

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL ADELMAN CIPOLLA

DIVERSIDADE DE GENES *KIR* EM POPULAÇÕES DE DIFERENTES  
ANCESTRALIDADES E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE *KIR3DS1*  
COM A DOENÇA AUTO-IMUNE PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

CURITIBA

2008

GABRIEL ADELMAN CIPOLLA

DIVERSIDADE DE GENES *KIR* EM POPULAÇÕES DE DIFERENTES  
ANCESTRALIDADES E POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE *KIR3DS1*  
COM A DOENÇA AUTO-IMUNE PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Genética (BG016) como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler.

CURITIBA

2008

Aos meus pais, Miriam e Paulo, e a  
minha madrasta e amiga, Lu.  
Aos meus irmãos, Julia e Lucas.  
E a toda minha família, onde estiver.

Muito obrigado por tudo.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, que mesmo com suas poucas palavras sabe orientar de forma impecável. Obrigado pela confiança e oportunidade!

Ao meu pai Paulo, a minha segunda mãe Lu, a minha irmã Julia, ao meu irmão Lucas e, sobretudo, a minha mãe Miriam, que nunca mediu esforços para ver seus dois filhos felizes. Vocês são parte da minha vida...

A toda a minha família, que mesmo estando longe sempre esteve presente.

Ao meu amigo, colega de laboratório e especialista em KIR, Danillo. Sem ele, este trabalho não seria o mesmo. Muito obrigado pela ajuda desde o planejamento das PCR's até a revisão deste texto. A melhor forma de lhe agradecer é dizendo "Conte comigo!!!"

A todos os colegas e ex-colegas, ou melhor, amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana: Áurea, Bruno (outro especialista em KIR que muito me ajudou!), Cintia, Danielle, Danillo (mais uma vez), Karin, Layo, Liana, Márcia, Marcinha, Matias, Paloma, Rafael Domingues, Rafael Hammer, Ricardo e Tânia. Espero que estejam todos aí... Vocês fazem esses dias serem mais do que uma experiência profissional!

A todos os meus colegas e amigos de turma.

Aos meus amigos, e logo mais biólogos também, Bruno, Dani, Rê e Si! Sem qualquer um de vocês ser biólogo não teria graça. Ter passado esses anos sem vocês seria como aquele acidente nos bancos do Departamento de Botânica! Foi lá que a nossa verdadeira amizade começou... Quer maior prova que aquela?

A nossa efêmera colega Gaby, mas eterna amiga... Quase foi bióloga um dia, mas logo mais será jornalista e formada em Letras. Quanta coragem, moça!

Ao meu amigo Alê, espero que goste do curso! E do resto também!

A minha amiga Luciana. Que tipo de ser é você? Formidável sp!

E ao meu amigo Diogo pelos mais de 15 anos de amizade.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”

Jean Cocteau

## RESUMO

Os genes *KIR* (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) são responsáveis por codificar um grupo de receptores semelhantes às imunoglobulinas que interagem com moléculas HLA de classe I na superfície das células *natural killers* (NK ou assassinas naturais), uma subpopulação de linfócitos que participam principalmente da resposta imune inata, tendo a função de reconhecer e destruir células infectadas por vírus ou células tumorais. Estes genes estão contidos no *Leukocyte Receptor Complex* (LRC), na posição 19q13.4, e apresentam um nível incomum de diversidade. Estudos de genética de populações e de associação com doenças complexas têm cada vez mais envolvido os genes *KIR*. O Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE ou Fogo Selvagem) é uma doença auto-imune restrita a países da América do Sul e caracterizada por uma resposta de linfócitos T, principalmente Th2, e pela ocorrência de autoanticorpos de classe IgG, subclasse IgG4, que atuam sobre as desmogleínas tipo 1, glicoproteínas pertencentes à família das caderinas e fundamentais para a adesão celular de células de superfície. Nosso objetivo foi caracterizar três amostras populacionais (uma ameríndia Kaingang da reserva do Ivaí, uma afro-brasileira e outra de ascendência principalmente japonesa) quanto às frequências (gênica e de presença) de sete genes *KIR* e verificar se o polimorfismo de ausência e presença dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1* apresenta associação com o PFE. Utilizamos a técnica de PCR-SSOP para a genotipagem dos quatro genes moldura e de *KIR2DS3*, *KIR3DL1* e *KIR3DS1*. A amostra ameríndia de Kaingang do Ivaí diferiu estatisticamente das amostras afrodescendente e de origem predominantemente japonesa em relação aos três genes não moldura. Estas duas últimas amostras apresentaram distribuição semelhante entre si e em relação a populações de origem predominantemente européia. O gene *KIR2DS3* apresentou frequência nula apenas na amostra ameríndia, o que pode sugerir que este gene tenha desaparecido por deriva genética e efeito fundador nesta população. Os genes moldura foram detectados em todos indivíduos analisados, com exceção de um indivíduo da amostra afro-brasileira que não apresentou *KIR3DL3*. Encontramos associação negativa do gene *KIR3DS1* (OR = 0,56; IC(95%) 0,32-0,97) com o PFE, a partir da análise de uma sub-amostra de pacientes e controles de origem

predominantemente européia, levando nos a sugerir que a presença deste gene ofereça aos seus portadores menor predisposição à doença.

Palavras-chave: Polimorfismo. Genes *KIR*. Populações humanas. Pênfigo Foliáceo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DIAGRAMA DOS RECEPTORES KIR INIBIDORES E SEUS LIGANTES HLA.....	12
FIGURA 2 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES DE RECEPTORES DE CÉLULAS NK EM HUMANOS E CAMUNDONGOS.....	15
FIGURA 3 - ESTRUTURAS DOS GENES <i>KIR</i> QUANTO AO NÚMERO E A EXTENSÃO DOS ÉXONS E SUA RELAÇÃO COM OS DOMÍNIOS DOS SEUS PRODUTOS PROTÉICOS .....	17
FIGURA 4 - ESTRUTURA DOS RECEPTORES KIR .....	19
FIGURA 5 - DIAGRAMA DOS GRUPOS DE HAPLÓTIPOS (HAPLOGRUPOS) A E B22	
FIGURA 6 - HAPLÓTIPOS KIR DETERMINADOS POR ANÁLISES DE SEGREGAÇÃO.....	23
FIGURA 7 - DIAGRAMA DOS DOMÍNIOS DE RECEPTORES KIR AMPLIFICADOS POR PCR.....	17
FIGURA 8 - FOTO DE MEMBRANA COM <i>DOT BLOTS</i> DO DOMÍNIO IG D0 HIBRIDADOS COM A SONDA P70-3 (3DL1*00101) .....	24
FIGURA 9 - DENDROGRAMA REPRESENTANDO AS DISTÂNCIAS GENÉTICAS PARA OS GENES <i>KIR2DS3</i> , <i>KIR3DL1</i> E <i>KIR3DS1</i> ENTRE AS POPULAÇÕES DESTE ESTUDO E DIVERSAS POPULAÇÕES DE ORIGENS SEMELHANTES DESCRITAS NA LITERATURA.....	26

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FREQUÊNCIA DOS GENES <i>KIR</i> EM POPULAÇÕES DE DIFERENTES ORIGENS .....	10
TABELA 2 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO SEM DMSO .....	15
TABELA 3 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO COM DMSO.....	16
TABELA 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ( <i>PRIMERS</i> ) UTILIZADOS NA PCR .....	16
TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA ( <i>PROBES</i> ) UTILIZADOS NA SSOP ...	18
TABELA 6 - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA HIBRIDAÇÃO E REVELAÇÃO DAS SONDAS.....	20
TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GÊNICA E DE PRESENÇA DE SETE GENES EM AFR-BR, KIV E ORI-BR .....	25
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GÊNICA E DE PRESENÇA DOS GENES <i>KIR3DL1</i> E <i>KIR3DS1</i> EM QUATRO SUB-AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES DE PFE.....	27

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
1.1	AS CÉLULAS NK, OS RECEPTORES KIR E O SISTEMA IMUNE .....	11
1.1.1	Interação KIR–HLA .....	11
1.1.2	Associação entre <i>KIR</i> e doenças .....	13
1.1.3	A importância do genótipo <i>KIR</i> em transplantes .....	14
1.2	OS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK .....	14
1.3	A ESTRUTURA DOS GENES <i>KIR</i> .....	16
1.4	NOMENCLATURA <i>KIR</i> .....	17
1.5	DIVERSIDADE <i>KIR</i> .....	20
1.5.1	Diversidade haplotípica .....	20
1.5.2	Diversidade alélica .....	21
1.6	EXPRESSÃO CLONAL DOS GENES <i>KIR</i> .....	24
1.7	GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EVOLUÇÃO .....	24
1.8	PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO .....	10
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS .....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1	COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA .....	13
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS .....	13
3.3	AMOSTRAS DE PFE E CONTROLES .....	14
3.3.1	Caracterização das amostras de PFE e controles .....	15
3.4	GENOTIPAGEM .....	15
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
4	RESULTADOS .....	23
4.1	OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-SSOP .....	23
4.2	FREQÜÊNCIA DE GENES <i>KIR</i> EM AFR-BR, KIV E ORI-BR .....	24
4.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE DE GENES <i>KIR</i> E A DOENÇA PFE .....	27
5	DISCUSSÃO .....	28
5.1	OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-SSOP .....	28
5.2	<i>KIR2DS3</i> , <i>KIR3DL1</i> E <i>KIR3DS1</i> EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS, AFRODESCENDENTES E DE ORIGEM PREDOMINANTEMENTE JAPONESA .....	29
5.3	DENDROGRAMA DE POPULAÇÕES COM BASE NAS FREQÜÊNCIAS DOS GENES <i>KIR2DS3</i> , <i>KIR3DL1</i> E <i>KIR3DS1</i> .....	32
5.4	ASSOCIAÇÃO PROTETORA DE <i>KIR3DS1</i> NA PATOGÊNESE DO PFE .....	33
6	CONCLUSÃO .....	35
	REFERÊNCIAS .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

Os genes *KIR* (do inglês, *killer cell immunoglobulin-like receptors*) são responsáveis por codificar um grupo de receptores semelhantes às imunoglobulinas nas células NK (ou assassinas naturais, do inglês, *natural killers*). Estas células são uma subpopulação de linfócitos que participam da resposta imune inata, tendo a função de reconhecer e destruir células infectadas por vírus ou células tumorais, constituindo assim a primeira linha de defesa do corpo contra esses tipos de patologia, além de participarem também das respostas imunes adaptativas (ZINGONI *et al.*, 2004).

De forma geral, os estudos envolvendo os genes *KIR* seguem duas vertentes principais: aqueles que buscam por associações entre as variantes e doenças específicas e os que examinam a diversidade e as variações normais do complexo em populações geográficas (MIDDLETON *et al.*, 2007). Em ambas as vertentes, a maioria dos estudos são referentes à presença/ausência de genes *KIR*. É importante destacar que as duas abordagens devem ser discutidas e analisadas em conjunto, uma vez que, para compreender os reais motivos das associações e entender a razão pela qual perfis ou genótipos *KIR* conferem susceptibilidade ou proteção à determinada doença, é necessário antes entender a diversidade normal desses genes, através de estudos em diversas populações de diferentes ancestralidades. Além disso, a ocorrência de fenótipos moleculares *KIR* característicos de certas populações está no mesmo patamar de doenças que ocorrem exclusiva ou comumente em certos grupos geográficos humanos e, mais ainda, podem revelar uma forte ligação entre si.

No entanto, não é apenas nesta linha que destacamos a relevância em se adquirir mais conhecimento quanto à diversidade genética humana. O estudo de locos polimórficos, como realizado neste trabalho, pode nos munir de dados capazes de permitir compreender a história evolutiva da espécie humana, através da observação de fenômenos evolutivos inerentes às populações regionais, ou simplesmente através da descrição de gradientes geográficos para alelos, genes e/ou haplótipos.

Desde o início do novo século, os estudos envolvendo o complexo gênico *KIR* cresceram expressivamente, sob as mais diversas abordagens, principalmente aquelas

considerando estes genes no contexto das doenças autoimunes e virais. Estudos de genética de populações, como este, também se tornaram numerosos, embora ainda se saiba muito pouco sobre a incomum diversidade dessa família gênica.

## 1.1 AS CÉLULAS NK, OS RECEPTORES KIR E O SISTEMA IMUNE

As células NK, linfócitos derivados da medula óssea, utilizam receptores semelhantes às imunoglobulinas presentes em sua superfície para reconhecer células infectadas ou neoplásicas, que são em geral caracterizadas pela baixa expressão de moléculas HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigens*) (LJUNGGREN e KÄRRE, 1990). Uma vez reconhecidas, estas células são eliminadas graças à produção de citocinas e de citotoxicidade direta a partir das células NK (BANCROFT, 1993).

### 1.1.1 Interação KIR–HLA

É consenso que a ativação das células NK é desencadeada a partir de um desequilíbrio entre sinais inibidores e ativadores gerados pela interação de seus receptores e ligantes específicos. Os receptores KIR, por exemplo, reconhecem ligantes HLA de classe I, codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (ou MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*).

Quando receptores ativadores reconhecem ligantes específicos, há o desencadeamento de sinais ativadores que levam a célula NK ao ataque através da liberação de citocinas. Por outro lado, os receptores inibidores reconhecem as moléculas HLA de classe I (FIGURA 1), que são expressas na maioria das células do corpo, gerando sinais inibidores que são epistáticos aos sinais ativadores, fazendo com que a célula NK tenha sua ação citotóxica inibida. Como as células infectadas e cancerosas normalmente apresentam uma redução drástica de moléculas HLA próprias

em sua superfície (BIRON *et al.*, 1999) a ausência dessas moléculas faz com que as células NK não encontrem ligantes para os receptores inibidores. A ausência dos sinais inibidores permite que prevaleçam os sinais ativadores e a célula NK ataca essas células anormais no organismo. Esse mecanismo foi chamado de “*missing self*” (falta do próprio, em inglês) uma vez que as células NK lisam as células que não apresentam ligantes HLA próprios, sendo importantes células para o reconhecimento da normalidade no organismo.

A inibição pode também ser sobrepujada por um forte aumento de sinais ativadores, isto é, sem que haja necessariamente a queda ou ausência de sinais inibidores, como observado em alguns tumores capazes de aumentar a expressão de receptores ativadores nas células NK (BAUER *et al.*, 1999).

