1057*G	2,0	13,2	33,1	10,5	8,8	16,5	14,2	5,7

NOTA: GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESES

O desequilíbrio de ligação entre os genes *CD80* e *CD86* foi o máximo possível ($D' = 1$) entre todos os pares de alelos nas populações indígenas com exceção de GWK (TABELA 10). Porém algumas vezes o desequilíbrio não foi estatisticamente significativo, possivelmente devido às baixas frequências de alguns alelos em populações ameríndias, insuficiente para alcançar significância estatística considerando-se o tamanho da amostra. Para GWK o menor valor de D' foi 0,59. As populações indígenas apresentaram, com exceção do alelo *CD80*promotor 4*, para o qual o maior valor de D' ocorre em EUR-BR (0,79), valores de D' maiores do que as não ameríndias. Dentre as populações urbanas, euro-brasileiros apresentaram os maiores valores de D' para os alelos *CD80*promotor 2* e *CD80*promotor 4*.

TABELA 10: VALORES DE P , D' E r^2 PARA DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE $CD80$ E AS VARIANTES DO SNP 1057G>A DO GENE $CD86$

	$CD80$ Promoter 1, $CD86$			$CD80$ Promoter 2, $CD86$			$CD80$ Promoter 3, $CD86$			$CD80$ Promoter 4, $CD86$		
	P	D'	r^2	P	D'	r^2	P	D'	r^2	P	D'	r^2
GRC	N.A.	N.A.	N.A.	0,3862	1	0,00	0,4281	1	0,00	0,8377	1	0,00
GND	N.A.	N.A.	N.A.	0,1794	1	0,01	0,4007	1	0,00	0,3748	1	0,00
GKW	N.A.	N.A.	N.A.	0,0010	0,72	0,03	0,3167	0,59	0,00	0,0046	0,76	0,02
KRC	N.A.	N.A.	N.A.	0,0024	1	0,05	0,0448	1	0,02	0,0448	1	0,02
KIV	N.A.	N.A.	N.A.	$< 10^{-6}$	1	0,08	0,0119	1	0,03	0,0011	1	0,04
EUR-BR	0,0721	0,16	0,01	0,0549	0,22	0,01	0,0001	0,24	0,05	0,0024	0,79	0,03
AFR-BR	0,0016	0,63	0,02	0,3971	0,05	0,00	0,0008	0,50	0,02	$< 10^{-6}$	0,25	0,06
JAP-BR	$< 10^{-6}$	0,74	0,10	0,8347	0,02	0,00	$< 10^{-6}$	0,34	0,10	0,9504	0,01	$< 10^{-6}$

NOTA: GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESES; N.A.: NÃO ANALISADO

5.3 DENDROGRAMA DE POPULAÇÕES COM BASE NAS FREQUÊNCIAS DOS GENES *CD80* E *CD86*

Um dendrograma foi construído a partir das distâncias genéticas entre as populações analisadas e ainda as descritas na literatura para os genes *CD80* e *CD86* (FIGURA 13). Os ameríndios formaram um grupo separado das demais populações e, dentro deste grupo, Guarani e Kaingang formaram grupos distintos. No grupo Guarani, Guarani Kaiowá foi a população mais diferenciada. Japoneses e descendentes de japoneses formaram um grupo consideravelmente diferenciado das demais populações, especialmente de ameríndios, com valor máximo de bootstrap.

