

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO DALLA COSTA

DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE *KIR3DL1/3DS1* EM POPULAÇÕES
AMERÍNDIAS E URBANAS DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES

CURITIBA

2008

RICARDO DALLA COSTA

DIVERSIDADE ALÉLICA DOS GENES *KIR3DL1/3DS1* EM POPULAÇÕES
AMERÍNDIAS E URBANAS DE DIFERENTES ANCESTRALIDADES

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Genética (BG 016) 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

Àqueles que acreditam na beleza
dos seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

De modo muito especial aos meus pais, aos meus irmãos e a minha avó Elvira, pelos anos de apoio e confiança. A maneira mais digna de eu agradecer por tudo que vocês me deram é procurar ser, a cada dia, um pouquinho melhor. Eu ainda espero vos encher de muito orgulho.

As minhas eternas amigas Giovana, Vanessa, Rayana, Roseli, Anne, Lívia e Lilian, pelos lindos dias vividos nestes quatro anos e meio de faculdade. Sem vocês não teria sido fácil viver longe de casa. Obrigado por me suportarem!

Aos amigos do laboratório pelas risadas diárias, pelos problemas compartilhados, pelas discussões com as quais aprendo tanto.

À Márcia pelo apoio e paciência desde a época de *CD80* e *CD86*. Graças a você eu fiz a **MAIOR** hibridação de todos os tempos (risos).

À Li pelos sábios conselhos.

Ao Danillo pela ajuda a qualquer hora.

À Paloma e ao Layo pela ajuda sem fim nesses últimos dias.

Ao Bruno pelas idéias, que muitas vezes chegaram tarde demais (risos), e pela agonia compartilhada nas práticas de ensino.

Ao Gabriel, por superar comigo o desafio de fazer nossas monografias. As noites de sono perdidas valeram à pena.

À Marcinha (Maldita) que mesmo estando longe ajudou muito com as análises. Obrigado pelas malditas viciantes.

À Dani e à KB pelo incentivo e amizade.

À Áurea, pelos chocolates, pelos cafés, pelo carinho. Obrigado.

À professora Roseli Wassem pela ajuda e apoio irrestritos.

Por fim à professora Maria Luíza pela dedicação e competência com que orienta seus alunos. Obrigado pela oportunidade e confiança.

“Surpreender-se é sempre uma boa escolha”

RESUMO

A imunidade natural constitui a primeira linha de defesa do organismo. Dentre as células que participam dessa linha de defesa estão as células assassinas naturais, ou *natural killer (NK)*. Essas células possuem atividade citotóxica contra células infectadas ou malignamente transformadas, sendo também importantes nas fases iniciais das respostas imunes adaptativas. A regulação da atividade das células *NK* ocorre através do balanço entre sinais ativadores e inibidores que são fornecidos por uma variedade de receptores presentes na superfície dessas células. Os genes *KIR* (*killer cell immunoglobulin like-receptor*) são uma família de genes polimórficos que codificam receptores das células *NK*. Entre eles os genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1*, que parecem ocupar o mesmo loco gênico, são bastante importantes. Esses genes são altamente polimórficos e seus produtos se ligam às moléculas HLA com epítipo Bw4. O estudo de genes do sistema imune em diferentes populações é particularmente interessante para a genética de populações, pois esses genes podem estar sob ação de diferentes fatores evolutivos, implicando na diversidade encontrada em cada população. Neste trabalho foram analisados indivíduos pertencentes às tribos indígenas Guarani M'byá (GRC, n=21), Guarani Nandeva (GND, n=26), Guarani Kaiowá (GKW, n=22) e Kaingang (KRC, n=23 e KIV, n=28), além das populações africana (AFRI, n=14), eurobrasileira (CTBA, n=21) e oriental (ORI, n=24). Após amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), foram sequenciados os exons 3, 4 e 5, que codificam, respectivamente, os domínios extracelulares D0, D1 e D2 dos receptores *KIR*, responsáveis pela interação com as moléculas HLA. Utilizando o programa *online dbLCR* as sequências obtidas para cada indivíduo foram comparadas com as sequências dos alelos já descritos. Em todas as populações analisadas o gene *KIR3DL1/3DS1* exibe uma grande diversidade, fato que está relacionado a rápida evolução deste gene. Foram identificadas sete novas possíveis variantes para o gene *KIR3DL1/3DS1*, seis das quais resultam de mutações de ponto no exon 3 e no exon 5 (*v3DS1*1D(S*14_223A>Te235G>A-ex3)*, *v3DL1*1A(741G>A-ex5)*, *v3DL1*1F(202A>G - ex3)*, *v3DL1*1G(702C>T - ex5)*, *v3DS1*1C(857C>T-ex5)* e *v3DL1*1B(309C>A-ex3)*) e um novo alelo foi formado pela recombinação entre dois alelos já descritos (*v3DS1*1E(*S14 - recEx3)*). A variante *v3DS1*1D(S*14_223A>Te235G>A-ex3)* foi identificada em todas as populações. As demais são exclusivas de determinadas populações. O novo alelo *v3DL1*1A(741G>A-ex5)* foi identificado apenas na população africana. A variante *v3DS1*1E(*S14 - recEx3)* é exclusiva da população curitibana, e foi identificada em dois indivíduos de ancestralidade predominantemente européia. As variantes *v3DS1*1C(857C>T-ex5)*, *v3DL1*1F(202A>G - ex3)* e *v3DL1*1G(702C>T - ex5)* são exclusivas da população Guarani Nandeva. Dentre os alelos já descritos alguns também ocorrem em todas as populações, enquanto outros ocorrem apenas em algumas ou são exclusivos, como o alelo *3DL1*008*, encontrado apenas na população GKW e o alelo **022* (ou **034*), identificado apenas na população africana.