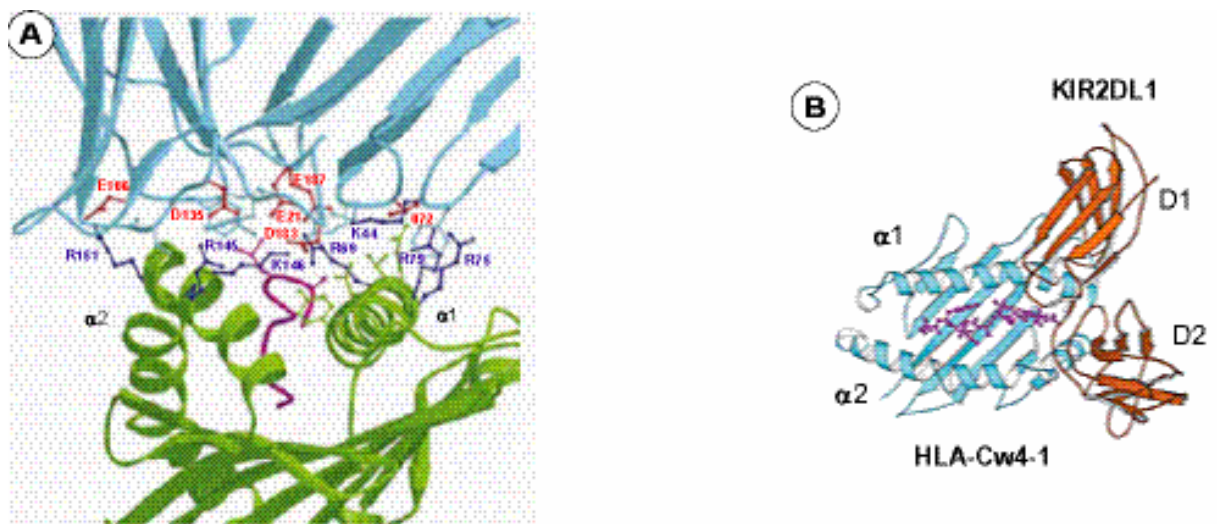


FIGURA 1 - DIAGRAMA DOS RECEPTORES KIR INIBIDORES E SEUS LIGANTES HLA. Em A, a interface entre KIR2DL2 e HLA-Cw3, evidenciando a complementaridade entre os resíduos de aminoácidos básicos (em azul) e ácidos (em vermelho). Em B, a interação dos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  da molécula HLA-Cw4 com os domínios D1 e D2 do receptor KIR2DL1.

FONTE: Fan *et al.* (2001) e Boyington *et al.* (2000).

### 1.1.2 Associação entre *KIR* e doenças

Há vários motivos pelos quais estes genes têm despertado o interesse acerca do seu potencial papel em doenças humanas. Primeiramente, a diversidade populacional destes genes pode responder pelos diferentes percursos que certas infecções virais crônicas tomam e mostrar correlação com distúrbios inflamatórios que afetam apenas subgrupos de uma determinada população. Além disso, tanto os receptores *KIR* quanto outros receptores das NK, controlam o funcionamento dessas células, que estão envolvidas no sucesso da resposta imune a infecções virais e tumores. Um terceiro ponto que pesa a favor da possível relação entre genes *KIR* e doenças é a longa lista de quadros clínicos associados ao polimorfismo dos genes *HLA* de classe I, que como sabemos, são os responsáveis por codificar ligantes dos receptores *KIR*. Somado a isso, estudos como o de Zingoni *et al.* (2004) e Gerosa *et al.* (2002) sugerem que as NK participam da resposta imune adaptativa por meio de interações com células dendríticas e células T, salientando a participação dos receptores *KIR* em quadros inflamatórios.

Nesses estudos mostrou-se que indivíduos apresentando *KIR3DS1* e um subconjunto de alelos *HLA-B Bw4* têm progressão mais lenta para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), em comparação com indivíduos sem esta combinação ativadora *KIR-HLA* (MARTIN *et al.*, 2002). Outra infecção viral estudada foi a do Vírus da Hepatite C (HCV), tendo sido encontrado, além de um efeito protetor da combinação *KIR3DS1* e *HLA-B Bw4*, uma frequência elevada de *KIR2DL3-HLA-C<sup>Asn80</sup>* em indivíduos que eliminaram a infecção em comparação com aqueles que permaneceram cronicamente infectados (KHAKOO *et al.*, 2004).

Quando o enfoque é dado para as doenças autoimunes, acredita-se que o componente genético em geral responsável pelo aumento da susceptibilidade seja um excesso da combinação ativadora *KIR-HLA* de classe I nos indivíduos afetados em comparação com o grupo controle. Pelo menos duas doenças autoimunes têm sido bastante estudadas neste contexto, psoríase e artrite reumatóide. Uma elevada

freqüência do gene ativador *KIR2DS1* numa amostra de indivíduos com psoríase vulgar foi registrada por Suzuki *et al.* (2004). Quanto à artrite reumatóide, não parece haver associação específica entre *KIR* e susceptibilidade à doença, a não ser entre *KIR2DS2* e vasculite reumatóide, constatada a partir de um subgrupo de pacientes com artrite (YEN *et al.*, 2001).

Estudos de associação entre *KIR* e tumores apontam para relações de susceptibilidade ou proteção quando se trata, em geral, de um tumor originado em conseqüência a uma infecção viral (KHAKOO e CARRINGTON, 2006).

### 1.1.3 A importância do genótipo *KIR* em transplantes

Além de poderem estar relacionadas ao desenvolvimento de tumores e doenças complexas e virais, as células NK também têm participação na doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD) em transplantes de medula óssea e regulação da hematopoiese, trazendo à tona a importância em se parear doadores e receptores não só em função do genótipo HLA, mas também levando em consideração o perfil de receptores das células NK, principalmente o perfil *KIR*, já que este exibe grande diversidade (FLODSTRÖM *et al.*, 2002; PARHAM e MCQUEEN, 2003).

## 1.2 OS RECEPTORES DAS CÉLULAS NK

Os receptores das células NK são codificados por genes presentes em dois cromossomos distintos (FIGURA 2): no braço curto do cromossomo 12, há o *Natural Killer Complex* (NKC), que compreende genes de receptores semelhantes à lectina tipo C, como o *CD94* e o *NKG2*; ao passo que o braço longo do cromossomo 19 contém o *Leukocyte Receptor Complex* (LRC), que compreende, na posição 19q13.4, a

superfamília de genes das moléculas semelhantes à imunoglobulina, incluindo os genes *KIR*.

Os genes *KIR* foram descritos após a descoberta de genes que codificam para receptores Ly49 em camundongos, que apresentam função análoga aos receptores KIR humanos. Além da semelhança funcional, o compartilhamento de outras características entre estas famílias gênicas e a existência de um pseudogene *Ly49* no cromossomo 12 humano corroboram a hipótese de que o ser humano evoluiu a partir um ancestral contendo genes *Ly49* (HSU *et al.*, 2002). No entanto, apesar da função semelhante entre Ly49 e KIR, eles são receptores completamente diferentes em estrutura.

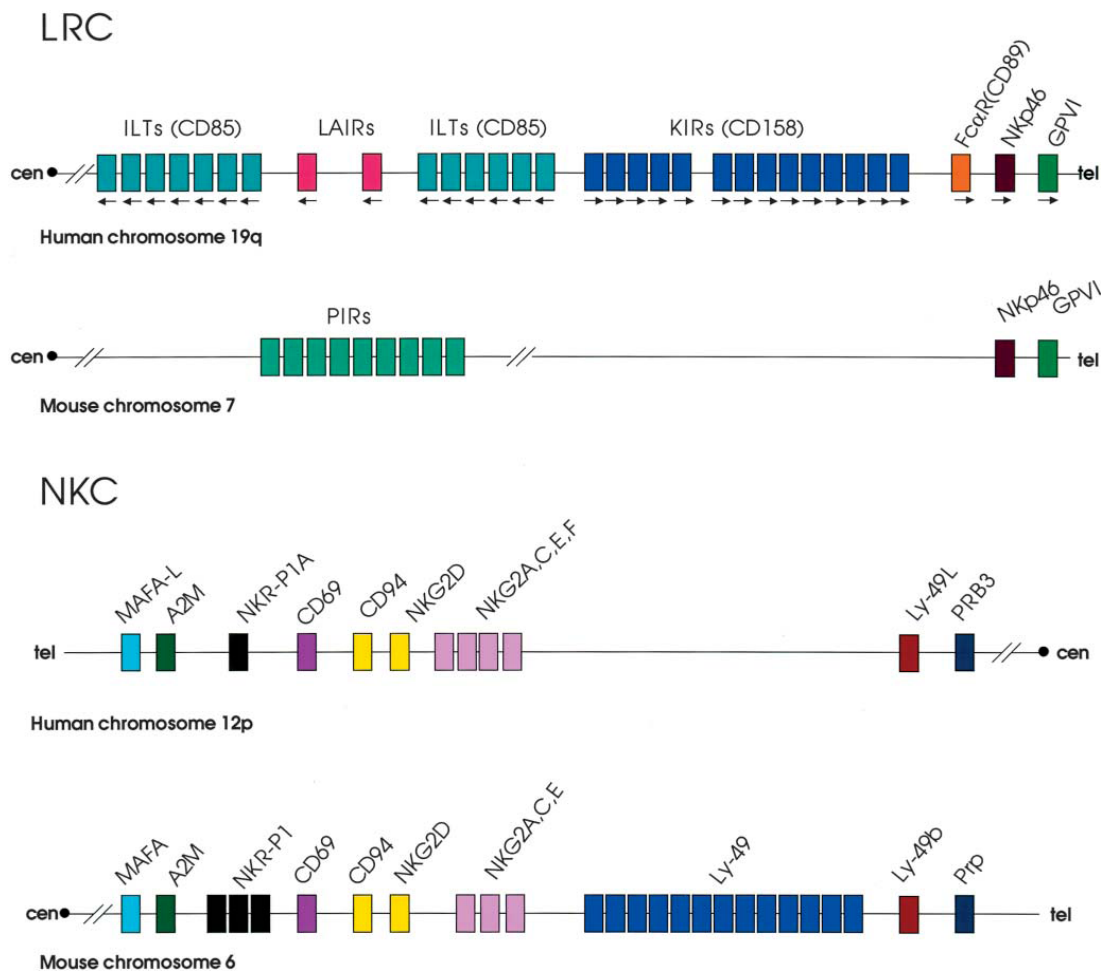


FIGURA 2 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES DE RECEPTORES DE CÉLULAS NK EM HUMANOS E CAMUNDONGOS. Na porção superior da figura, observa-se o complexo gênico LRC e, na porção inferior, o complexo NKC, ambos presentes em humanos e camundongos.

FONTE: Hsu *et al.* (2002).

### 1.3 A ESTRUTURA DOS GENES *KIR*

Inicialmente foram descritos 14 genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DS1*) e 2 pseudogenes (*KIR2DP1* e *KIR3DP1*) *KIR*, mas estes números variam entre os autores em função do incomum polimorfismo encontrado nessa família. Todos os genes *KIR* de um indivíduo estão localizados numa região de 100 a 200 mil bases (kb) (TROWSDALE, 2001), sendo a distância entre dois genes adjacentes em média de 2,4kb. A única exceção para este intervalo de 2,4kb está entre o gene *KIR2DL4* e o pseudogene *KIR3DP1*, que estão separados por aproximadamente 14kb (HSU *et al.*, 2002).

A seqüência genômica completa dos genes *KIR* varia de 4 a 16kb, apresentando de 4 a 9 éxons (FIGURA 3) (VILCHES e PARHAM, 2002).