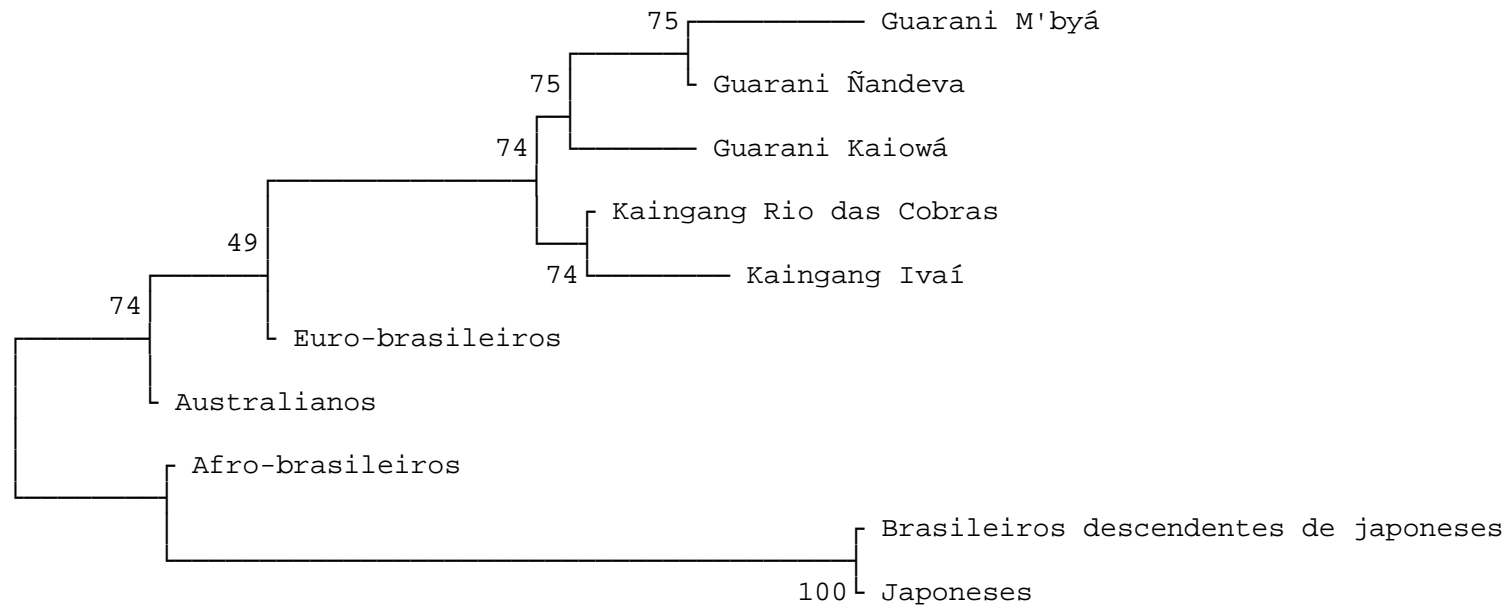


FIGURA 13 – DENDROGRAMA CONSTRUÍDO ATRAVÉS DO MÉTODO *NEIGHBOR-JOINING* E BASEADO NA DISTÂNCIA GENÉTICA DE CAVALLI-SFORZA MODIFICADA (NEI, TAJIMA E TATENO, 1983) PARA OS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80* E ÉXON 8 DO GENE *CD86*
 FONTE: AUSTRALIANOS DE ORIGEM EUROPÉIA (TEUSCH ET AL., 2004); JAPONESES (MATSUSHITA ET AL., 2000)

6 DISCUSSÃO

6.1 POLIMORFISMO DOS GENES *CD80* E *CD86*

Todas as variantes dos polimorfismos analisados nos genes *CD80* e *CD86* e ainda todos os alelos desses genes (que correspondem a haplótipos dos SNPs e o indel) foram encontrados na pequena amostra de indivíduos africanos (n = 15) mesmo excluindo quatro indivíduos de ancestralidade mista africana e europeia. Portanto foi possível concluir que todos os polimorfismos analisados neste estudo surgiram no continente africano, antes das migrações humanas para fora da África.

O SNP c.-79C>G é polimórfico em todas as populações europeias e euro-descendentes já analisadas, na população japonesa e em nossas amostras de africanos, euro- e afro-descendentes e em descendentes de japoneses. Altos níveis de polimorfismo podem ser observados, especialmente em descendentes de japoneses. Esses dados indicam que o nucleotídeo -79 é polimórfico em todo o “Velho Mundo”. Entretanto, em quatro das cinco populações ameríndias analisadas neste estudo, esse nucleotídeo é monomórfico e o alelo G ocorre provavelmente apenas devido a fluxo gênico recente de populações não ameríndias. Através da análise de genes *HLA*, utilizando alelos como marcadores de ancestralidade, o fluxo gênico estimado de europeus e africanos sub-saharianos para populações ameríndias foi de 4% para Guarani M’byá, 14% para Guarani Nandeva e 7% para Kaingang. Para Guarani Kaiowá não foi detectada evidência de fluxo gênico (PETZL-ERLER et al., 1993; TSUNETO et al., 2003).

A aparente ausência do alelo -79*G em populações ameríndias é provavelmente devida ao efeito fundador característico das populações que colonizaram as Américas. No período das migrações humanas da Ásia para a América ou das migrações dentro do continente americano, do norte em direção ao sul, estima-se que o tamanho efetivo da população tenha sido pequeno e assim, estas populações estiveram sujeitas ao efeito de deriva genética por longos períodos de tempo. Os indivíduos fundadores não possuíam o alelo -79*G ou não o transmitiram a seus descendentes. É possível, ainda, que este alelo tenha sido trazido para a América, e posteriormente tenha sido eliminado das populações

ameríndias por seleção natural. Para elucidar a história evolutiva deste polimorfismo outras populações ameríndias devem ser analisadas.

Para o SNP c.-387T>C o alelo C é o mais comum em ameríndios, euro-brasileiros e também em australianos de origem europeia (TEUTSCH et al., 2004). Por outro lado, em afro-brasileiros, descendentes de japoneses e ainda na população japonesa (MATSUSHITA et al., 2000), o alelo T é o mais freqüente. Entretanto, todas as populações apresentam altos níveis de polimorfismo para este nucleotídeo, e a variação nas freqüências alélicas é provavelmente devida à deriva genética, embora não se possa descartar a hipótese de seleção balanceadora modulando a diversidade deste polimorfismo genético.