As semelhanças e diferenças na diversidade e distribuição dos alelos *KIR3DL1/3DS1*, observadas entre as populações deste estudo, refletem, em parte, as relações entre essas populações. O estudo de mais indivíduos é necessário para se compreender a real diversidade desse gene nas populações investigadas. Em nenhuma das populações estudadas há indícios de seleção direcional a favor de algum alelo *KIR3DL1/3DS1*.

Palavras-chave: Células *NK*. Genes *KIR*. *KIR3DL1*. *KIR3DS1*. Genética de Populações. Ameríndios.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CÉLULAS NK ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES DA SUA SUPERFÍCIE CELULAR E OS LIGANTES NAS CÉLULAS ALVO.	15
FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DOS GENES DOS RECEPTORES DAS CÉLULAS <i>NK</i> PERTENCENTES AOS COMPLEXOS LRC E NKC.	16
FIGURA 3 - RECEPTORES ATIVADORES (A) E RECEPTORES INIBIDORES (B) DAS CÉLULAS NK E SEUS LIGANTES CONHECIDOS.	17
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO DOS GENES <i>KIR</i>	18
FIGURA 5 - ESTRUTURA DOS RECEPTORES <i>KIR</i>	19
FIGURA 6 - MODELO ESQUEMÁTICO DOS GENES <i>KIR</i>	20
FIGURA 7 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ALELO <i>KIR3DL1*015</i> MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DAS POSIÇÕES QUE ESTÃO SOB AÇÃO DE SELEÇÃO POSITIVA NOS TRÊS DOMÍNIOS EXTRACELULARES (D0, D1 E D2) DOS RECEPTORES <i>KIR3DL1/3DS1</i>	30
FIGURA 8 - FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGUÍSTICO MACRO-JÊ.	35
FIGURA 9 - FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGUÍSTICO TUPI.	36
FIGURA 10 - MAPA DA AMÉRICA DO SUL.	41
FIGURA 11 - MAPA DO CONTINENTE AFRICANO.	42
FIGURA 12 - FRAGMENTOS DO GENE <i>KIR3DL1/3DS1</i> ANALISADOS NESTE ESTUDO.	46
FIGURA 13 - REGIÕES VARIÁVEIS DOS EXON 3 (D0), 4(D1) E 5(D2) ENTRE OS ALELOS CONHECIDOS DO GENE <i>KIR3DL1/3DS1</i>	50
FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS MOSTRANDO AS SEQUÊNCIAS IDENTIFICADAS PARA OS NOVOS ALELOS.	51
FIGURA 15 - DENDROGRAMA QUE MOSTRA A RELAÇÃO DOS ALELOS DESCRITOS NESTE ESTUDO COM OS ALELOS JÁ CONHECIDOS DO GENE <i>KIR3DL1/3DS1</i>	53