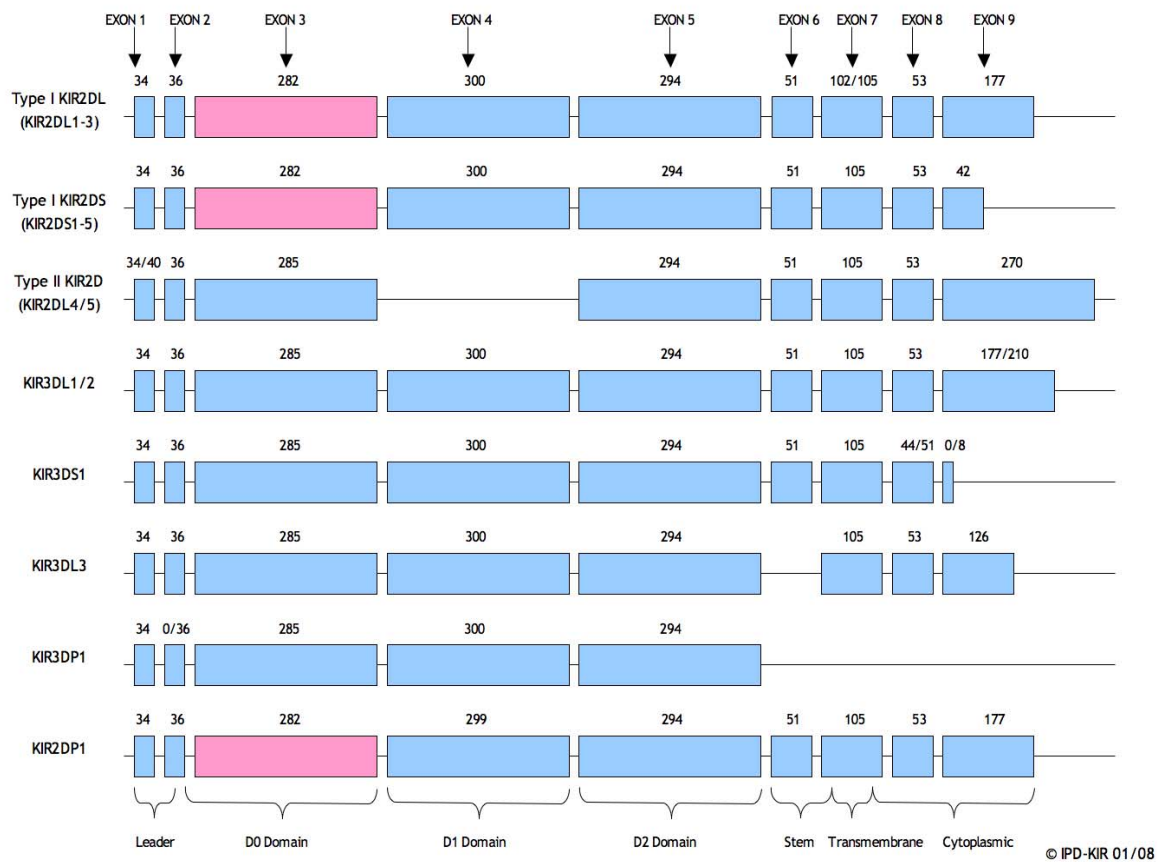


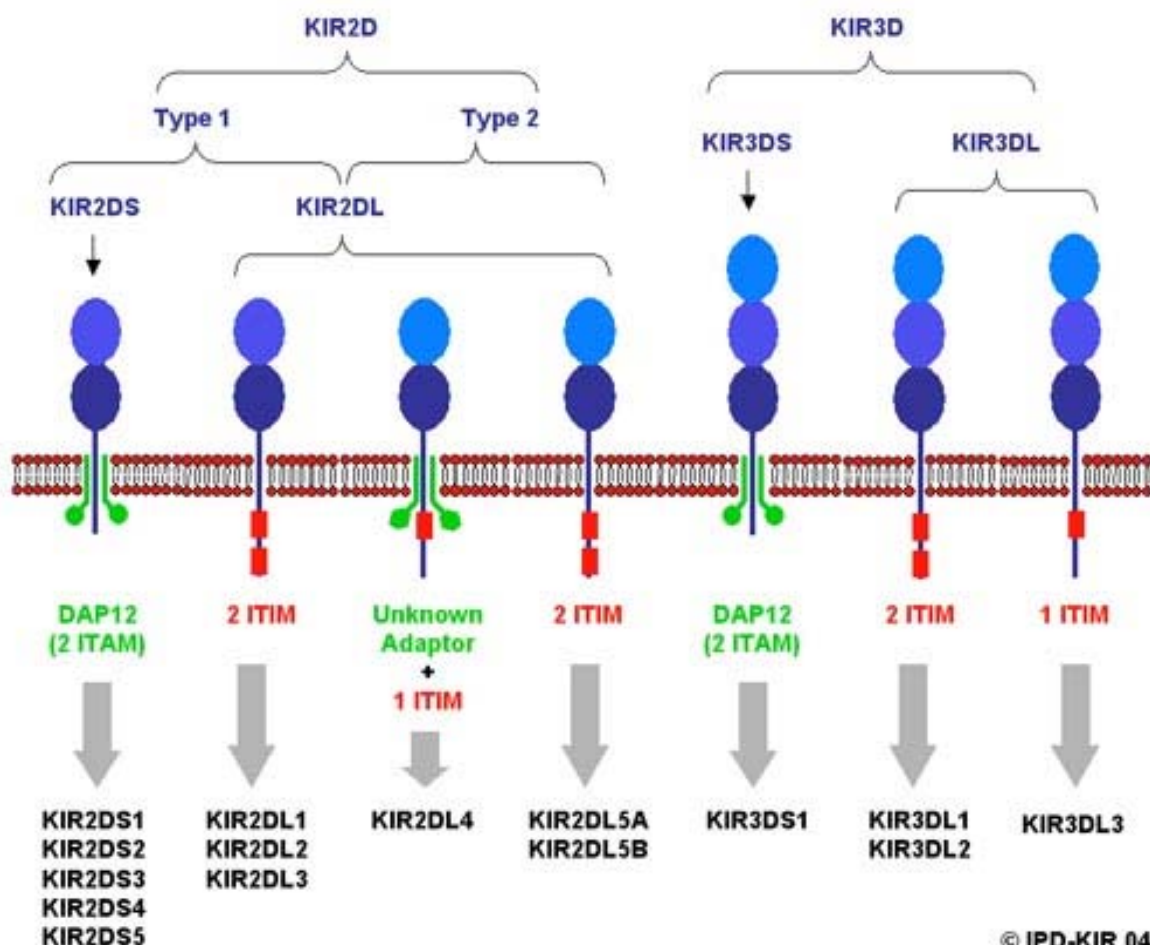
FIGURA 3 - ESTRUTURAS DOS GENES *KIR* QUANTO AO NÚMERO E A EXTENSÃO DOS ÉXONS E SUA RELAÇÃO COM OS DOMÍNIOS DOS SEUS PRODUTOS PROTÉICOS. Nota-se que o éxon 2 de *KIR3DP1* pode estar ausente.

FONTE: IPD. Disponível em <[http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure\\_02.jpg](http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure_02.jpg)>. Acesso em 08/08/2008.

#### 1.4 NOMENCLATURA *KIR*

Os genes *KIR* são classificados, como sugerido por Long *et al.* (1996), com base nas características estruturais e funcionais dos receptores que codificam. Se o receptor apresenta dois domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, foi utilizado o prefixo KIR2D, ao passo que se o receptor possui três domínios extracelulares, o nome do gene inicia com KIR3D. Além disso, o receptor pode ter uma cauda citoplasmática

curta ou longa, sendo então acrescentado o sufixo S (do inglês, *short*) ou L (do inglês, *long*), respectivamente (FIGURA 4). Os números de 1 a 5 após o sufixo L ou S foram colocados à medida que os genes foram sendo descobertos. As caudas citoplasmáticas longas em geral possuem dois motivos inibidores baseados em tirosina (ou ITIM, do inglês *Immune Tyrosine-based Inhibitory Motifs*), responsáveis pela transdução do sinal inibidor para a célula NK. Em contrapartida, as caudas citoplasmáticas curtas apresentam, associado à região transmembrânica, um resíduo de aminoácido carregado positivamente e que as permite interagir com moléculas sinalizadoras DAP12, capazes de gerar um sinal ativador (VILCHES e PARHAM, 2002). No entanto, o receptor KIR2DL4 é conhecido como o único apresentando função inibidora e ativadora, visto que apresenta tanto a um ITIM, quanto a um DAP12 (MAXWELL *et al.*, 2002).



© IPD-KIR 04/06

FIGURA 4 - ESTRUTURA DOS RECEPTORES KIR. O grupo de genes *KIR2D* se divide ainda em tipos I e II. O tipo I apresenta um pseudoexon e codifica domínios extracelulares com conformação D1 e D2, enquanto que *KIR2D* do tipo II codifica domínios extracelulares com conformação D0 e D2. Os genes *KIR3D* dão origem a proteínas com os três tipos de domínios: D0, D1 e D2.

FONTE: IPD. Disponível em <[http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure\\_06.jpg](http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure_06.jpg)>. Acesso em 08/08/2008.

*KIR3DP1*, também encontrado na literatura como *KIRX*, é um pseudogene e representa o nível máximo de variação estrutural dentre os genes *KIR3D*: não possui os éxons de 6 a 9 e, eventualmente, o éxon 2. As demais regiões do gene mostram alta similaridade com *KIR3DL3* em nível de seqüência (VILCHES *et al.*, 2000). Outro pseudogene, *KIR2DP1*, chamado antigamente de *KIRZ*, apresenta, em adição ao pseudoexon 3, um éxon 4 mais curto, causado pela deleção de uma única base (VILCHES, PANDO e PARHAM, 2000).

## 1.5 DIVERSIDADE *KIR*

Diferentemente do gene precursor das imunoglobulinas, a família de genes *KIR* não sofre grandes expansões ou contrações de segmentos gênicos, como o embaralhamento de éxons. Portanto, torna-se essencial compreender por quais mecanismos esta família passou a apresentar grande polimorfismo genético, comparável até mesmo ao apresentado pelo MHC.

A diversidade *KIR* resulta não somente da existência de alelos para os diferentes genes, mas também da ocorrência de haplótipos que carregam diferentes genes em diferentes números e da combinação dos haplótipos materno e paterno. Ou seja, há três níveis de diversidade: alélica; haplotípica e de presença ou ausência de genes *KIR*. Portanto, dois indivíduos dificilmente apresentam o mesmo perfil *KIR*, assim como é praticamente impossível a existência de indivíduos com o mesmo genótipo MHC, excluindo-se, é claro, a existência de irmãos monozigóticos.

Além disso, estes genes sofrem intensa recombinação e duplicação ao longo do cromossomo, o que pode resultar na existência de genes duplicados em um haplótipo.

### 1.5.1 Diversidade haplotípica

Os haplótipos *KIR* foram determinados com base em estudos de segregação em famílias e então classificados em dois haplogrupos distintos (A e B) de acordo com o conteúdo gênico (FIGURA 5). Todos os haplótipos *KIR* descritos (FIGURA 6) estão flanqueados na região centromérica por *KIR3DL3*, na região telomérica por *KIR3DL2* e na região central por *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Estes genes *KIR* são conhecidos como genes moldura e estão presentes em praticamente todos os indivíduos analisados. O haplogrupo A apresenta haplótipos com um único gene ativador de cauda curta (*KIR2DS4*), o gene ativador/inibidor *KIR2DL4* e mais cinco genes *KIR* inibidores de cauda longa (*KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*), além do pseudogene

*KIR3DP1* (MARSH *et al.*, 2003). Dessa forma, o haplogrupo A não varia em relação ao conteúdo gênico, sendo sua diversidade ditada pela diversidade alélica. Por outro lado, o haplogrupo B é caracterizado por haplótipos com diferentes combinações dos seguintes genes *KIR*: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*. Dessa forma, todas as combinações existentes excetuando-se a formada pelos genes do haplogrupo A, são classificadas como pertencentes ao haplogrupo B, que pode apresentar de dois a sete genes *KIR* ativadores (incluindo *KIR2DL4*) e número semelhante de inibidores em comparação ao A.

Contudo, a descrição de um alelo nulo de *KIR2DS4* apresentando frequência de 80% em uma população irlandesa (MAXWELL *et al.*, 2002) e a existência de um grande número de alelos não funcionais para *KIR2DL4* causados por deleções que alteram o quadro de leitura (YAWATA *et al.*, 2006), fez concluir que, como o haplótipo A carrega apenas dois genes capazes de exercer função ativadora (*KIR2DS4* e *KIR2DL4*), indivíduos homocigotos para este haplótipo não apresentam nenhum gene *KIR* ativador (HSU *et al.*, 2002).

Baseado nisso e no fato de que o haplótipo A ocorre com alta frequência em muitas populações, levando à inexistência de genes *KIR* ativadores em milhões de indivíduos, Parham (2005) sugeriu que os genes *KIR* inibidores são mais essenciais que os ativadores. Khakoo e Carrington (2006) sugeriram que, somado a existência do alelo não funcional para *KIR2DL4*, a expressão restrita (e não constitutiva) desse gene ao compartimento endossomal é mais um fator que pode levar à ocorrência de haplótipos A, e conseqüentemente de indivíduos AA, sem genes ativadores.

### 1.5.2 Diversidade alélica

O polimorfismo alélico, gerado por mutação pontual e recombinação homóloga e que diferencia haplótipos *KIR* (principalmente os do haplogrupo A) contendo os mesmos genes, tem sido atribuído a todos os locos *KIR*. Tamanha é essa diversidade que, através da genotipagem de alta resolução de apenas quatro genes *KIR* em um

grupo de pessoas não relacionadas, encontrou-se um índice de 0,24% de identidade entre os indivíduos da amostra. Este valor foi claramente superestimado tendo em vista que poucos genes foram genotipados ao nível alélico e que alguns alelos não puderam ser distinguidos (SHILLING *et al.*, 2002).

Com esses dados observa-se que a diversidade do complexo gênico KIR assegura genótipos diferentes para a maioria dos indivíduos de uma população, assim como ocorre para o MHC humano. Além disso, novos alelos são constantemente descritos, havendo muito ainda a ser explorado neste aspecto.

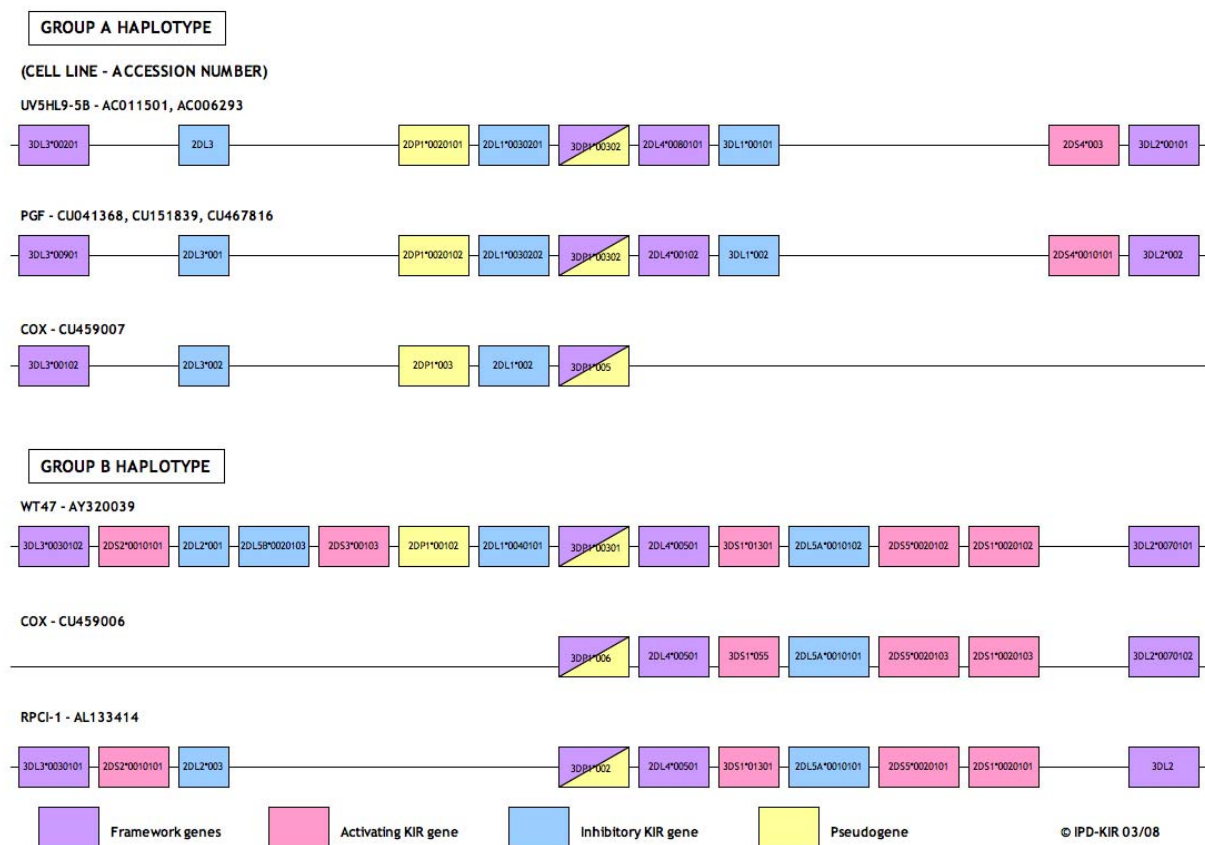


FIGURA 5 - DIAGRAMA DOS GRUPOS DE HAPLÓTIPOS (HAPLOGRUPOS) A E B. Todos os haplótipos KIR descritos estão flanqueados na região centromérica por *KIR3DL3* (primeiro gene da esquerda para a direita), na região telomérica por *KIR3DL2* (último gene da esquerda para a direita) e na região central por *KIR3DP1* (retângulo cortado diagonalmente) e *KIR2DL4* (primeiro gene à direita de *KIR3DP1*). Estes genes *KIR* são conhecidos como genes moldura (*framework genes*).

FONTE: IPD. Disponível em <[http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure\\_03.jpg](http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images/figure_03.jpg)>. Acesso em 08/08/2008.