O SNP c.1057G>A do éxon 8 do gene *CD86* é um SNP não sinônimo que leva à substituição do aminoácido alanina por treonina (A304T) e introduz um potencial sítio de fosforilação na região citoplasmática da molécula *CD86* (DELNESTE et al., 2000; MATSUSHITA et al., 2000). O alelo G é o mais comum em populações europeias e de ancestralidade europeia (DELNESTE et al., 2000; TURPEINEN et al., 2002; TEUTSCH et al., 2004; ABDALLAH et al., 2006) e também em euro-brasileiros, afro-brasileiros, africanos e ameríndios. Euro-brasileiros apresentaram a maior freqüência já descrita para este alelo dentre as populações urbanas, o que pode ser devido aos aproximadamente 7% de ancestralidade ameríndia dessa população (BRAUN-PRADO et al., 2000; PROBST et al., 2000), uma vez que os ameríndios possuem as freqüências mais altas já descritas para este alelo (até 98,9%).

Os brasileiros descendentes de japoneses e os japoneses (MATSUSHITA et al., 2000) são as únicas populações nas quais o alelo *CD86 1057*A* é o mais freqüente (69,3 e 66%, respectivamente). Portanto, a alteração das freqüências alélicas, com o alelo A se tornando o mais freqüente, provavelmente ocorreu recentemente na população japonesa.

As freqüências do SNP c.1057G>A em KIV (TABELA 4) são semelhantes às descritas em franceses (DELNESTE et al., 2000), bretões (ABDALLAH et al., 2006), finlandeses (TURPEINEN et al., 2002) e australianos de origem europeia (TEUTSCH et al., 2004). As freqüências de AFR-BR foram similares às de franceses e australianos, as de EUR-BR foram semelhantes apenas às de franceses e as de JAP-BR apenas às de japoneses (TABELA 11).

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS (%) DAS VARIANTES DO SNP 1057G>A, ÉXON 8 DO GENE CD86

<i>CD86</i>	Fran ⁽¹⁾ (n = 60)	Bret ⁽²⁾ (n = 227)	Finl ⁽³⁾ (n = 611)	Aust ⁽⁴⁾ (n = 116)	Japo ⁽⁵⁾ (n = 168)
Alelos					
1057*G	72,5	73,0	66,0	72,0	34,0
1057*A	27,5	27,0	34,0	28,0	66,0
Genótipos					
G/G	51,7	52,0	43,0	51,0	10,7
G/A	41,7	42,0	46,5	42,0	45,8
A/A	6,6	6,0	10,5	7,0	43,5
Portadores					
G	93,3	94,0	89,5	93,0	56,5
A	48,3	48,0	57,0	49,1	89,3

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

NOTA : JAPO : JAPONESES ; FRAN : FRANCESES ; BRET : BRETÕES ; FINL : FINLANDESES ; AUST : AUSTRALIANOS DE ANCESTRALIDADE EUROPÉIA

Estas similaridades em muitos casos não são concordantes com a história evolutiva destas populações, porém é importante salientar que trata-se de apenas um loco e, além disso, semelhanças entre populações podem ser devidas a outros fatores, assim como fluxo gênico, deriva genética e seleção natural, e não apenas pela ancestralidade comum.

As análises estatísticas não foram realizadas com a amostra de africanos devido ao pequeno número de indivíduos analisados ($n = 15$).

6.2 ORIGEM DOS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

Na comparação das freqüências dos alelos da região promotora do gene *CD80* com a população japonesa (MATSUSHITA et al., 2000) e com australianos descendentes de europeus (TEUTSCH et al., 2004), a única similaridade encontrada foi entre JAP-BR e japoneses, com $P = 0,52$, embora para EUR-BR e australianos o valor de P seja próximo ao limiar de significância, 0,04 (TABELA 12).

A partir da distribuição das freqüências dos alelos da região promotora do gene *CD80* em todas as populações já analisadas, propomos um modelo para a origem e evolução destes alelos (FIGURA 14). Duas hipóteses são igualmente prováveis: em uma delas, o alelo ancestral (correspondente ao haplótipo formado pelos polimorfismos da região promotora do gene) seria o promotor 2 (-557_-561*DEL,-454*C,-387*C,-232*G,-79*C,-7*T,5C), que tem ocorrência global e é o mais freqüente na maioria das populações, com exceção dos japoneses e descendentes de japoneses. O alelo promotor 3 pode ter sido originado através de uma mutação de ponto, transição de C para T, na posição -387.