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS DO GENE <i>KIR3DL1</i> E <i>KIR3DS1</i> NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS	28
TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	44
TABELA 3 - FREQUÊNCIAS, EM NÚMEROS ABSOLUTOS, DOS ALELOS ENCONTRADOS NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.....	54
TABELA 4 - NÚMERO DE DIFERENTES ALELOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS EM CADA POPULAÇÃO.....	56
TABELA 5 - HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.....	56
TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS DOS ALELOS ATIVADORES E INIBIDORES NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.....	57
TABELA 7 - VALORES DE F_{ST} PARA OS PARES DE POPULAÇÕES ANALISADAS.....	58
TABELA 8 - VALORES PARA O TESTE DE NEUTRALIDADE SELETIVA (<i>TAJIMA'S D</i>) NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.....	58
TABELA 9 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, EM NÚMEROS ABSOLUTOS, DE HLA COM EPÍTOPO BW4/6	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CÉLULAS <i>NK</i>	13
2.1.1 Receptores das células <i>NK</i>	15
2.1.1.1 Imunogenética dos receptores <i>KIR</i>	20
2.1.1.2 Aspectos evolutivos dos genes <i>KIR</i>	23
2.1.1.3 <i>KIR3DL1</i> e <i>KIR3DS1</i>	26
2.2 POPULAÇÕES AMERÍNDIAS	32
2.2.1 As populações indígenas Kaingang e Guarani	34
2.3 POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	37
3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	40
4.2 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	43
4.3 ANÁLISES	48
5 RESULTADOS	49
5.1 DIVERSIDADE ALÉLICA E GENOTÍPICA.....	49
6 DISCUSSÃO	59
6.1 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALELOS.....	59
6.2 DIVERSIDADE DOS ALELOS <i>KIR3DL1/3DS1</i>	61
6.3 LIGANTES <i>HLA-Bw4</i>	64
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

As populações podem diferir quanto às frequências alélicas, e alelos muito comuns em um grupo podem ser raros ou mesmo ausentes em outro, especialmente quando as populações analisadas são relativamente isoladas. O estudo da diversidade genética em populações auxilia o entendimento da evolução humana, da origem e história demográfica das populações, da ação de fatores evolutivos em sequências genômicas e da base genética de doenças.

A identificação de genes cujas frequências alélicas diferem entre populações permite que os alelos destes genes sejam usados como marcadores de ancestralidade. Desse modo, o estudo do maior número possível de genes pode ser extremamente útil na reconstrução da história evolutiva dos grupos humanos.

A população brasileira é de origem bastante heterogênea, formada pela miscigenação de europeus, africanos e ameríndios, embora, mais recentemente, imigrações asiáticas também tenham passado a contribuir na miscigenação 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 historicamente entre 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, bem como de outras populações, podem contribuir significativamente para a elucidação da história das populações.

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo contra infecções e as células *NK* (*Natural Killer*) são uma importante sub-população de linfócitos atuantes nesta fase da resposta imunológica. A ação das células *NK* se dá através de receptores de membrana, entre os quais estão os receptores KIR (*Killer Cell Immunoglobulin like-receptors*), que reconhecem moléculas próprias (JANEWAY et al., 2002). Os receptores KIR são codificados por uma família de genes polimórficos, entre os quais está o gene *KIR3DL1/3DS1*, que possui grande importância na regulação da atividade das células *NK*. A caracterização de

populações para genes que codificam moléculas importantes durante as respostas imunes tem a aplicação adicional de servir como referência para estudos de associação a doenças, pois estes genes podem ter um papel importante na patogênese e seus polimorfismos podem estar associados à maior ou menor susceptibilidade ao desenvolvimento destas doenças (PETZL-ERLER, 1999).