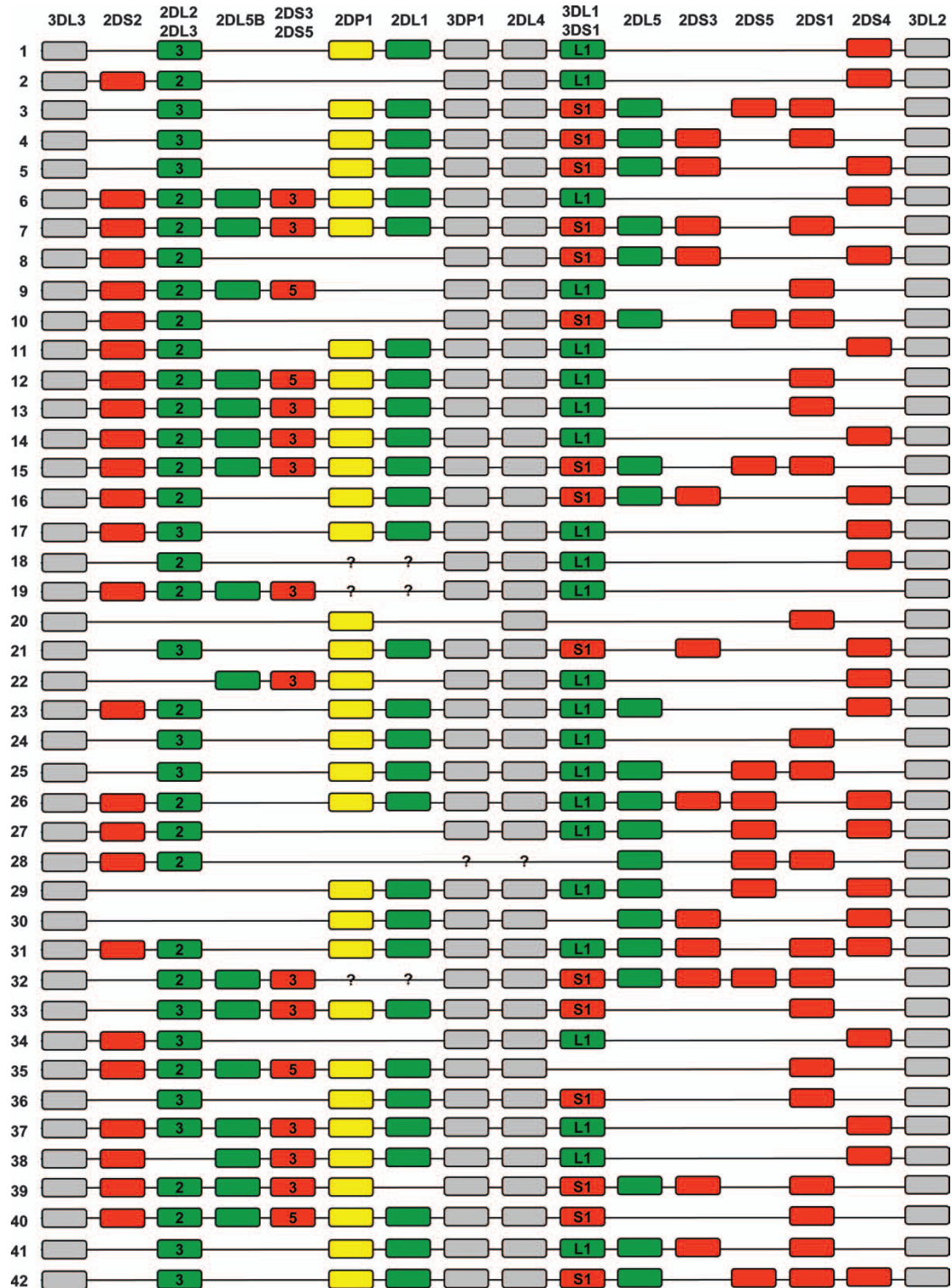


FIGURA 6 - HAPLÓTIPOS KIR DETERMINADOS POR ANÁLISES DE SEGREGAÇÃO. Esquema de todos os haplótipos já descritos em populações. O haplótipo 1 pertence ao haplogrupo A, ao passo que todos os demais ao haplogrupo B. Genes moldura estão representados em cinza, genes que codificam para receptores ativadores estão em vermelho e para receptores inibidores em verde. Em amarelo está representado o pseudogene *KIR2DP1*, como é também o gene moldura *KIR3DP1*.

FONTE: Khakoo e Carrington (2006).

## 1.6 EXPRESSÃO CLONAL DOS GENES *KIR*

Além da elevada diversidade genética deste complexo, a expressão clonal destes genes resulta em diferentes repertórios de receptores KIR na superfície das células NK. Cada uma dessas células adquire, ao longo do seu desenvolvimento na medula óssea, um conjunto de receptores KIR que pode variar de um a todos os genes funcionais existentes num genótipo, nas mais variadas combinações, e até mesmo de genes que não conferem ligantes às moléculas HLA de classe I. Este fenótipo adquirido permanece estável na célula NK durante toda sua vida (UHRBERG, 2005).

Contudo, os fatores que controlam a expressão dos genes *KIR*, para assim gerar diferentes repertórios nas células NK, ainda não são bem compreendidos. Acredita-se que o mecanismo de aquisição de tolerância ao próprio seja um deles, a partir do momento que os receptores das células NK se ligam, durante sua formação, a moléculas HLA de classe I para não responderem futuramente contra células próprias saudáveis. No entanto, já que para que isso ocorra é necessária pelo menos uma molécula KIR inibidora e, tendo em vista que há subconjuntos de células NK que não apresentam nenhuma, passou a se procurar por outro mecanismo que explicasse a expressão dos genes *KIR*. A metilação dos sítios promotores em ilhas CpG tem sido o principal mecanismo epigenético encontrado para explicar a transcrição diferenciada de genes *KIR* em subconjuntos de células NK (GARDINER, 2007).

## 1.7 GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EVOLUÇÃO

A família *KIR* apresenta uma peculiaridade evolutiva compartilhada por outros grupos de genes do sistema imune, a recombinação ou permuta desigual. Por meio deste mecanismo, ocorre duplicação ou perda de segmentos de DNA que podem conter genes, o que parece explicar, em parte, os eventos de expansão e contração aos quais os haplótipos KIR estão sujeitos (MARTIN *et al.*, 2003). Ao passo que este fenômeno biológico busca explicar a diversidade haplotípica, podemos dizer, de forma

simplista, que a diversidade alélica é guiada basicamente pela ocorrência de mutação seguida de seleção natural, deriva genética e fluxo gênico, sendo que estes últimos atuam também sobre os haplótipos. Portanto, a partir de estudos de genética de populações podem ser evidenciados estes fenômenos.

A análise em nível populacional do complexo gênico KIR tem servido de base para iniciar outras abordagens referentes a estes genes. Sendo assim, dezenas de estudos de genética de populações envolvendo os genes *KIR* já foram publicados desde a sua descoberta e têm gerado uma vasta quantidade de dados, freqüentemente agrupados em trabalhos de revisão e em seguida utilizados para comparar diversos grupos geográficos que muitas vezes têm origens bem distintas. Como este trabalho está inserido no contexto citado, reservamos esta seção para fazer um levantamento do que há de mais recente e do que já existe há algum tempo, em escala global, dos genes *KIR* em populações.

Para o levantamento de dados de freqüências gênica e de presença dos genes *KIR*, esta última também referida como freqüência fenotípica ou de portadores, em diversas populações (TABELA 1), principalmente aquelas com origens predominantemente asiáticas, africanas ou ameríndias, fez-se uma consulta ao site “[www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)” (MIDDLETON *et al.*, 2003) e ainda a vários trabalhos de genética de populações.

É possível notar algumas peculiaridades referentes às freqüências de certos genes em certas populações. Por exemplo, *KIR2DS3* possui freqüência muito baixa ou nula em ameríndios, o que pode ser conseqüência da ação da deriva genética nessas populações de tamanho efetivo reduzido (GENDZEKHADZE *et al.*, 2006), além de seleção natural e outros fatores estocásticos. Observa-se também uma freqüência reduzida de *KIR2DL2*, *KIR2DL5* e *KIR2DS2* em chineses e japoneses e de *KIR2DS1* e *KIR3DS1* em populações afrodescendentes.



## 1.8 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

O pênfigo é considerado um grupo de doenças autoimunes que se manifestam na pele e mucosas através da formação de bolhas intra-epiteliais, resultantes da perda de adesão normal entre as células deste tecido, num processo conhecido como acantólise (DIAZ *et al.*, 1989). Uma das classificações traz o pênfigo sob duas formas, Pênfigo Foliáceo (PF) e Pênfigo Vulgar (PV), sendo que em ambas o alvo dos autoanticorpos são glicoproteínas denominadas desmogleínas (Dsgs), pertencentes à família das caderinas e fundamentais para a adesão celular de células de superfície. O que diferencia as duas formas de pênfigo é que no PF a Dsg1, restrita à camada subcórnea do tecido epitelial, representa o alvo da ação de autoanticorpos, enquanto que no PV este alvo é a Dsg3, disseminada na camada suprabasal e nas mucosas (ANHALT, 1990).

Ainda segundo Diaz *et al.* (1989), do ponto de vista epidemiológico, o pênfigo pode ser esporádico, ocorrendo em diversas regiões do globo, ou endêmico (PFE), estando neste caso restrito a países da América do Sul, onde é também conhecido como Fogo Selvagem. No Brasil, país onde mais se registram casos, o pênfigo acomete principalmente indivíduos habitantes dos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e São Paulo.

No caso do PFE, foi sugerido, devido à distribuição coincidente desta doença com a abrangência geográfica do simulídeo *Simulium nigrimanum* (borrachudo, mosca negra), que este inseto esteja desencadeando a resposta autoimune (LOMBARDI *et al.*, 1992). Acredita-se que um ou mais antígenos salivares do simulídeo contenham moléculas capazes de desencadear uma reação cruzada com a Dsg1, levando a uma resposta autoimune contra epítomos do quinto domínio extracelular (EC5) desta glicoproteína (LI *et al.*, 2003).

Do ponto de vista imunológico, o PF é gerado através de uma resposta de linfócitos T, principalmente do tipo Th2, e pela ocorrência dos autoanticorpos da classe IgG, subclasse IgG4, que atuam sobre a Dsg1.

Uma vez que as doenças autoimunes são causadas por desequilíbrios da resposta imune, que por sua vez é controlada por genes do sistema imune, estes últimos se tornam candidatos a estarem associados ao desenvolvimento destas doenças complexas. No caso do PFE, vários estudos de associação foram feitos desde 1989, quando foi publicado o trabalho pioneiro de Petzl-Erler e Santamaria que buscou verificar relação de susceptibilidade ou proteção entre os genes *HLA* e a doença. Entretanto, não se conhece nenhum estudo em que os genes *KIR* estejam sendo investigados neste aspecto, apesar destes já terem se mostrado associados a outras doenças autoimunes.

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O presente estudo tem por objetivo geral caracterizar três amostras populacionais (uma ameríndia, uma afro-brasileira e outra de ascendência japonesa) quanto às frequências (gênica e de presença) de sete genes *KIR* e verificar se o polimorfismo de ausência e presença dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1* apresenta associação com a doença auto-imune Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE).

Como objetivos específicos, temos:

- implementar a técnica de PCR-SSOP para a detecção de genes *KIR*;
- utilizar os dados obtidos para comparação com outros estudos populacionais;
- determinar as distâncias genéticas entre as amostras deste estudo e destas com outras presentes na literatura;
- verificar se as frequências de ausência e presença dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1* diferem entre o grupo de pacientes de PFE e controles, através de um estudo de associação.

Apesar do crescente estudo envolvendo os genes *KIR*, populações como as afrodescendentes ainda não foram bem caracterizadas para este complexo gênico, o que mostra a importância de trabalhos como este. O estudo de populações ameríndias pode fornecer dados que futuramente venham a auxiliar na compreensão da colonização das Américas, além de nos permitir observar quais fatores evolutivos governam estes grupos. Conhecendo a diversidade genética de populações de origem oriental podemos sugerir o grau de miscigenação destas com a população brasileira.

Outro aspecto importante deste estudo é o fato de abordar genes do sistema imune. Conhecendo a variabilidade genética humana normal geramos informações que podem servir para trabalhos de associação entre doenças multifatoriais e genes *KIR*. No caso do PFE, uma doença causada por uma resposta imune adaptativa a partir da produção de autoanticorpos, pouco se sabe sobre os mecanismos que geram a auto-imunidade e a etiologia. No entanto, o fato de as variantes *KIR* terem sido relacionadas também às repostas imunes adaptativas, torna-os genes candidatos a estarem envolvidos na patogênese do PFE.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA

A obtenção de DNA dos indivíduos das amostras do nosso grupo de pesquisa ocorreu a partir de 1988 por diferentes pesquisadores através de duas técnicas distintas de extração de DNA genômico a partir de sangue periférico: o método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK *et al.*, 1989), adaptado do protocolo do XIII Workshop Internacional de Histocompatibilidade (HURLEY *et al.*, 1998), e menos freqüentemente o método do *salting-out* (LAHIRI e NURNBERG, 1991).

Todos os indivíduos participaram de forma voluntária, autorizando a coleta de uma amostra de 20mL de sangue periférico e assinando um termo de consentimento no ato da averiguação de seus dados pessoais.

A amostra de descendentes japoneses foi cedida pela Profa. Dra. Luiza Tamie Tsuneto, do Departamento de Análises Clínicas, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizada no Paraná. A amostra afro-brasileira foi cedida pelo Laboratório de Polimorfismos e Ligação, do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O projeto deste estudo foi aprovado pelo conselho de ética da UFPR e está de acordo com as leis do país.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS

As amostras populacionais analisadas têm ancestralidades distintas: a amostra oriental (ORI-BR) é de origem predominantemente japonesa, composta de 67 indivíduos habitantes do estado do Paraná; a amostra afro-brasileira (AFR-BR) é composta por uma porção de indivíduos mestiços, de ancestralidade

predominantemente africana e europeia, e por outra de indivíduos predominantemente africanos, totalizando 115 indivíduos; a amostra ameríndia (KIV) é do grupo Kaingang do Ivaí, localizada no estado do Paraná, e representada por 128 indivíduos.

A população Kaingang do Ivaí, localizada na reserva indígena do Ivaí (24°30'S, 51°40'O), é composta por cerca de 700 pessoas, na área abrangida pelo município paranaense de Manoel Ribas. Segundo dados da FUNAI e do Instituto Socioambiental, atualmente há cerca de 460 mil indígenas no Brasil, distribuídos em 225 povos diferentes, representando em torno de 0,25% da população total brasileira. No Paraná existem 10.375 indígenas representados por diferentes etnias, como a Kaingang, considerada a terceira maior do Brasil. Este grupo fala o Kaingang, língua classificada na família Jê, tronco lingüístico Macro-Jê.

### 3.3 AMOSTRAS DE PFE E CONTROLES

Entre pacientes e controles de PFE, foram analisados 441 indivíduos sem vínculo genético, residentes principalmente no estado do Mato Grosso do Sul (MS). Os indivíduos dessas amostras foram classificados de acordo com as características morfológicas faciais (formato da boca, nariz e olhos, tipo de cabelo e cor de pele), permitindo-nos estimar quais as principais contribuições genéticas (africana, ameríndia, asiática ou europeia) recebidas por cada indivíduo, o que é relevante principalmente no ato da comparação das amostras.

Para as análises estatísticas, subdividimos cada amostra em diferentes grupos de acordo com a ancestralidade predominante a fim de parear as sub-amostras também quanto as suas origens. Obtivemos assim 4 sub-amostras: uma de origem predominantemente europeia (EUR-BR = 232); outra de origem predominantemente europeia e ameríndia (EUR-BR+AMERIN = 40); uma de ascendência predominantemente europeia e africana (AFRO-BR 1 = 170) e, por fim, uma de origem predominantemente africana (AFRO-BR 2 = 83), obtida a partir da anterior.

### 3.3.1 Caracterização das amostras de PFE e controles

A amostra de pacientes de PFE é composta de 236 indivíduos, sendo a coleta de sangue realizada, em sua maior parte, no Hospital Adventista do Pênfigo (HAP), em Campo Grande-MS, a partir de 1997. Apenas 20 amostras foram coletadas no Hospital de Dermatologia Sanitária, em Piraquara-PR, no ano de 1988. Todos os pacientes foram previamente diagnosticados, através de análises clínicas, histológicas e imunoquímicas, como apresentando PFE.

Já a amostra de controles está representada por 205 indivíduos, a maioria dos quais tiveram o sangue coletado no próprio HAP, a partir de 1997. Neste mesmo ano, algumas amostras foram obtidas na Santa Casa de Misericórdia de Curitiba-PR.