TABELA 12 - FREQUÊNCIAS (%) DOS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*

	GRC (n=76)	GND (n=84)	GKW (n=160)	KRC (n=95)	KIV (n=119)	EUR-BR (n=139)	AFR-BR (n=233)	JAP-BR (n=89)	Japo ⁽¹⁾ (n=270)	Aust ⁽²⁾ (n=118)
<i>Promotor 1</i> (DEL+CTGGTC)	1,3	0,6	0,0	0,0	0,0	9,7	15,7	30,9	37,0	10,0
<i>Promotor 2</i> (DEL+CCGCTC)	71,7	73,8	56,6	78,4	85,7	52,5	35,0	24,2	24,0	62,0
<i>Promotor 3</i> (DEL+CTGCTC)	24,3	11,9	9,7	11,0	5,5	20,5	25,7	25,3	21,0	21,0
<i>Promotor 4</i> (CATGA+ATACCA)	2,6	13,7	33,7	10,5	8,8	17,3	23,6	19,7	18,0	7,0

FONTE: 1: MATSUSHITA et al., 2000; 2 :TEUTSCH et al., 2004

NOTA: GRC: GUARANI M'BYÁ; GND: GUARANI ÑANDEVA; GKW: GUARANI KAIOWÁ; KRC: KAIGANG DE RIO DAS COBRAS; KIV: KAINGANG DE IVAÍ; JAP-BR: BRASILEIROS DESCENDENTES DE JAPONESES; JAPO : JAPONESES ; FRAN : FRANCESES ; BRET : BRETÕES ; FINL : FINLANDESES ; AUST : AUSTRALIANOS DE ANCESTRALIDADE EUROPÉIA ; EUR-BR: EURO-BRASILEIROS; AFR-BR: AFRO-BRASILEIROS

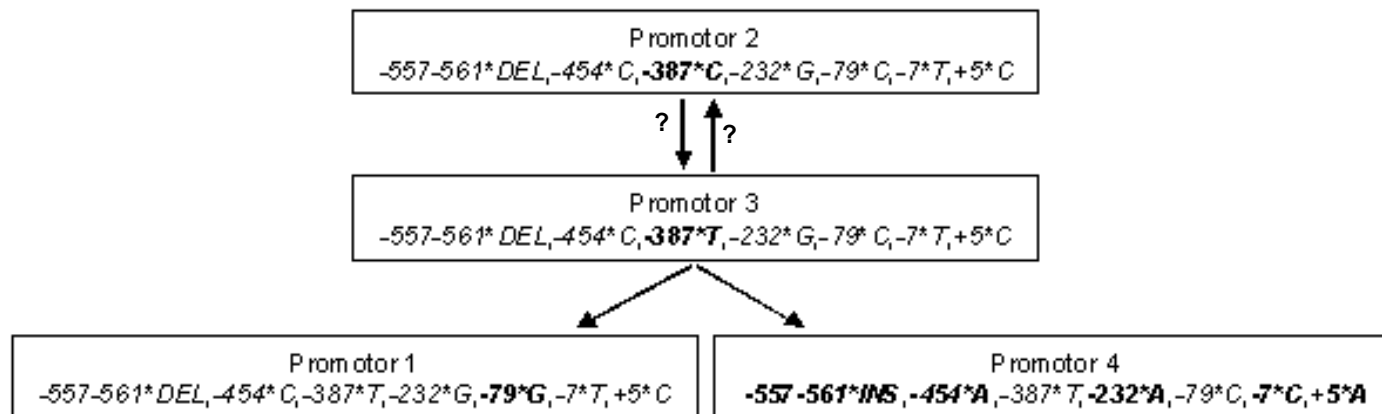


FIGURA 14 - HIPÓTESE DE ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS ALELOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CD80*
 FONTE: O autor (2008)

De acordo com este modelo, os alelos promotor 1 e 4 teriam sido originados a partir do promotor 3. O alelo promotor 1 teria sido originado por uma transversão, de C para G, na posição -79 e o promotor 4 por uma inserção de 5 pb na posição -557_-561, duas transversões de C para A, nas posições -454 e 5 e duas trasições, G para A na posição -232 e T para C na -7. Todas as posições estão em desequilíbrio de ligação absoluto ($D' = 1$ e $r^2 = 1$) e o promotor 4 é o único que contém as variantes -557_-561*INS, -454*A, -232*A, -7*C e 5*A. Como seria improvável a ocorrência de cinco mutações no mesmo cromossomo em posições tão próximas, alelos intermediários aos promotores 3 e 4, contendo apenas uma destas mutações podem ter existido em populações ancestrais e podem existir em populações ainda não analisadas.

Pela segunda hipótese, o alelo promotor 3 (-557_-561*DEL,-454*C, -387*T, -232*G, -79*C, -7*T, 5C) seria o alelo ancestral, o mais freqüente em africanos e consideravelmente comum em descendentes de japoneses (25,3%), Guarani M'byá (24,3%) e afro-brasileiros (25,7%) e que teria originado todos os demais alelos. O alelo promotor 2 teria surgido por uma mutação de ponto, transição de T para C na posição -387. Os alelos promotores 1 e 4 teriam sido originados do mesmo modo como foi descrito para a hipótese anterior.