Neste trabalho, a diversidade alélica do gene *KIR3DL1/3DS1* foi investigada nas populações ameríndias Guarani e Kaingang, na população curitibana, de origem predominantemente européia e africana, em uma população oriental e em uma população africana, com o intuito de entendermos um pouco mais acerca das relações evolutivas entre as diferentes populações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULAS *NK*

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra infecções. A resposta inflamatória resultante da invasão do organismo por algum patógeno recruta moléculas e células efetoras do sistema imune inato que combatem a propagação do patógeno. Somente quando essa barreira é vencida a doença infecciosa instala-se e a uma resposta imune adaptativa é desencadeada. Dentre as células efetoras do sistema imune inato são bem conhecidas as células *NK* (*natural killers* ou assassinas naturais). As células *NK* constituem uma importante população de linfócitos que atua no combate às células infectadas ou malignamente transformadas, representando cerca de 10% dos linfócitos circulantes e uma expressiva porcentagem dos linfócitos teciduais (BAXTER e SMYTH, 2002). Através da liberação de grânulos contendo granzimas e perforinas, as células *NK* possuem atividade citotóxica direta, induzindo a apoptose e a necrose das células alvo. Estas células também secretam citocinas, principalmente interferon γ (IFN- γ) e quimiocinas, que recrutam outras células de defesa do organismo para os sítios inflamatórios (Di SANTO, 2006; LENIER, 2005; VIVIER, NUNÈS e VÉLY, 2004; ROBERTSON, 2002).

Recentemente foi descoberto que as células *NK* também possuem um importante papel nas fases iniciais das respostas imune adaptativas (VIVIER, NUNÈS e VÉLY, 2004). A interação de receptores das células *NK* com moléculas da superfície das células dendríticas auxilia a maturação destas células, que por sua vez estão diretamente relacionadas à ativação dos linfócitos T e à diferenciação e proliferação dos linfócitos B. A produção de IFN- γ e de outras citocinas pelas células *NK* também atua na diferenciação dos linfócitos T em células efetoras (Di SANTO, 2006; ROBERTSON, 2002).

Além de atuarem na primeira linha de defesa contra tumores e infecções virais e na regulação da resposta imune adaptativa, as células *NK* também são

importantes durante a hematopoiese, a reprodução e as interações neuroendócrinas (BAXTER e SMYTH, 2002).

A regulação da atividade das células *NK* é essencial para a manutenção da tolerância aos antígenos próprios. Inúmeros estudos têm relacionado a atividade das células *NK* com o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Desde 1980 várias evidências sugerem a existência de associação entre a diminuição no número e na atividade das células *NK* e as doenças auto-imunes esclerose múltipla, diabetes tipo I e lúpus eritematoso sistêmico (BAXTER e SMYTH, 2002). O envolvimento das células *NK* na etiologia de outras doenças auto-imunes, particularmente da tireoidite, também tem sido proposto (BAXTER e SMYTH, 2002).

A regulação das células *NK* ocorre nas fases de desenvolvimento, diferenciação e ativação e envolve múltiplos mecanismos. Durante a ontogênese são selecionadas aquelas células capazes de reconhecer as moléculas *MHC* de classe I próprias. Embora este seja o principal mecanismo de regulação das células *NK*, nos tecidos periféricos os receptores ativadores e inibidores são bastante importantes para a regulação das *NK* (FIGURA 1). Nestes tecidos o delicado equilíbrio da atividade das células *NK* ocorre através da integração de inúmeros sinais produzidos pela ligação de moléculas sinalizadoras (por exemplo, IL-15, IL-2, IL-12 e INF- α/β) aos receptores ativadores e inibidores expressos na superfície das células *NK* (Di SANTO, 2006; BAXTER e SMYTH, 2002; ROBERTSON, 2002). A ativação ou inibição das células *NK* resulta do balanço entre os sinais ativadores e inibidores gerados a partir destes receptores (VIVIER, NUNÈS e VÉLY, 2004; JANEWAY et al., 2002).