### 3.4 GENOTIPAGEM

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR (reação em cadeia da polimerase, do inglês, *polymerase chain reaction*) e depois genotipadas para o complexo gênico KIR por um método em que se utilizam oligonucleotídeos-sonda de seqüência específica (SSOP, do inglês, *sequence specific oligonucleotide probe*). Os protocolos de PCR, adaptados de Maxwell *et al.* (2004), seguem nas Tabelas 2 e 3:

TABELA 2 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO SEM DMSO

REAGENTES	VOLUME/QUANTIDADE
Tampão sulfato	1µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,4µL
dNTP 2mM	0,25µL
Primers 3' e 5' 20µM	0,1µL
Taq DNA polymerase (Platinum)	0,06µL
DNA	~20ng
Água	7,09µL
Volume final	10µL

FONTE: O autor (2008).

TABELA 3 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO COM DMSO

REAGENTES	VOLUME/QUANTIDADE
Tampão sulfato	1µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,4µL
dNTP 2mM	0,5µL
DMSO 100%	0,5µL
Primers 3' e 5' 20µM	0,1µL
Taq DNA polymerase (Platinum)	0,12µL
DNA	~20ng
Água	6,08µL
Volume final	10µL

FONTE: O autor (2008).

As condições de amplificação no aparelho termociclador Mastercycler®ep (ependorf) foram: desnaturação inicial a 96° C por 240s; 40 (ou 45) ciclos de 96°C por 60s, 60°C por 45s e 72°C por 30s (ou 60s); e por fim, extensão final a 72°C por 300s.

Para a amplificação específica de genes *KIR*, foram empregadas quatro combinações de oligonucleotídeos iniciadores (TABELA 4), utilizados por Maxwell *et al.* (2004). Cada combinação amplifica uma região do gene, sendo estas regiões correspondentes ao domínio 0, 1 ou 2 (Ig D0, D1 ou D2) ou ao domínio transmembrânico/citoplasmático das moléculas KIR (FIGURA 7).

TABELA 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS NA PCR

Alvo	Nome óligo	Seqüência do oligonucleotídeo iniciador (5' - 3')	Tamanho
Domínio transmembrânico/citoplasmático	TMF1	GCTGTGATTAGGTAAGTCTCAGTGGCC	~930pb
	TMF2	GTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTC	
	TMF3	ATTCTGATTGGGACCTCAGTGGCT	
	DmcytR	TTGAGACAGGGCT(GA)TTGTCTCC	
Domínio Ig D2	D2F	TTCCAGGTC(TC)ATXTG(AG)GAAACCTTC	~302pb
	D2R	ACCTGTGAC(AG)GAAACAAGCAGTGG	
	D2R2	ACCTGTGACAGAAAC(GA)(GA)GCAGTGG	
Domínio Ig D1	D1F	AGAGAXXGTCATCCTGCA(AG)TGTTGGTC	~241pb
	D1R	GATCACXATGTCCAG(AG)GG(GA)TCACTGG	
Domínio Ig D0	D0F-1	GTGGTCAGGACAAXCCCTTXCT(GC)TCTGCC(CT)GGC	~265pb
	D0F-2	GTGGTCAGGACAAGCCCTTCTGCTCTGCCTGGC	
	D0RR1	GGGTTGCTGGGTGC(TC)GACCACC	
	D0RR2	GGGTTGCTGGGTGC(TC)GACCACTC	

FONTE: Maxwell *et al.* (2004).

NOTA: O "X" representa a base universal inosina e as bases entre parênteses substituem as imediatamente anteriores, produzindo *primers* de mesmo alvo, mas com seqüências diferentes.

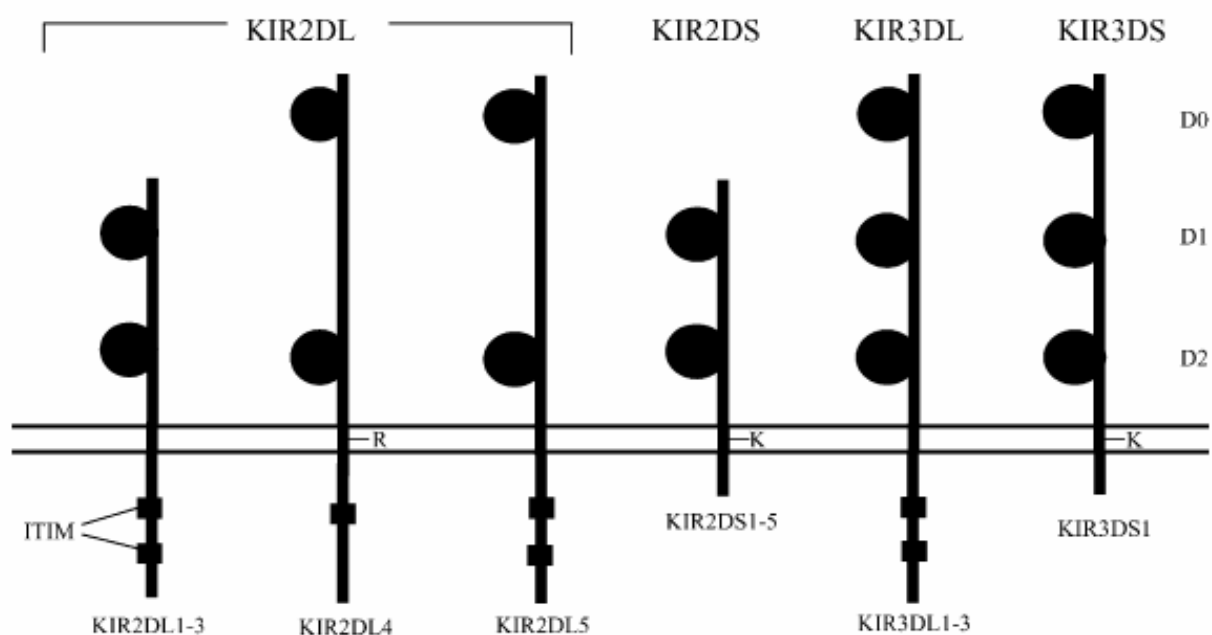


FIGURA 7 - DIAGRAMA DOS DOMÍNIOS DE RECEPTORES KIR AMPLIFICADOS POR PCR.

FONTE: Maxwell *et al.* (2004).

Alíquotas dos produtos de PCR resultantes foram submetidas, juntamente com GelRed®, à corrida eletroforética em gel de agarose 1%, a 80V, para confirmar a amplificação. O gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultra-violeta, acoplado a uma máquina fotográfica digital, conectada a um microcomputador.

Após a etapa de PCR, teve início a etapa de SSOP, que permitiu a genotipagem dos indivíduos para a presença ou ausência de genes *KIR*. A essência deste procedimento consiste na hibridação entre o DNA amplificado, desnaturado e fixado e os oligonucleotídeos-sonda de seqüência específica marcados com biotina e, após hibridação, a realização de uma revelação colorimétrica. A relação de oligonucleotídeos-sonda empregados na detecção dos genes *KIR* encontra-se na Tabela 5:

TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA (*PROBES*) UTILIZADOS NA SSOP

Nome do oligonucleotídeo-sonda para cada domínio	Seqüência do oligonucleotídeo-sonda (5' - 3')	Temperatura de lavagem de alta estringência (°C)
<b>Domínio transmembrânico citoplasmático</b>		
NK1 (2DL1)	<u>I</u> CTGCAGG <u>A</u> AACAGAAC	44
NK2DL1vR (2DL1*004)	GGAGCACCAGC <u>A</u> ATGAAGGAGA	62
NK2 (2DL2)	<u>I</u> CGTG <u>T</u> AC <u>G</u> CGGA <u>A</u> CTT	não otimizada
NK3 (2DL3)	CTGGT <u>G</u> CT <u>G</u> CAACAAA	40
NK2DL3/1350	CTGAGCC <u>C</u> T <u>G</u> ATCCAAA	não otimizada
NK10 (2DL4)	GCCTG <u>C</u> GG <u>A</u> CACAGAAC	62
NK2DL5	CAT <u>T</u> GCT <u>G</u> CTGCTCCA	48
NK8 (3DS1)	GGAACAG <u>A</u> AGTGAACAG	38
NK6 (3DL1)	CAGAACAG <u>C</u> CAACAG <u>C</u> GA	40
NK7 (3DL2)	GCCTG <u>C</u> GGGG <u>G</u> ACAGAAC	52
<b>D2 - Domínio extracelular</b>		
Ig1 2DL2	CCATGAAT <u>I</u> GTAGG <u>I</u> TC	não otimizada
Ig1 2DL4	TTC <u>G</u> CTT <u>A</u> CAGCC <u>C</u> GGC	não otimizada
Ig1 2DL5	TCGGCTCT <u>C</u> TCC <u>A</u> TGAC	não otimizada
Ig1 2DS1aR (2DS1/2DL1*004)	TTGACCTTGG <u>I</u> CC <u>C</u> TGCAGG	não otimizada
Ig1 2DS1bR (2DS1/2DL1*004)	AGGTCCCTCC <u>A</u> TGGGTGGCA	não otimizada
Ig1 2DS2	CCACGGTT <u>T</u> TGGCAGGA	não otimizada
Ig8 (2DS3)	CCCA <u>A</u> GGAGG <u>A</u> ACCTAC	não otimizada
Ig1 2DS3	ATCTATCC <u>A</u> CGGAGGG	não otimizada
Ig1 2DS4	TCCGTGAC <u>G</u> CTCCCTAC	não otimizada
Ig1 2DS4del (2DS4*003)	CTGCAGCT-22bp-CCATCTAT	não otimizada
Ig1 2DS4n	CCTCTGG <u>A</u> CCCTGCC	não otimizada
<b>D1 - Domínio extracelular</b>		
Ig2 3DL2	TACAGATG <u>T</u> TATGGT <u>T</u> CT	40
Ig2 3DL3	CAC <u>G</u> ATG <u>C</u> GGG <u>T</u> TCC <u>C</u> AG	60
Ig2 3DS1	CACAAAGAG <u>T</u> GGATCTCT	46
Ig2 2DL1	CCTATCAGG <u>T</u> GT <u>C</u> AGCT	53
Ig2 2DL2	GTCTCCAA <u>A</u> GCCAACTT	46
Ig2 2DS1Agg (2DS1*001)	CCATC <u>A</u> GTC <u>G</u> CATGAGGCAAG	60
Ig2 2DS1Aga (2DS1*003)	CCATC <u>A</u> GTC <u>G</u> CATGAAGCAAG	60
Ig2 2DS2	GGGGAAGT <u>A</u> TAAGGACA	40
Ig2 2DS3	CTATCAGTT <u>T</u> TCAGCTCC	54
Ig2 2DS4	TTCTCCAT <u>T</u> GGTCCCAT	50
Ig2 2DS5a	A <u>C</u> GTTTAAC <u>C</u> ACACTTTG	46
Ig2 X (3DP1)	GAAGTTAA <u>I</u> GACACTTTG	46
Ig2 Z (2DP1)	CCATGATG <u>G</u> AAGACCTG	46
<b>D0 - Domínio extracelular</b>		
P70-3 (3DL1*00101)	GAATCCAC <u>A</u> TTCCCATC	50

TABELA 5 – CONCLUSÃO

Nome do oligonucleotídeo-sonda para cada domínio	Seqüência do oligonucleotídeo-sonda (5' - 3')	Temperatura de lavagem de alta estrigência (°C)
P70-4 (3DL1*002)	ATGGCAGATTATTCCAG	52
Ig3 3DL2	GACAGAAGCCACGTTTC	não otimizada
Ig3 3DL3	CTGAAGGACAACATGTG	não otimizada
P70-1 (3DS1)	TGCCTCGCGGAGGAC	46
Ig3 2DL4	CATCTTCACGCTGTAC	50
Ig3 2DL5	GGGTTTACCATCTTC	44
Ig3 X (3DP1)	GAAACACCGTTTTTCATAG	52
Ig3 Z (2DP1)	CAGGGACGTACAGAT	44

FONTE: Adaptado de Maxwell *et al.* (2004).

Para a genotipagem, 1,5µL dos produtos amplificados foram aplicados em membranas de náilon carregadas positivamente (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech®). Em seguida, as membranas foram imersas por 5min em solução de NaOH 0,4N, a temperatura ambiente, para desnaturação do DNA. Após, as membranas passaram por uma etapa de neutralização em solução de SSPE 3X por 10min, a temperatura ambiente, e, por fim, colocadas para secar a 37°C por aproximadamente 30min (TABELA 6). O DNA foi fixado nas membranas por calor, a 80°C durante 2 horas. Uma vez fixado e desnaturado, o DNA pôde, havendo complementariedade, se hibridar ao oligonucleotídeo-sonda através das seguintes etapas:

- hidratação das membranas em 10mL de SSPE 4X por 10min a temperatura T (em geral 37°C);
- bloqueio com 10mL de solução de hibridação com caseína por 30min a temperatura T;
- hibridação com 10mL de oligonucleotídeos-sonda específicos (20µM) por 1h30min a temperatura T;
- lavagem de baixa estrigência com 10mL de SSPE 2X, SDS 0,1 % por duas vezes durante 10min a temperatura T;
- lavagem de alta estrigência por 20min com 10mL de SSPE 5X, SDS 0,1% na temperatura específica de cada sonda (ver TABELA 5);
- lavagem com 10 mL de SSPE 3X, SDS 0,5% por 10min a temperatura T;

- incubação com 10 mL de SSPE 3X, SDS 0,5% e 3µL do conjugado HRP-SA (0,5µg/mL) durante 30min a temperatura T;
- lavagem com 10 mL de SSPE 1X, SDS 0,1% por duas vezes durante 10min a temperatura T;
- acidificação das membranas com 5mL de tampão citrato pH5,0 por 5min a temperatura T;
- reação colorimétrica com 5mL de tampão citrato pH5,0, 150µL de TMB 2mg/mL e 3µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% durante 10min no escuro, a temperatura T.

TABELA 6 - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA HIBRIDAÇÃO E REVELAÇÃO DAS SONDAS

	REAGENTE	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO FINAL
<b>SSPE 20X</b>	NaCl	175,32g	3M
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	27,6g	0,2M
	EDTA-Na <sub>2</sub>	7,4g	0,02M
	H <sub>2</sub> O	q.s.p. 1L	
	Ajustar para pH 7,4 adicionando NaOH 10N.		
<b>SSC 20X</b>	NaCl	175,3g	3M
	Citrato de sódio 2H <sub>2</sub> O	88,2g	0,3M
	H <sub>2</sub> O	q.s.p. 1L	
	Ajustar para pH 7,0 adicionando HCl 1M.		
<b>Solução de hibridação com caseína</b>	SSC 20X	250mL	5X
	Caseína	2,5g	0,25%
	N Lauril sarcosil 10%	10mL	0,1%
	SDS 10%	2mL	0,02%
	H <sub>2</sub> O	q.s.p. 1L	
<b>Tampão Citrato</b>	Citrato trissódico 2H <sub>2</sub> O	29,4g	0,1M
	H <sub>2</sub> O	q.s.p. 1L	
	Ajustar para pH 5,0 adicionando ácido cítrico monohidratado.		

FONTE: O autor (2008).