6.3 DENDROGRAMA DE POPULAÇÕES COM BASE NAS FREQUÊNCIAS DOS GENES *CD80* E *CD86*

No dendrograma construído a partir das distâncias genéticas entre as populações analisadas e as descritas na literatura (japoneses e australianos) para os genes *CD80* e *CD86* (FIGURA 13), os ameríndios formaram um grupo separado das demais populações, com valor de *bootstrap* = 49. Dentro do grupo ameríndio, Guarani e Kaingang formaram grupos distintos, com valor de *bootstrap* = 74. No grupo Guarani, Guarani Kaiowá foi a população mais diferenciada. Comparando os dois grupos, Guarani e Kaingang, GKW e KRC são os mais próximos. Evidências de fluxo gênico entre Kaingang e Guarani já foram relatados em estudos anteriores do nosso grupo. Em

um estudo com genes *HLA* foi estimado que 1,4% dos haplótipos encontrados em Guarani são de origem Kaingang e 0,5% dos haplótipos presentes em Kaingang são de origem Guarani (PETZL-ERLER et al., 1993, OLIVEIRA et al., 2008).

Japoneses e descendentes de japoneses formaram um grupo consideravelmente diferenciado das demais populações (*bootstrap* = 100), especialmente de ameríndios. A hipótese consenso sobre o povoamento das Américas é a de que os ameríndios descendem de populações do leste asiático, que migraram para a América através do estreito de Bering, durante a última glaciação, entrando pela América do Norte e migrando posteriormente para a América Central e América do Sul (ROGERS et al., 1992; WALLACE e TORRONI, 1992). A história evolutiva dos genes *CD80* e *CD86* não reflete a história dessas populações. Porém não é inesperado que populações relacionadas apresentem frequências contrastantes para uma parte dos locos genéticos. Além disso, é importante ressaltar que nós internos do dendrograma baseado em frequências gênicas de diferentes populações de uma mesma espécie não representam necessariamente ancestralidade comum destas populações e que agrupamento de populações pode resultar não apenas de ancestralidade comum, mas também de fluxo gênico, seleção natural e fatores evolutivos estocásticos.

O dendrograma reflete as frequências dos genes *CD80* e *CD86*. Para reconstruir a história evolutiva das populações seriam necessários dados de vários locos não ligados. Considerando a grande distância encontrada entre o grupo formado por japoneses e descendentes de japoneses e as demais populações, a mudança nas frequências alélicas dos genes *CD80* e *CD86* ocorreu recentemente em termos evolutivos, nos ancestrais dos japoneses ou ainda nos ancestrais de todas as populações do leste asiático.

7 CONCLUSÕES

A posição -79 da região promotora do gene *CD80* é monomórfica em quatro das cinco populações ameríndias analisadas, pertencentes às tribos Guarani e Kaingang. Apenas em Guarani M'byá o alelo G atinge frequência superior a 1% (1,2%).

A origem e história evolutiva dos alelos da região promotora do gene *CD80* foi hipotetizada, e o alelo ancestral é provavelmente o promotor 2 ou o promotor 3. Os alelos promotor 1 e promotor 4 se originaram a partir do promotor 3. Todos os alelos surgiram no continente africano, e o promotor 1 foi perdido em ameríndios provavelmente devido ao efeito fundador sofrido pelas populações paleo-ameríndias durante as migrações da Ásia para a América ou no continente americano.

Para o SNP 1057G>A do éxon 8 do gene *CD86*, o alelo A é o mais freqüente em descendentes de japoneses e também na população japonesa, e o alelo ancestral G é o mais comum em todas as demais populações. Portanto, a alteração das freqüências alélicas, com o alelo A tornando-se o mais freqüente, provavelmente ocorreu recentemente nas populações asiáticas ancestrais.

A diversidade intrapopulacional encontrada em ameríndios para os genes *CD80* e *CD86* é menor e o desequilíbrio de ligação é em geral maior do que em populações não indígenas, como esperado para populações pequenas e isoladas devido ao efeito de deriva genética e baixo fluxo gênico.

É possível inferir que todos os polimorfismos analisados nos genes *CD80* e *CD86* surgiram no continente africano, antes das primeiras migrações para fora da África.

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**, Londres, 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**, Londres, 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**, Amsterdam, v. 104, p. 70-75, 2006.

BRAUN-PRADO, K.; MION, A. L. V.; 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**, Copenhagen, v. 56, p. 417-427, 2000.

CAVALLI-SFORZA, L. L. The DNA revolution in population genetics. **Trends in Genetics**, Cambridge, v.14, n. 2, 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**, Nova York, v. 33, p.266-275, 2003.

COLLINS, M.; LING, V.; CARRENO, B.M. The B7 family of immune-regulatory ligands. **Genome Biology**, Londres, v. 6, p. 223.1-223.7, 2005.