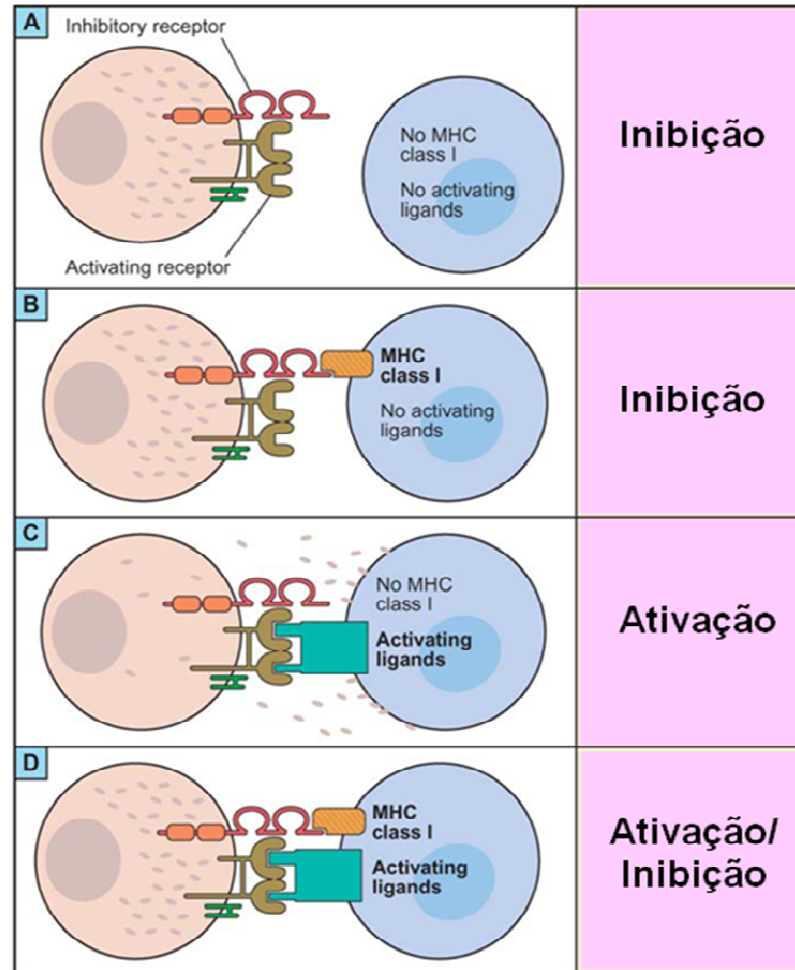


FIGURA 1 - REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CÉLULAS NK ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES DA SUA SUPERFÍCIE CELULAR E OS LIGANTES NAS CÉLULAS ALVO. **Fonte:** Di SANTO, 2006.

2.1.1 Receptores das células *NK*

Os genes que codificam os receptores das células *NK* estão agrupados principalmente em dois cromossomos distintos (FIGURA 2). No cromossomo 12 está localizado o complexo *NKC* (*Natural Killer Complex*), no qual são encontrados os genes que codificam receptores semelhantes à lectina *C*, como *CD94* e *NKG2* (BROWN et al., 2000). O outro complexo, conhecido como *Leukocyte Receptor Complex* (*LRC*), está localizado no cromossomo 19. Os genes do complexo *LRC*

codificam moléculas relacionadas à superfamília das imunoglobulinas, como os receptores *KIR* (MORETTA et al., 2000).