Os *dot blots*, pontos correspondentes aos locais onde os produtos de PCR foram aplicados, foram traduzidos em “ausência” ou “presença” do gene *KIR* testado para o DNA de cada indivíduo de acordo com a intensidade de seu sinal. No entanto, como existe variação na qualidade dos produtos de PCR, é fundamental fazer a leitura dos *dot blots* levando em consideração a intensidade destes produtos após a corrida

eletroforética. Além disso, graças aos genes *KIR* moldura e a outros com frequência de quase 100%, foi possível usar sondas monomórficas (que hibridam em todos os produtos de PCR homólogos) como controle de intensidade.

Uma das vantagens da técnica de SSOP é a possibilidade de reutilização dos *dot blots* para posterior reibridação com outra sonda. Para isso, basta retirar com uma lavagem em álcool 80% o TMB precipitado e em seguida realizar duas outras etapas:

- lavagem com NaOH 0,4N, SDS 0,1% por 30min a 10 °C acima da temperatura de fusão ( $T_m$ , do inglês, *melting temperature*) da sonda;
- lavagem com Tris HCl 2M pH 7,5 10%, SSPE 0,1X, SDS 0,5% por 30min a 10 °C acima da temperatura de fusão da sonda.

Por fim, é necessário reidratar a membrana em água, estando então os *dot blots* prontos para uma nova etapa de hibridação.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os genótipos KIR foram então determinados e armazenados em um banco de dados do Microsoft Access<sup>®</sup> versão 1997. Em seguida, estes dados foram processados no programa Convert<sup>®</sup> 1.1 (PROBST, 1998), uma ferramenta computacional que realiza contagem direta. Já as frequências gênicas foram obtidas por meio da fórmula de Bernstein, uma vez que a metodologia empregada não permite distinguir indivíduos homocigotos de indivíduos heterocigotos para cada gene: frequência gênica =  $1 - \sqrt{1 - f}$ , sendo  $f$  a frequência de presença do gene observada na população. Essa fórmula pressupõe que as frequências seguem as proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para investigar diferenças entre as frequências de cada amostra populacional, foram feitos testes de contingência utilizando o programa RxC<sup>®</sup> (MILLER, 1997), que fornece o valor de  $P$  pelo teste exato de Fisher. Valores de  $P$  inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

As distâncias genéticas entre as amostras populacionais deste estudo e as presentes na literatura foram estimadas a partir do método de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1967) e o dendrograma foi produzido a partir do método Fitch-Margoliash (FITCH e MARGOLIASH, 1967) utilizando o programa de inferência filogenética PHYLIP (FELSENSTEIN, 2004) e visualizado no programa Treeview® (PAGE, 1996).

Para a análise de associação, pacientes e controles foram pareados principalmente de acordo com a ancestralidade predominante, além de critérios como condições de vida, escolaridade, sexo, ambiente e outros também terem sido levados em consideração. Em seguida foram feitos os mesmos testes de contingência usados para a análise de genética de populações. Adicionalmente, calculamos a razão de chance (ou OR, do inglês, *odds ratio*), uma aproximação do risco relativo que fornece com quantas vezes mais chance o grupo de pacientes com determinado gene ou alelo tem de desenvolver a doença quando comparado ao grupo controle com a mesma variante. Esta OR foi obtida através do método de Woolf, usando a seguinte fórmula:

$$OR = a \cdot b / c \cdot d$$

sendo **a** e **d**, respectivamente, o número absoluto de pacientes e controles portando a variante hipotética **x** e **b** e **c**, respectivamente, o número absoluto de pacientes e controles não apresentando tal variante.

O intervalo de confiança (IC) da OR foi calculado para diferenciar as associações reais daquelas que seriam observadas ao acaso em função das variações nas frequências de presença de cada gene em cada grupo. Para tal, adotamos a seguinte fórmula, como feito por Pavoni *et al.* (2003):

$$IC (95\%) = \text{anti ln} \left( \ln(OR) \pm 1,96 \cdot \sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d} \right)$$

sendo **a**, **b**, **c** e **d** as mesmas classes do cálculo da OR e **ln** o logaritmo neperiano.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-SSOP

Os protocolos de PCR para as regiões genômicas do domínio Ig D1 e D0 dos receptores KIR foram otimizados (TABELA 2), mas não para a região do domínio Ig D2. O protocolo de PCR para a região genômica correspondente ao domínio transmembrânico/citoplasmático dos receptores KIR (TABELA 3) foi parcialmente otimizado, pois apresentou excelentes resultados para DNA's que em geral tinham sido obtidos recentemente. Como este não era o perfil das amostras das três populações deste estudo, só utilizamos produtos de PCR dos domínios Ig D1 e D0 para a etapa de SSOP.

Dos 43 oligonucleotídeos-sonda listados na Tabela 5, 28 tiveram a temperatura de lavagem de alta estringência (temperatura em que metade da quantidade das moléculas de sonda está hibridada ao alvo específico) estabelecida empiricamente por SSOP. No entanto, devido a problemas técnicos discutidos mais adiante, apenas oito oligonucleotídeos-sonda (Ig2 2DS3, Ig3 2DL4, Ig3 3DL2, Ig3 3DL3, Ig3 X (3DP1), P70-1 (3DS1), P70-3 e P70-4) foram utilizados para a genotipagem dos genes *KIR* nas três amostras populacionais, sendo que um par de sondas (P70-3 e P70-4) foi empregado para a detecção de *KIR3DL1* (FIGURA 8).

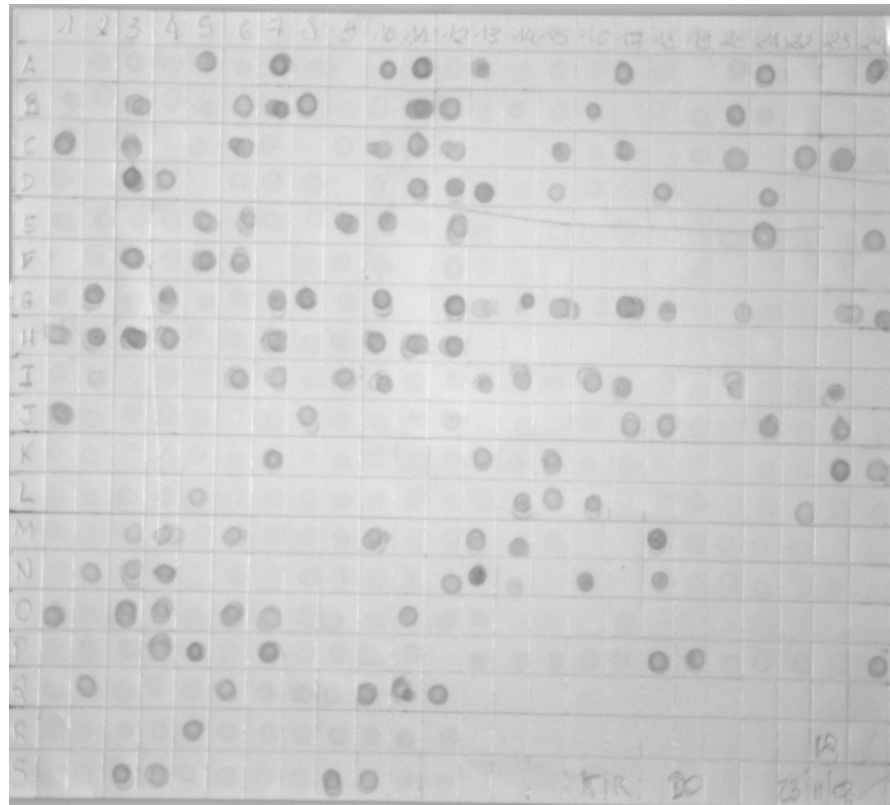


FIGURA 8 - FOTO DE MEMBRANA COM *DOT BLOTS* DO DOMÍNIO IG DO HIBRIDADOS COM A SONDA P70-3 (3DL1\*00101). Neste caso, a ausência (e. g., indivíduo A4) ou presença (e. g., indivíduo A5) de sinal indica, respectivamente, se o indivíduo tem ou não o alelo 3DL1\*00101. Para a genotipagem de presença ou ausência do gene *KIR3DL1* foi necessário hibridar os *dot blots* também para a sonda P70-4 (3DL1\*002), que permite a detecção dos demais alelos do gene. Nesta membrana, estão representadas as três populações analisadas (AFR-BR, KIV e ORI-BR).

#### 4.2 FREQUÊNCIA DE GENES *KIR* EM AFR-BR, KIV E ORI-BR

Os genes analisados em AFR-BR, KIV e ORI-BR incluem os 4 genes moldura e outros 3 genes, sendo dois ativadores (*KIR2DS3* e *KIR3DS1*) e um inibidor (*KIR3DL1*) (TABELA 7). Todos os genes moldura mostraram ter frequência de presença de 100% em todas as amostras, com exceção de *KIR3DL3*, que apresentou frequência de presença de 99,1% em AFR-BR. Encontramos, para os genes não moldura analisados (*KIR2DS3*, *KIR3DL1* e *KIR3DS1*), diferença estatisticamente significativa entre as

freqüências apresentadas por KIV quando comparadas às apresentadas por AFR-BR ( $P < 10^{-4}$ ,  $P < 10^{-2}$  e  $P < 10^{-4}$ , respectivamente) e ORI-BR ( $P < 10^{-4}$ ,  $P < 10^{-2}$  e  $P < 10^{-3}$ , respectivamente). Não foram observadas diferenças significantes entre AFR-BR e ORI-BR ( $P = 0,19$ ,  $P = 1,00$  e  $P = 0,19$ , respectivamente).

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GÊNICA E DE PRESENÇA DE SETE GENES EM AFR-BR, KIV E ORI-BR

	GENE	KIR	2DS3	3DL1	3DS1	2DL4	3DL2	3DL3	3DP1
AFR-BR (115)	%	25	95	30	100	100	99	100	
	f	0,13	0,78	0,16	1,00	1,00	0,90	1,00	
	$P^a$	$< 10^{-4}$	$< 10^{-2}$	$< 10^{-4}$	NS	NS	NS	NS	
KIV (128)	%	0	81	67	100	100	100	100	
	f	0,00	0,56	0,43	1,00	1,00	1,00	1,00	
	$P^a$	$< 10^{-4}$	$< 10^{-2}$	$< 10^{-4}$	NS	NS	NS	NS	
ORI-BR (67)	%	16	95	41	100	100	100	100	
	f	0,08	0,78	0,23	1,00	1,00	1,00	1,00	
	$P^b$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
	$P^c$	$< 10^{-4}$	$< 10^{-2}$	$< 10^{-3}$	NS	NS	NS	NS	

NOTA: % - freqüência de presença em %; f - freqüência gênica;  $P^a$  - valor de  $P$  para a comparação entre KIV e AFR-BR;  $P^b$  - valor de  $P$  para a comparação entre ORI-BR e AFR-BR;  $P^c$  - valor de  $P$  para a comparação entre ORI-BR e KIV; NS - valor de  $P$  não significativo ( $P > 0,05$ ); o número de indivíduos analisados encontra-se entre parênteses ao lado do código de cada amostra; para maiores detalhes sobre como foram feitas as comparações entre as amostras, ver a seção Material e Métodos.

A estimativa das distâncias genéticas entre AFR-BR, KIV, ORI-BR e diversas amostras de origens semelhantes descritas na literatura foi representada num dendrograma (FIGURA 9) que apresentou dois ramos principais: num deles, apenas populações ameríndias, incluindo KIV (KAINGANGIV), foram agrupadas; no outro ramo, reuniram-se uma população ameríndia e as populações de origem predominantemente oriental, européia ou africana, incluindo as amostras AFR-BR (AFRODESCEN) e ORI-BR (ORIENTALBR).

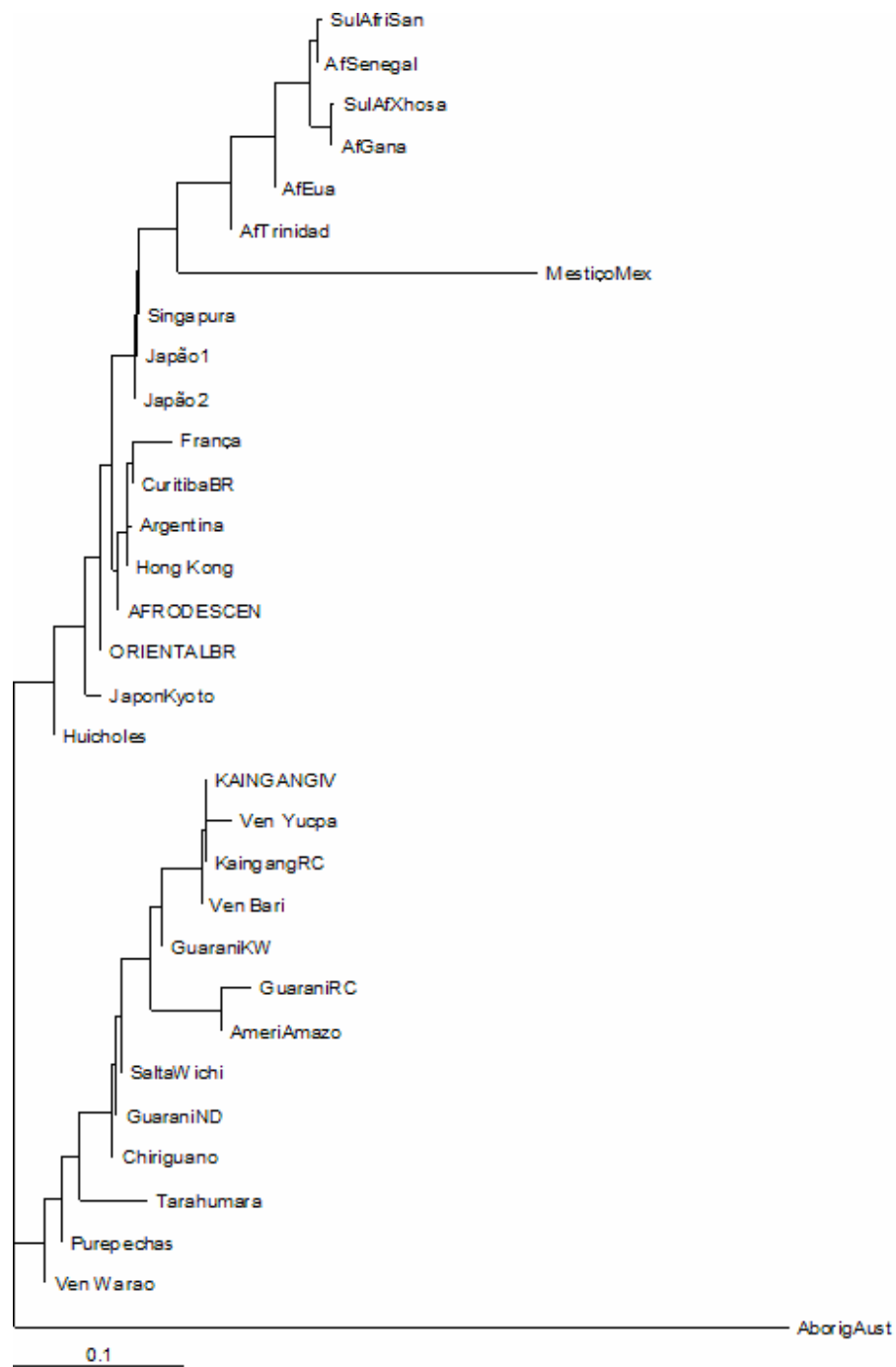


FIGURA 9 - DENDROGRAMA REPRESENTANDO AS DISTÂNCIAS GENÉTICAS PARA OS GENES *KIR2DS3*, *KIR3DL1* E *KIR3DS1* ENTRE AS POPULAÇÕES DESTE ESTUDO E DIVERSAS POPULAÇÕES DE ORIGENS SEMELHANTES DESCRITAS NA LITERATURA.