CORYDON, T.J.; HAAGERUP, A.; JENSEN, T.G.; BINDERUP, H.G.; PETERSEN, M.S.; KALTOFT, K.; VESTBO, J.; KRUSE, T.A.; BØRGLUM, A.D. A functional CD86 polymorphism associated with asthma and related allergic disorders. **Journal of Medical Genetics**, Londres, v. 44, p. 509-515, 2007.

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**, Nova York, v. 51, p. 762-763, 2000.

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

FAGUNDES, N.J.; KANITZ, R.; ECKERT, R.; VALLS, A.C.; BOGO, M.R.; SALZANO, F.M.; SMITH, D.G.; SILVA, W.A.Jr.; ZAGO, M.A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.; SANTOS, S.E.; PETZL-ERLER, M.L.; BONATTO, S.L. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 82, n. 3, p. 583-592, 2008.

FAGUNDES, N.J.R.; KANITZ, R.; BONATTO, S.L. A reevaluation of the native American mtDNA genomic diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. **PLOS One**, San Francisco, v. 3, n. 9, 2008.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Programa distribuído pelo autor. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2004.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO (FUNAI). Disponível em: <<http://www.funai.gov.br>>. Acesso em: 11 set. 2008.

GENETIC SEQUENCE DATA BANK (GENBANK). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 09 ago. 2007.

GONÇALVES, V.F.; PROSDOCIMI, F.; SANTOS, L.S.; ORTEGA, J.M.; PENA, S.D. Sex-biased gene flow in African Americans but not in American Caucasians. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 156-161, 2007.

GONZÁLEZ-JOSÉ, R.; BORTOLINI, M.C.; SANTOS, F.R.; BONATTO, S.L. The peopling of America: craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v. 137, n. 2, p. 175-187, 2008.

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

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo Demográfico**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em: 02 nov. 2008.

Instituto Socioambiental. Disponível em: <<http://www.socioambiental.org/website/pib/index.html>>. Acesso em: 23 ago. 2007.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. O sistema imune 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**, Cambridge, 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**, Nova York, v. 42, p. 85-89, 1995.

JIANG, Z.; FENG, X.; ZHANG, W.; GAO, F.; LING, Q.; ZHOU, L.; XIE, H.; CHEN, Q.; ZHENG, S. Recipient cytotoxic T lymphocyte antigen-4 +49 G/G genotype is associated with reduced incidence of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation among Chinese patients. **Liver International**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 1202-1208, 2007.

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

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

KIDD, K.K.; MORAR, B.; CASTIGLIONE, C.M.; ZHAO, H.; PAKSTIS, A.J.; SPEED, W.C.; BONNE-TAMIR, B.; LU, R.B.; GOLDMAN, D.; LEE, C.; NAM, Y.S.; GRANDY, D.K.; JENKINS, T.; KIDD, J.R. A global survey of haplotype frequencies and linkage disequilibrium at the DRD2 locus. **Human Genetics**, Berlin, v. 103, n. 2, p. 211-227, 1998.

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**, London, v. 9, n. 19, p. 5444, 1991.

LONJOU, C.; ZHANG, W.; COLLINS, A.; TAPPER, W.J.; ELAHI, E.; MANIATIS, N.; MORTON, N.E. Linkage disequilibrium in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 10, p. 6069-6074, 2003.

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**, Nova York, 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**, Dunton Green, v. 15, p. 69-74, 2005.

MARRERO, A.R.; SILVA-JUNIOR, W.A.; BRAVI, C.M.; HUTZ, M.H.; PETZL-ERLER, M.L.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v. 132, n. 2, p. 301-310.

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**, Houndmills, v. 7, p. 428-434, 2000.

MATTIUZ, P. L.; IHDE, D.; PIAZZA, A.; CEPPELLINI, R. e BODMER, W. F. **New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HLA system**. Terasaki PI ed. Histocompatibility testing Munksgaard, Copenhagen; 1971.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 19, p. 153-170, 1983.

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**, Washington, v. 102, n. 51, p. 18309-18314, 2005.

NEVES, W.A.; HUBBE, M.; PILÓ, L.B. Early Holocene human skeletal remains from Sumidouro Cave, Lagoa Santa, Brazil: history of discoveries, geological and chronological context, and comparative cranial morphology. **Journal of Human Evolution**, Londres, v. 52, n. 1, p. 16-30, 2007.

Oligo Analyzer 3.0. Integrated DNA Technologies. Disponível em <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>>. Acesso em 28 jun. 2006.

OLIVEIRA, L.A.; RIBAS, F.; BICALHO, M.G.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. High frequencies of alleles MICA*020 and MICA*027 in Amerindians and evidence of positive selection on exon 3. **Genes and Immunity**, Houndmills, v. 9, n. 8, p. 697-705, 2008.

OTA, T. **Dispan: genetic distance and phylogenetic analyses**. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, University Park, PA, 1993.

PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 12, p. 357-358, 1996.

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

PARHAM, P.; ARNETT, K.L.; ADAMS, E.J.; LITTLE, A.-M.; TEES, K.; BARBER, L.D.; MARSH, S.G.E.; OHTA, T.; MARKOW, T.; PETZL-ERLER, M.L. Episodic evaluation and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americas. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 50, p. 219-232, 1997.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D.J. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 100, n. 1, p. 177-182, 2002.

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**, São Paulo, v. 51, p. 199-211, 1999.

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**, Copenhagen, v. 41, p. 227-237, 1993.

PIMENTA, J.R.; ZUCCHERATO, L.W.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.; SOARES, R.P.; MOURA-NETO, R.S.; ROCHA, J.; BYDLOWSKI, S.P.; PENA, S.D.J. Color and Genomic Ancestry in Brazilians: A Study with Forensic Microsatellites. **Human Heredity**, Basel, v. 62, n. 4, p. 190-195, 2006.

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

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**, Detroit, v. 72, p. 597-617, 2000.

PUCCIARELLI, H.M.; GONZÁLEZ-JOSÉ, R.; NEVES, W.A.; SARDI, M.L.; ROZZI, F.R. East-West cranial differentiation in pre-Columbian populations from Central and North America. **Journal of Human Evolution**, Londres, v. 54, p. 296-308, 2008.

ROGERS, R.A.; ROGERS, L.A.; MARTIN, L.D. How the door opened: the peopling of the new world. **Human Biology**, Detroit, v. 64, p. 281-302, 1992.

SAITOU, N; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANSOM, D.M.; MANZOTTI, C.M.; ZHENG, Y. What's the difference between CD80 and CD86? **TRENDS in Immunology**, Oxford, 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**, Nova York, v. 36, p. 175-181, 1992.

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

TEUTSCH, 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**, Amsterdam, v. 148, p. 218-230, 2004.

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**, Copenhagen, v. 62, p. 512-526, 2003.

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

WALLACE, D.C.; TORRONI, A. American Indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: a review. **Human Biology**, Detroit, v. 64, p. 403-416, 1992.

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**, Berlin, v. 100, p. 548-556, 1997.

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**, Amsterdam, v. 105, p. 184-188, 2000.

ZOU, W.; CHEN, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumor microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 8, n. 6, p. 467-477, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1.....	84
ANEXO 2.....	87

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

“ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS, EM POPULAÇÕES”

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa ANÁLISE DE GENES DE FUNÇÃO RELACIONADA À RESPOSTA IMUNE, EM POPULAÇÕES.

Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

- OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo principal desse estudo é conhecer as variações normais de genes (formas alternativas de genes, denominadas *alelos*) e suas freqüências, em populações humanas.

Por exemplo, para grupos sanguíneos, há 3 variações (alelos) principais: A, B e O. As combinações dessas resultam no grupo sanguíneo do indivíduo (combinações A/A ou A/O = grupo A; B/B ou B/O = grupo B; A/B = grupo AB; O/O = grupo O). As freqüências de A, B e O diferem, entre populações. Por exemplo, nas populações indígenas das Américas o grupo sanguíneo B praticamente inexistente (quase 100% das pessoas pertencem ao tipo O), enquanto na Europa 35% das pessoas são do tipo B e, na África, 20%.

Enquanto a distribuição geográfica/étnica das variações do gene ABO são bem conhecidas, a diversidade populacional da maioria dos outros genes ainda é desconhecida. Nesse trabalho de pesquisa, vamos analisar 20 a 30 outros genes, em vários grupos da população brasileira.

O resultado será útil para conhecer as origens e as relações históricas das populações atuais e para compreender as causas da diversidade humana normal.

- PROCEDIMENTOS

Se você participar deste estudo, será colhida uma amostra de seu sangue (10 até 20 ml, ou seja, correspondente a uma seringa pequena a média) e você irá responder a

algumas perguntas sobre a sua origem geográfica e a origem de seus ancestrais, assim como sobre a sua saúde.

- RISCOS

Não há riscos previstos nesta etapa do estudo, sendo que o único desconforto poderá ser a retirada da amostra de sangue.

- BENEFÍCIOS

Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você, mas o conhecimento adquirido com este estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da diversidade genética normal da espécie humana. Isso poderá contribuir para a compreensão das funções dos genes estudados, assim como para a análise das relações históricas/biológicas entre as populações humanas.

- PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A sua participação neste estudo é *voluntária*. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado para justificar a sua falta.

- ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

- IDENTIFICAÇÃO

A sua identificação será mantida confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

- EQUIPE DE PESQUISADORES

Os pesquisadores envolvidos nesse projeto são:

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, UFPR

Colaboradores (2006): Profa. Dra. Karin Braun-Prado (Doutora em Genética), Profa.