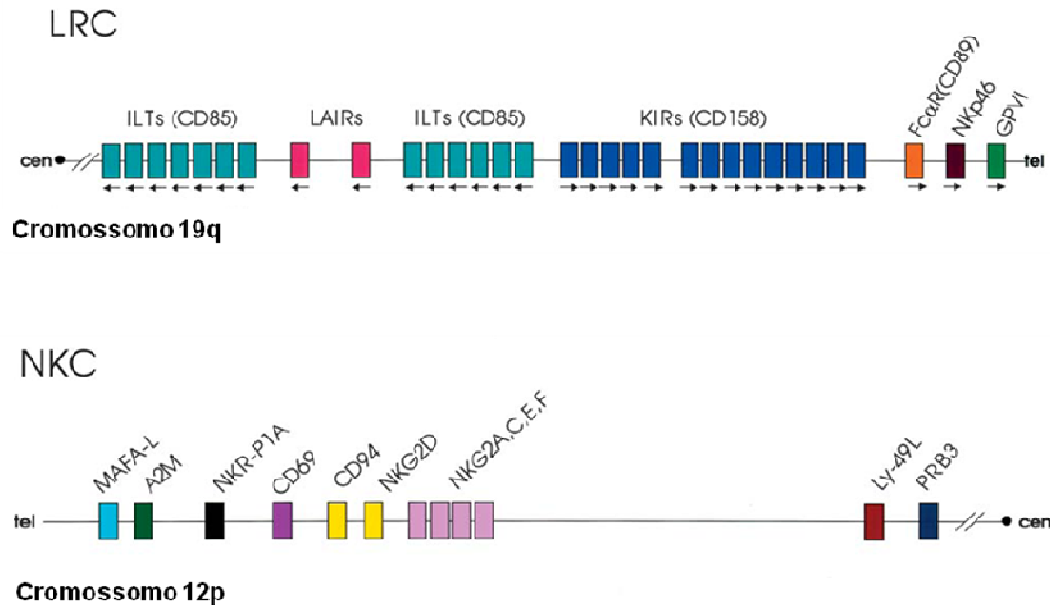


FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DOS GENES DOS RECEPTORES DAS CÉLULAS *NK* PERTENCENTES AOS COMPLEXOS LRC E NKC. **Fonte:** HSU et al., 2002.

Os receptores inibidores se ligam a moléculas *MHC* de classe I, enquanto os receptores ativadores ligam-se a moléculas alteradas e produtos microbianos expressos por diferentes células, principalmente pelas células hematopoiéticas, como as células dendríticas (*DC*) (FIGURA 3A e 3B). Porém alguns receptores ativadores também reconhecem moléculas *MHC* de classe I e moléculas relacionadas ao *MHC*. Cada célula *NK* expressa, aleatoriamente, um conjunto diferente de receptores ativadores e inibidores. Dessa forma, nem todas as células *NK* do organismo apresentam os mesmos receptores em sua membrana, podendo cada clone ser mais ou menos reativo a determinados patógenos ou células neoplásicas.