### 4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE DE GENES *KIR* E A DOENÇA PFE

Na amostra total obtivemos ausência de associação tanto para *KIR3DL1* ( $P = 0,18$ ), quanto para *KIR3DS1* ( $P = 0,14$ ). Com a subdivisão encontramos associação negativa (ou inversa) do gene *KIR3DS1* ( $P = 0,04$ ,  $OR = 0,56$ ;  $IC(95\%) 0,32-0,97$ ) na sub-amostra de origem predominantemente européia (EUR-BR). Nas sub-amostras de ascendência predominantemente européia e ameríndia (EUR-BR+AMERIN) e predominantemente afro-brasileiras (AFRO-BR 1 e AFRO-BR 2) não foram encontradas associações entre o polimorfismo de ausência e presença desses genes *KIR* e a doença PFE (TABELA 8).

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GÊNICA E DE PRESENÇA DOS GENES *KIR3DL1* E *KIR3DS1* EM QUATRO SUB-AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES DE PFE

GENE <i>KIR</i>		EUR-BR		EUR-BR+AMERIN		AFRO-BR 1		AFRO-BR 2	
		pacientes (111)	controles (121)	pacientes (27)	controles (13)	pacientes (98)	controles (72)	pacientes (51)	controles (32)
<b>3DL1</b>	%	92	89	93	92	94	87	94	90
	f	0,72	0,67	0,74	0,72	0,76	0,64	0,76	0,68
	P	NS		NS		NS		NS	
<b>3DS1</b>	%	30	43	41	23	39	43	31	41
	f	0,16	0,25	0,23	0,12	0,22	0,25	0,17	0,23
	P	0,04		NS		NS		NS	

NOTA: % - frequência de presença em %; f - frequência gênica; P - valor de P para a comparação entre pacientes e controles de cada sub-amostra; NS - valor de P não significativo ( $P > 0,05$ ); o número de pacientes e controles analisados encontra-se entre parênteses abaixo do código de cada sub-amostra; para maiores detalhes sobre como foram feitas as comparações entre as amostras, ver a seção Material e Métodos.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-SSOP

A otimização das temperaturas de lavagem de alta estringência para cada sonda usada na detecção dos genes *KIR* pela técnica de PCR-SSOP mostrou-se um procedimento altamente empírico. A maioria das sondas teve sua temperatura otimizada, mas algumas dificuldades impediram sua utilização para a genotipagem das amostras deste estudo. Sendo a SSOP uma técnica sensível à quantidade de produto de PCR, que depende diretamente da qualidade do DNA, tem-se um problema quando lidamos com amostras de DNA antigas ou de baixa qualidade.

Um dos obstáculos encontrados foi a elevada heterogeneidade quantitativa dos produtos de PCR correspondentes ao domínio transmembrânico/citoplasmático dos genes *KIR*, além das inúmeras falhas de amplificação mesmo após uma busca insistente por um protocolo de PCR ideal. Com isso, a hibridação desta região para posterior genotipagem ficou inviabilizada.

Somado a isso, a genotipagem para algumas sondas não apresentou os resultados esperados, isto é, mesmo havendo controles positivos para ela, o resultado obtido era sempre ausência total de sinal. O fato de termos solicitado ressíntese de uma das sondas que se encontrava em tal situação e termos com isso resolvido pontualmente a questão, nos fez acreditar na hipótese de haver problemas de síntese com outras sondas.

Em outros casos, mesmo após diversos testes de temperaturas de lavagem de alta estringência, a genotipagem dos controles positivos e negativos, previamente obtidos por PCR-SSP (AUGUSTO, 2006; PIOVEZAN, 2007), não correspondia ao padrão de leitura obtido a partir dos *dot blots*.

Uma observação interessante quanto ao emprego da técnica de PCR-SSOP na detecção de genes *KIR* foi que, de maneira geral, a intensidade de sinal dos *dot blots* é fraca mesmo para os produtos de PCR de sinal mais forte, o que pode ter relação

direta com o fato de amplificarmos muitos genes simultaneamente, sendo que apenas no máximo um é complementar à sonda testada. Conseguimos amenizar esta dificuldade aumentando a ciclagem do programa de PCR de 40 para 45 ciclos, o que representa um aumento teórico de bilhões de cópias de DNA, haja visto a escala exponencial da técnica.

Em função disso, nossa análise ficou restrita a poucos genes *KIR*, dos quais mais da metade são genes moldura, pouco informativos do ponto de vista populacional, uma vez que apresentam frequência de 100% em quase todas as populações.

## 5.2 *KIR2DS3*, *KIR3DL1* E *KIR3DS1* EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS, AFRODESCENDENTES E DE ORIGEM PREDOMINANTEMENTE JAPONESA

Diversos estudos com populações ameríndias registraram frequência nula ou muito baixa do gene *KIR2DS3*. Em KIV não foi observado nenhum indivíduo portador desse gene, assim como não foi em outro grupo Kaingang do Paraná (reserva indígena do Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras) estudado por nossa equipe (AUGUSTO, 2006; PIOVEZAN, 2007 e dados não publicados), o que pode sugerir que este gene tenha desaparecido por deriva genética e efeito fundador. É mais parcimonioso sugerir deriva genética ao invés de seleção natural pois, além destas populações ameríndias serem de tamanho reduzido e isoladas, o que torna a deriva genética expressiva, o contato com patógenos exógenos deveria aumentar as frequências dos genes ativadores através de seleção natural direcional e não diminuí-las. Entretanto, como um desequilíbrio de sinais ativadores e inibidores relacionado à presença de genes ativadores poderiam levar as células NK a atacarem células próprias e saudáveis, a seleção natural também não pode ser descartada.

Comparando os dados obtidos para KIV com os dados da literatura apresentados na Tabela 1, verificamos que os genes *KIR2DS3* e *KIR3DL1* em KIV diferem mais comumente em relação a outras populações ameríndias em termos de frequência que o gene *KIR3DS1*. Este último só apresentou diferença significativa ( $P =$

0,04) quando comparado a uma amostra de ameríndios Wichis da Argentina (FLORES *et al.*, 2007).

*KIR3DL1* em KIV diferiu quando comparado a todas as amostras de ameríndios mexicanos estudadas por Gutiérrez-Rodríguez *et al.* (2006) ( $P < 10^{-3}$ ,  $P < 10^{-2}$  e  $P < 10^{-3}$ , em relação a Huicholes, Purepechas e Tarahumara, respectivamente) e a uma amostra de diversos grupos ameríndios da Amazônia (EWERTON *et al.*, 2007) ( $P = 0,0496$ ).

*KIR2DS3* em KIV também diferiu em relação a esta amostra da Amazônia ( $P < 10^{-2}$ ), além de ter diferido de uma amostra ameríndia venezuelana (GENDZEKHADZE *et al.*, 2006) ( $P < 10^{-4}$ , para Warao), argentina (FLORES *et al.*, 2007) ( $P = 0,02$ , para Chiriguanos) e mexicana (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2006) ( $P < 10^{-4}$ , para Huicholes).

Análises da seqüência do genoma mitocondrial humano em nativos americanos sugerem que as Américas tenham sido povoadas há cerca de 20 mil anos quando se deu uma provável onda migratória originada no nordeste asiático. No entanto, a entrada efetiva no continente ocorreu provavelmente há 18 ou 19 mil anos atrás, após um longo confinamento na Beríngia (FAGUNDES *et al.*, 2008; FAGUNDES, KANITZ e BONATTO, 2008). Em seguida a essa entrada, as migrações teriam ocorrido no sentido norte-sul, sem consenso na literatura das rotas utilizadas (PUCCIARELLI *et al.*, 2008).

De posse dessas informações, deveríamos observar freqüências semelhantes entre as populações ameríndias e as de origem predominantemente asiática. No entanto, nossos dados mostram que as freqüências dos três genes *KIR* não analisados diferem estatisticamente entre KIV e ORI-BR, o que mais uma vez evidencia o quão intensa foi a deriva genética para essas populações pequenas e com pouco ou ausente fluxo gênico (PROBST *et al.*, 2000).

As freqüências de ausência e presença da amostra populacional de origem predominantemente japonesa foram comparadas com outras amostras japonesas listadas na Tabela 1 e como resultado obtivemos diferença significativa apenas para o gene *KIR3DL1* em uma população de Kyoto (dados obtidos no site "www.allelefreqencies.net") em relação a ORI-BR ( $P = 0,01$ ). Comparamos também

com duas amostras chinesas (MIDDLETON *et al.*, 2007), mas nenhuma diferença foi registrada.

Numa abordagem comparativa entre AFR-BR e as amostras de origem africana apresentadas na Tabela 1, notamos praticamente o contrário ao observado em KIV, ou seja, as diferenças significantes foram registradas apenas para o gene *KIR3DS1*, que se mostrou mais freqüente em AFR-BR do que nas amostras com as quais foi comparada. Os valores de *P* foram de aproximadamente 0,02 entre AFR-BR e as amostras africanas de Trinidad e Tobago (“www.allelefrequencies.net”) e afro-americana dos Estados Unidos da América (EUA) (“www.allelefrequencies.net”), inferior a  $10^{-3}$  entre AFR-BR e a amostra de Gana (“www.allelefrequencies.net”) e inferiores a  $10^{-4}$  entre AFR-BR e a amostra de Senegal (“www.allelefrequencies.net”) e as duas amostras da África do Sul - San e Xhosa (MIDDLETON *et al.*, 2007).

Para *KIR2DS3*, à exceção da amostra sul-africana Xhosa ( $P = 0,09$ ), todas as demais comparações entre AFR-BR e as amostras de origem africana resultaram em valores de *P* variando entre 0,31 e 1,00, o que sugere que a distribuição desse gene entre essas populações seja realmente muito semelhante.

A freqüência do gene *KIR3DL1* também não diferiu de forma estatisticamente significativa entre as amostras africanas da Tabela 1 e AFR-BR, no entanto, os valores de *P* foram em geral mais próximos do limiar ( $P = 0,42$ ,  $P = 0,18$ ,  $P = 0,34$ ,  $P = 0,06$ ,  $P = 0,14$  e  $P = 0,18$ , para as comparações com as amostras africanas de Trinidad e Tobago, afro-americana dos EUA, africana de Gana, do Senegal e da África do Sul - San e Xhosa - respectivamente).

Tendo em vista que ORI-BR apresentou freqüências muito semelhantes em relação a amostra AFR-BR para os três genes *KIR*, optamos por comparar ORI-BR com as amostras de origem africana listadas na Tabela 1 a fim de verificar a consistência dessa semelhança. Para *KIR3DL1*, não foi registrada nenhuma diferença significativa entre ORI-BR e as 6 amostras africanas, ao passo que para *KIR3DS1* houve diferença em relação a todas as comparações, com todos os valores de *P* inferiores a  $10^{-2}$ . Entretanto, o gene *KIR2DS3* mostrou distribuição diferente entre ORI-BR e a amostra de Gana ( $P = 0,03$ ) e sul-africana Xhosa ( $P = 0,01$ ). Mesmo assim, os dados mostram que as semelhanças entre ORI-BR e AFR-BR são consistentes, uma

vez que ambas diferiram igualmente das amostras de origem africana para dois genes *KIR*.

### 5.3 DENDROGRAMA DE POPULAÇÕES COM BASE NAS FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR2DS3*, *KIR3DL1* E *KIR3DS1*

De forma geral, o dendrograma apresentou dois ramos principais, um formado por populações ameríndias e outro por populações não ameríndias, sendo que a população aborígine do sul da Austrália (TONEVA *et al.*, 2001) constituiu um ramo distinto, mostrando ser um grupo geneticamente distante dos demais, apesar da sua origem predominantemente africana e recente miscigenação com ingleses.

O ramo formado apenas por indígenas corroborou a hipótese de que deriva genética e baixo fluxo gênico são fatores evolutivos importantes na composição da diversidade genética destes grupos pequenos e isolados, tornando-os geneticamente distantes das populações não ameríndias, nas quais estes fatores não são relevantes. Dentro desse ramo, pudemos notar que Kaingang da reserva Ivaí e Kaingang da reserva Rio das Cobras (KaingangRC) no município de Nova Laranjeiras-PR (AUGUSTO, 2006; PIOVEZAN, 2007 e dados não publicados) são tribos muito próximas do ponto de vista genético. O fato de haver uma outra tribo (Guarani da reserva Rio das Cobras, referida no dendrograma como GuaraniRC) que habita a mesma reserva dessa outra população Kaingang estudada por nossa equipe e o fato de a distância genética entre elas ser maior que a distância entre ambas as tribos Kaingang, corrobora a hipótese de se tratarem de grupos isolados que mantêm baixo fluxo gênico (PETZL-ERLER, LUZ e SOTOMAIOR, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Outras duas populações ameríndias estudadas por nossa equipe, além de Guarani e Kaingang da reserva indígena do Rio das Cobras no Paraná, foram Guarani Kaiowá (GuaraniKW) e Guarani Nandeva (GuaraniND), ambas localizadas no estado do Mato Grosso do Sul (AUGUSTO, 2006; PIOVEZAN, 2007 e dados não publicados). A distância genética entre essas duas tribos foi maior que a distância entre as amostras

Kaingang, mas GuaraniKW se mostrou mais próximo de GuaraniRC em relação a GuaraniND.

No outro ramo, formado pelas populações não ameríndias, com exceção da tribo Huicholes do México (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2006), AFR-BR (AFRODESCEN) e ORI-BR (ORIENTAL-BR) mostraram-se muito próximas de populações de origem predominantemente européia como a de Curitiba (AUGUSTO, 2006), França (MICCO, REVIRON, e CHIARONI, 2006) e Argentina (FLORES *et al.*, 2007), evidenciando haver fluxo gênico com grupos de tal ascendência.

Todas as amostras de origem predominantemente africana foram agrupadas a partir de um nó comum, estando geneticamente mais próximas entre si do que das demais populações deste segundo ramo principal. A amostra mestiça do México (CONTRERAS *et al.*, 2007), que tem composição européia, ameríndia e africana, localizou-se entre as de origem principalmente africana e as de ascendência predominantemente européia, corroborando ser um grupo consideravelmente distinto do ponto de vista genético.

#### 5.4 ASSOCIAÇÃO PROTETORA DE *KIR3DS1* NA PATOGÊNESE DO PFE

O maior grau de pareamento das amostras de controles e pacientes deve ser considerado uma das etapas mais críticas de estudos de associação entre a diversidade genética de um dado *locus* e uma doença específica. Na ausência desta, não é possível mensurar qual fator estará levando a observarmos ou não diferenças significantes entre a diversidade genética do grupo de pacientes e controles para uma determinada doença, ou seja, estas diferenças podem ser decorrentes de proporção sexual e faixa etária desiguais, diferenças entre o poder aquisitivo e outros, mas principalmente decorrentes de diferenças na composição genética, haja visto que boa parte dos sistemas genéticos apresentam variantes que se distribuem diferentemente entre as populações geográficas.