Dra. Ilíada Rainha de Souza (Pós-Doutoranda, UFPR), Karen Francine Köhler,

Danielle Malheiros Ferreira (Doutorandas em Genética, UFPR), Liana Alves de Oliveira (Mestre em Genética, UFPR), Márcia Holsbach Beltrame, Danillo Gardenal Augusto (Mestrandos em Genética, UFPR), Gabriel A. Cipolla, Ricardo Dalla Costa, Bruno Zagonel Piovezan, Rafael H. Estrugala, Paloma T. Minervini (Graduandos, UFPR).

Diante do exposto acima eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre os objetivos do presente estudo, sobre os desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que poderão resultar deste estudo. Concedo meu acordo de participação de livre e espontânea vontade. Foi-me assegurado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

Curitiba, ____ de _____ de _____

Voluntário (assinatura)

Documento

Pesquisador (assinatura)

RG

ANEXO 2**Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH)****FICHA DE AVERIGUAÇÃO
Painel do Laboratório**

- CÓDIGO DO INDIVÍDUO: _____
- TIPO SANGÜÍNEO: _____ MATERIAL COLHIDO / VOLUME: _____

IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL:

NOME: _____ IDADE: _____
 TELEFONE(residencial): _____ TELEFONE(comercial): _____ TELEFONE(celular): _____ TELEFONE(fax): _____
 MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA: _____ UF: _____
 RUA: _____ Nº.: _____
 BAIRRO: _____ E-MAIL: _____
 MUNICÍPIO DE NASCIMENTO: _____ UF: _____
 DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ SEXO: _____
 PROFISSÃO: _____
 GRAU DE INSTRUÇÃO: _____
 PESSOA P/ CONTATO: _____ TELEFONE: _____

GRUPO ÉTNICO / ANCESTRALIDADE:

Lab	Segundo IBGE
<input type="checkbox"/> Africano (N)	
<input type="checkbox"/> Europeu (B)	(1) Branca
<input type="checkbox"/> Indígena (I)	(2) Preta
<input type="checkbox"/> Indígena + Branco (IB)	(3) Amarela
<input type="checkbox"/> Mulato-claro (MC)	(4) Parda
<input type="checkbox"/> Mulato-médio (MM)	(5) Indígena
<input type="checkbox"/> Mulato-escuro (ME)	
<input type="checkbox"/> Oriental (O)	
<input type="checkbox"/> Oriental + Branco (OB)	
<input type="checkbox"/> Outro (descrever ao lado)	

DETALHES FAMILIARES DO INDIVÍDUO:

NOME COMPLETO DO PAI: _____

MUNICÍPIO DE NASCIMENTO DO PAI: _____ TELEFONE: _____

NOME DA MÃE (nome de solteira): _____

MUNICÍPIO DE NASCIMENTO DA MÃE: _____ TELEFONE: _____

TAMANHO DA IRMANDADE (incluindo você) : ☺ TOTAL: _____ ☺ VIVOS: _____

PARA USO DO AVERIGUADOR:

ORIGEM ÉTNICA DO PAI: _____

ORIGEM ÉTNICA DA MÃE: _____

SOFRE DE ALGUMA DOENÇA? TEM IGUAL NA FAMÍLIA? (pais, irmãos, filhos): _____

ANCESTRALIDADE (descrever): _____

Lab	Segundo IBGE	
<input type="checkbox"/> Africano (N)		_____
<input type="checkbox"/> Branco brasileiro (Bbr)	(1) Branca	_____
<input type="checkbox"/> Europeu (B)	(2) Preta	_____
<input type="checkbox"/> Indígena (I)	(3) Amarela	_____
<input type="checkbox"/> Indígena + Branco (IB)	(4) Parda	_____
<input type="checkbox"/> Mulato-claro (MC)	(5) Indígena	_____
<input type="checkbox"/> Mulato-médio (MM)		_____
<input type="checkbox"/> Mulato-escuro (ME)		_____
<input type="checkbox"/> Oriental (O)		_____
<input type="checkbox"/> Oriental + Branco (OB)		_____
<input type="checkbox"/> Outro (descrever ao lado)		_____

AVERIGUADOR: _____ DATA: ____/____/____

Grupo étnico: **B:** branco com traços europeus apenas; **B br:** s / traços africanos ou indígenas claros, porém não apenas europeu; **I:** índio / indígena / ameríndio; **IB:** mestiço de índios mais branco/europeu; **MC, MM, ME:** mulato claro/ médio/ escuro (levar em conta a presença de traços europeus e também africanos); **N:** africano; **O:** oriental; **OB:** mestiço de oriental mais branco brasileiro ou europeu; se **OUTRA**, descrever.

Grau de instrução: **Ensino Fundamental** (antigo 1º grau): incompleto/ completo; **Ensino Médio** (antigo 2º grau): incompleto/completo; **Ensino Superior/Graduação:** incompleto/completo; **Pós Graduação**