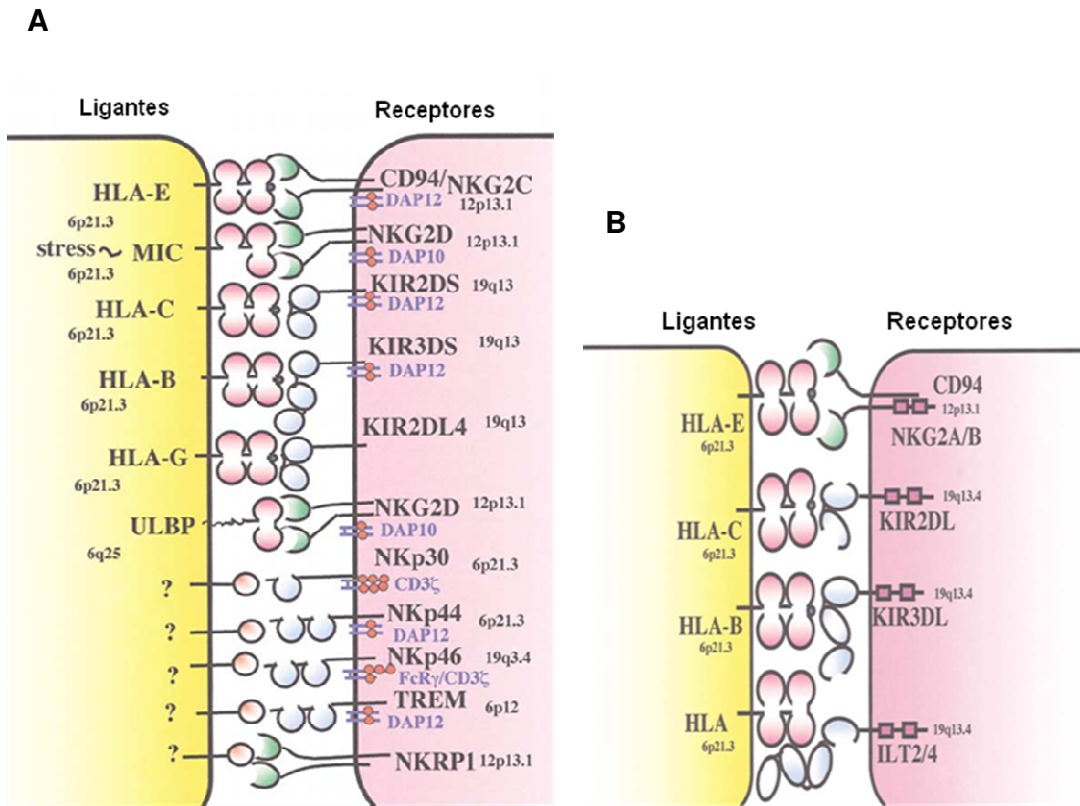


FIGURA 3 - RECEPTORES ATIVADORES (A) E RECEPTORES INIBIDORES (B) DAS CÉLULAS NK E SEUS LIGANTES CONHECIDOS. **Fonte:** TROWSDALE, 2001.

Dentre os receptores que participam da regulação das células NK estão os receptores KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), expressos na superfície destas células e também em algumas subpopulações de linfócitos T. Estes receptores pertencem à superfamília das imunoglobulinas e são codificados por uma família de genes polimórficos localizados no cromossomo 19 (19 q13.4), no complexo *LRC* (FIGURA 4). São conhecidos 14 genes *KIR* e 2 pseudogenes, dispostos em *tandem* em um segmento de aproximadamente 150 kb de DNA.

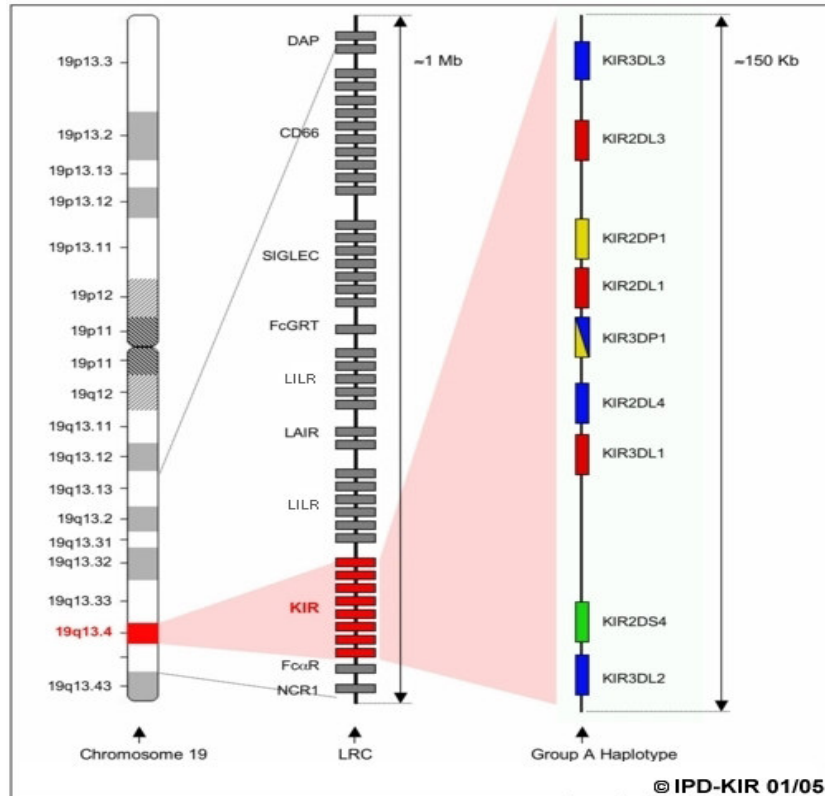


FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO DOS GENES *KIR*. Os genes *KIR* distribuem-se por cerca de 150 kb de DNA e estão localizados no braço curto do cromossomo 19 (região 19q13.4).
Fonte: IPD-KIR Database. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>>.
 Acesso em: 30/07/2008.

A nomenclatura dos genes *KIR* é baseada na estrutura molecular de seus produtos. São denominados 2D os genes que codificam proteínas com dois domínios extracelulares e 3D os genes que codificam proteínas com três domínios. As letras L e S (do inglês *Long* e *Short*) referem-se ao tamanho da cauda citoplasmática, longa ou curta, respectivamente (PARHAM, 2005a) (FIGURA 5). Os receptores de cauda citoplasmática longa possuem motivos *ITIM* (imunoreceptor inibidor baseado em tirosina) e atuam como inibidores. Por outro lado, os receptores de cauda citoplasmática curta possuem motivos *ITAM* (imunoreceptor ativador baseado em tirosina) e estão associados à molécula sinalizadora DAP12, atuando como ativadores das células *NK* (SALTER et al., 1997; WILSON et al., 2000). O gene *KIR2DL4* é uma exceção, pois atua ora na transdução de sinais ativadores ora na transdução de sinais inibidores (BIASSONI et al., 2003).