Tendo em vista o exposto, procuramos subdividir as amostras de pacientes e controles de PFE para realizar as análises estatísticas. Com esta subdivisão, registramos uma associação negativa entre o polimorfismo de presença e ausência do gene *KIR3DS1* e o PFE a partir da análise de duas sub-amostras de origem predominantemente europeia.

Esta associação protetora pode ser sustentada pelo fato de que as células NK participam também da resposta imune adaptativa, e não apenas da inata, na qual atacam células tumorais e infectadas por vírus através de citocinas e citotoxicidade direta.

A participação das células NK na maturação das células dendríticas constitui o elo de ligação entre a resposta por NK e a resposta por células T, que participam ativamente da resposta imune adaptativa. Além disso, as células dendríticas regulam a diferenciação e proliferação dos linfócitos B, regulando assim a secreção de imunoglobulinas, a aquisição de funções efetoras e o recrutamento para os tecidos (FRENCH e YOKOYAMA, 2004; FLODSTRÖM *et al.*, 2002). Dessa forma, as células NK, que se comunicam com o sistema imune através de moléculas como os receptores KIR, estão indiretamente relacionadas a atividade das células B, cruciais no desenvolvimento da doença autoimune Pênfigo Foliáceo Endêmico.

A presença do gene *KIR3DS1* já foi relacionada a outras enfermidades, como a AIDS, conferindo progressão mais lenta à doença em indivíduos portadores também de um subconjunto de alelos *HLA-B Bw4* (MARTIN *et al.*, 2002).

Portanto, tendo em vista o mecanismo de ação dos receptores, a genotipagem HLA dos indivíduos da amostra de pacientes e controles de PFE pode eventualmente fornecer um resultado ainda mais consistente.

## 6 CONCLUSÃO

A técnica de PCR-SSOP mostrou ser uma metodologia de grande valia para a tipagem dos genes *KIR*, uma vez que o gasto de reagentes e de DNA é extremamente reduzido em relação a outras técnicas como a de PCR-SSP, sendo a etapa de otimização do método a mais dispendiosa. Além da economia, a velocidade de genotipagem é expressivamente mais curta estando uma vez o método otimizado.

A amostra ameríndia de Kaingang do Ivaí diferiu das amostras afrodescendente e de origem predominantemente japonesa em relação aos três genes não moldura abordados (*KIR2DS3*, *KIR3DL1* e *KIR3DS1*). Já estas duas últimas apresentaram distribuição semelhante para a ausência e presença destes genes.

O gene *KIR2DS3* apresentou freqüência nula apenas na amostra ameríndia, o que pode sugerir que este gene tenha desaparecido por deriva genética e efeito fundador nesta população, como deve ter ocorrido em outras populações indígenas da América. Em contrapartida, registramos a maior freqüência para o gene *KIR3DS1* nesta amostra de Kaingang do Ivaí.

O gene *KIR3DL1* exibiu elevada freqüência nas três amostras deste estudo e os genes moldura foram detectados em todos indivíduos analisados, com exceção de um indivíduo da amostra afro-brasileira que não apresentou *KIR3DL3*.

Por fim, encontramos associação inversa entre o polimorfismo de presença e ausência do gene *KIR3DS1* e a patogênese da doença autoimune Pênfigo Foliáceo Endêmico numa amostra de pacientes e controles de origem predominantemente européia, que nos leva a sugerir que a presença do gene *KIR3DS1* ofereça aos seus portadores menor predisposição à doença.

## REFERÊNCIAS

ANHALT, G. J.; KIM, S.; STANLEY, J. R.; KORMAN, N. J.; JABS, D. A.; KORY, M.; IZUMI, H.; RATRIE, H.; MUTASIM, D.; ARISS-ABDO, L.; LABIB, R. S. Paraneoplastic Pemphigus: an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. **N Engl J Med**, v. 323, p. 1729, 1990.

AUGUSTO, D. G. **Genes KIR no Brasil: Caracterização de três populações**. 43 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BANCROFT, G. J. The role of natural killer cells in innate resistance of infection. **Curr Opin Immunol**, v. 5, p. 503, 1993.

BAUER, S.; GROH, V.; WU, J.; STEINLE, A.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L.; SPIES, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. **Science**, v. 285, p. 727, 1999.

BIRON, C. A.; NGUYEN, K. B.; PIEN, G. C.; COUSENS, L. P.; SALAZAR-MATHER, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 189, 1999.

BOYINGTON J. C.; MOTYKA, S. A.; SCHUCK, P.; BROOKS, A. G.; SUN, P. D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. **Nature**, v. 405, p. 537, 2000.

CAVALLI-SFORZA, L. L. e EDWARDS, A. W. F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **Am J Hum Genet**, v. 19, p. 233, 1967.

CONTRERAS, G.; ALÁEZ, C.; MURGUÍA, A.; GARCÍA, D.; FLORES, H.; GORODEZKY, C. Distribution of the killer cell immunoglobulin-like receptors in Mexican Mestizos. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 125, 2007.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; HANZ-FILHO, G.; BORGES, P.; CHAUL, A.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R. S.; ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo

selvagem): II Current and Historic epidemiologic studies. **J Invest Dermatol**, v. 92, p. 4, 1989.

EWERTON, P. D.; LEITE, MDE. M.; MAGALHÃES, M.; SENA, L.; MELO DOS SANTOS, E. J. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. **Immunogenetics**, v. 59, p. 625, 2007.

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. **Am J Hum Genet**, v. 82, p. 583, 2008.

FAGUNDES, N. J. R.; KANITZ, R. e 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**, v. 3, 2008.

FAN, Q. R.; LONG, E. O. e WILEY, D. C. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. **Nat Immunol**, v. 2, p. 452, 2001.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.2. **Cladistics**, v. 5, p. 164, 1989.

FITCH, W. M. e MARGOLIASH, E. Construction of phylogenetic trees. **Science**, v. 155, p. 279, 1967.

FLODSTRÖM, M.; SHI, F. D.; SARVETNICK, N.; LJUNGGREN, H. G. The natural killer cell - friend or foe in autoimmune disease? **Scand J Immunol**, v. 55, p. 432, 2002.

FLORES, A. C.; MARCOS, C. Y.; PALADINO, N.; CAPUCCHIO, M.; THEILER, G.; ARRUVITO, L.; PARDO, R.; HABEGGER, A.; WILLIAMS, F.; MIDDLETON, D.; FAINBOIM, L. KIR genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 568, 2007.

FRASSATI, C.; TOUINSSI, M.; PICARD, C.; SEGURA, M.; GALICHER, V.; PAPA, K.; GAGNE, K.; VIVIER, E.; DEGIOANNI, A.; BÖETSCH, G.; MERCIER, P.; VÉLY, F.; DE MICCO, P.; REVIRON, D. e CHIARONI, J. Distribution of killer-cell immunoglobulin-like

receptor (KIR) in Comoros and Southeast France. **Tissue Antigens**, v. 67, p. 356, 2006.

FRENCH, A. R. e YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells and autoimmunity. **Arthritis Res Ther**, v.6, p. 8, 2004.

**FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO (FUNAI)**. Disponível em: <<http://www.funai.gov.br>>. Acesso em: 11/09/2008.

GARDINER, C. M. Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. **Int J Immunogenet**, v. 35, p. 1, 2007.

GENDZEKHADZE, K.; NORMAN, P. J.; ABI-RACHED, L.; LAYRISSE, Z.; PARHAM, P. High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes. **Immunogenetics**, v. 58, p. 474, 2006.

GEROSA, F.; BALDANI-GUERRA, B.; NISII, C.; MARCHESINI, V.; CARRA, G.; TRINCHIERI, G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. **J Exp Med**, v. 195, p. 327, 2002.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M. E.; SANDOVAL-RAMÍREZ, L.; DÍAZ-FLORES, M.; MARSH, S. G.; VALLADARES-SALGADO, A.; MADRIGAL, J. A.; MEJÍA-ARANGURE, J. M.; GARCÍA, C. A.; HUERTA-ZEPEDA, A.; IBARRA-CORTÉS, B.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; CRUZ, M. KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico. **Hum Immunol**, v. 67, p. 85, 2006.

HSU, K. C.; CHIDA, S.; GERAGHTY, D. E., DUPONT, B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunol Rev**, v. 190, p. 40, 2002.

HURLEY, C. K.; FERNANDEZ-VINA, M.; MIDDLETON, D.; NG, J.; NOREEN, H.; REN, E. C.; SCHMECKPEPER, B.; SMITH, A.; TANG, T. TOKUNAGA, K. (Org.). HLA Class I and II DNA-Based Typing Sequence Specific Oligonucleotide Probe Typing Technical Manual/Reference Protocols, versão 1.1. In: THIRTEENTH INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP, 1998. Disponível em: <<http://www.ihwg.org/protocols/man1.htm>>.

**Instituto Socioambiental.** Disponível em:

<<http://www.socioambiental.org/website/pib/index.html>>. Acesso em: 23/08/2007.

KHAKOO, S.I.; THIO, C. L.; MARTIN, M. P.; BROOKS, C. R.; GAO, X.; ASTEMBORSKI, J.; CHENG, J.; GOEDERT, J. J.; VLAHOV, D.; HILGARTNER, M.; COX, S.; LITTLE, A. M.; ALEXANDER, G. J.; CRAMP, M. E.; O'BRIEN, S. J.; ROSENBERG, W. M.; THOMAS, D. L.; CARRINGTON, M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. **Science**, v. 305, p. 872, 2004.

KHAKOO, S. I. e CARRINGTON, M. KIR and disease: a model system or system of models? **Immunol Rev**, v. 214, p. 186, 2006.

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

LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem). **J Exp Med**, v. 197, p. 1501, 2003.

LJUNGGREN, H. G. e KÄRRE, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. **Immunol Today**, v. 11, p. 237, 1990.

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; FRIEDMAN, H.; MARTINS, C. R.; SANCHES, J. A.; CUNHA, P. R.; HOFFMAN, R. G.; DIAZ, L. A. The cooperative group on Fogo selvagem Research. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol**, v. 98, p. 847, 1992.

LONG, E. O.; COLONNA, M. e LANNIER, L. L. Inhibitory MHC Class I receptors on NK and T Cells: a standard nomenclature. **Immunol Today**, v. 17, p. 100, 1996.

MARTIN, M. P.; GAO, X.; LEE, J. H.; NELSON, G. W.; DETELS, R.; GOEDERT, J. J.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K.; VLAHOV, D.; TROWSDALE, J.; WILSON, M.; O'BRIEN, S. J.; CARRINGTON, M. Epistatic interaction between *KIR3DS1* and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nat Genet**, v. 31, p. 429, 2002.

MARTIN, M. P.; BASHIROVA, A.; TRATHERNE, J.; TROWSDALE, J.; CARRINGTON, M. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. **J Immunol**, v. 171, p. 2192, 2003.

MARSH, S. G.; PARHAM, P.; DUPONT, B.; GERAGHTY, D. E.; TROWSDALE, J.; MIDDLETON, D.; VILCHES, C.; CARRINGTON, M.; WITT, C.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H.; GARCIA, C. A.; HSU, K. C.; WAIN, H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. **Tissue Antigens**, v. 62, p. 79, 2003.

MAXWELL, L. D.; WALLACE, A.; MIDDLETON, D.; CURRAN, M. D. A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. **Tissue Antigens**, v. 60, p. 254, 2002.

MAXWELL, L. D.; ROSS, O. A.; CURRAN, M. D.; REA, I. M.; MIDDLETON, D. Investigation of KIR diversity in immunosenescence and longevity within the Irish population. **Exp Gerontol**, v. 39, p. 1223, 2004.

MEYER, D. Árvores evolutivas humanas. In: **Série Monografias** n.º 3. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p 1-162, 1995.

MIDDLETON, D.; MENCHACA, L.; ROOD, H.; KOMEROFSKY, R. New Allele Frequency Database: <http://www.allelefreqencies.net>. **Tissue Antigens**, v. 61, p. 403, 2003.

MIDDLETON, D.; MEENAGH, A.; MOSCOSO, J.; ARNAIZ-VILLENA, A. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. **Tissue Antigens**, v. 71, p. 105, 2007.

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

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 Immun**, advanced on line publication, 2008.

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

PARHAM, P. e MCQUEEN, K. L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. **Nat Rev Immunol**, v. 3, p. 108, 2003.

PARHAM, P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Mol Immunol**, v. 42, p. 459, 2005.

PAVONI, D. P.; ROXO, V. M. M. S.; MARQUART FILHO, A.; PETZL-ERLER, M. P. Dissecting the associations of endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes Immun**, v. 4, p. 110, 2003.

PETZL-ERLER, M. L. e SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v. 33, p. 408, 1989.

PETZL-ERLER, M. L.; LUZ, R. e SOTOMAIOR, V. S. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: The Kaingang and the Guarani. **Tissue Antigens**, v.41, p.227, 1993.

PIOVEZAN, B. Z. **Distribuição e diversidade de genes KIR em duas populações ameríndias do Mato Grosso do Sul**. 43 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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.; DALALIO, M. M. O. ; VISENTAINER, J. E. ; TSUNETO, L. T. ; PETZL-ERLER, M. L. HLA polymorphism and evaluation of European, African and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Hum Biol**, v. 72, p. 597, 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. **J Hum Evol**, v. 54, p. 296, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. In **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd Ed.); Cold Spring Harbor; 1989.

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

SINGLE, R. M.; MARTIN, M. P.; MEYER, D.; GAO, X.; CARRINGTON, M. Methods for assessing gene content diversity of *KIR* with examples from a global set of populations. **Immunogenetics**, v. 60, p. 711, 2008.

SUZUKI, Y.; HAMAMOTO, Y.; OGASAWARA, Y.; ISHIKAWA, K.; YOSHIKAWA, Y.; SASAZUKI, T.; MUTO, M. Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. **J Invest Dermatol**, v. 122, p. 1133, 2004.

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

TROWSDALE, J. Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes. **Immunity**, v. 15, p. 363, 2001.

UHRBERG, M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at *KIR* gene regulation. **Mol Immunol**, v. 42, p. 471, 2005.

VILCHES C.; PANDO M. J. e PARHAM P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. **Immunogenetics**, v. 51, p. 639, 2000.

VILCHES, C.; RAJALINGAM, R.; UHRBERG, M.; GARDINER, C. M.; YOUNG, N. T.; PARHAM P. KIR2DL5; a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig- like domains. **J Immunol**, v. 164, p. 5797, 2000.

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

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

YAWATA, M.; YAWATA, N.; DRAGHI, M.; LITTLE, A. M.; PARTHENIOU, F.; PARHAM, P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. **J Exp Med**, v. 203, p. 633, 2006.

YEN, J. H.; MOORE, B. E.; NAKAJIMA, T.; SCHOOL, D.; SCHAID, D. J.; WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **J Exp Med**, v. 1993, p. 1159, 2001.

ZINGONI, A.; SORNASSE, T.; COCKS, B. G.; TANAKA, Y.; SANTONI, A.; LANIER, L. L. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. **J Immunol**, v. 173, p.3724, 2004.