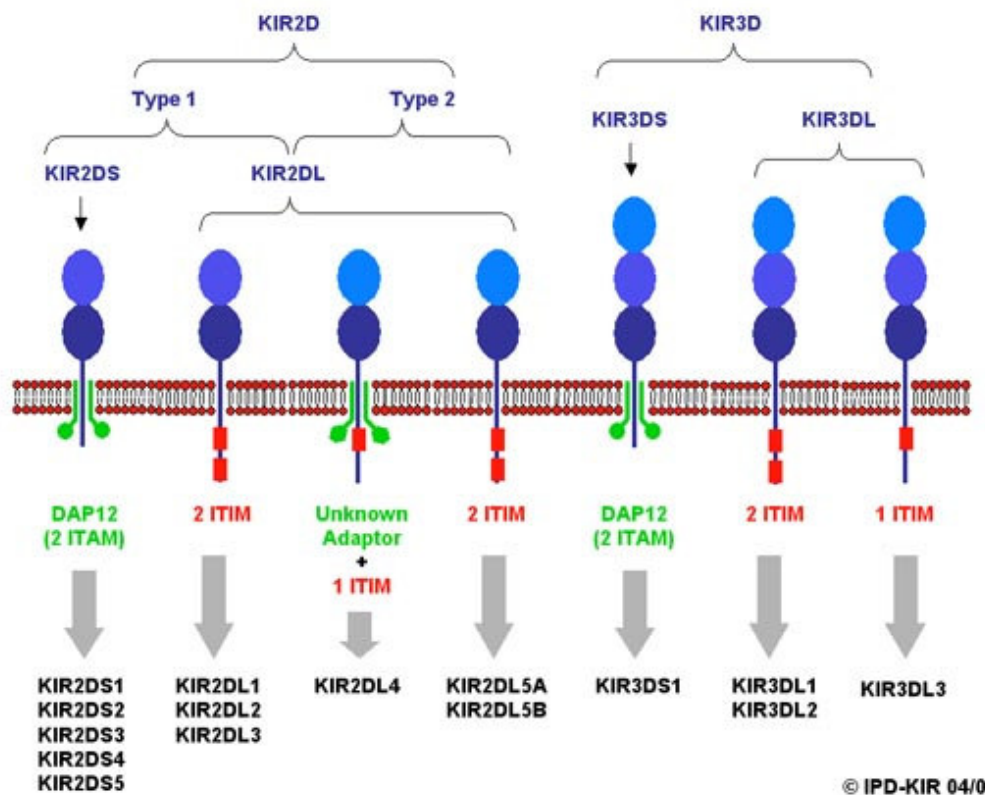


FIGURA 5 - ESTRUTURA DOS RECEPTORES KIR. Em azul são mostrados os domínios extracelulares e em vermelho os motivos *ITIM*. Em verde são mostradas as moléculas adaptadoras DAP12. **Fonte:** IPD-KIR Database. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>>. Acesso em: 30/07/2008.

Os genes *KIR* estendem-se por segmentos que variam entre 14 e 16kb de DNA e estão organizados em nove exons (FIGURA 6), que codificam os diferentes domínios funcionais da proteína. Os exons um e dois codificam o peptídeo sinal, enquanto que os exons três, quatro e cinco codificam os três domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, D0, D1 e D2, respectivamente, que são responsáveis pelo reconhecimento dos ligantes. O exon seis codifica o segmento que une D2 a região transmembrana, que por sua vez é codificada pelo exon sete. Os exons oito e nove codificam o domínio citoplasmático da molécula, que é responsável pela transdução de sinais intracelulares. Os receptores com dois domínios extracelulares são codificados por genes que possuem uma região conhecida como “pseudoexon três”, que é excisada durante a maturação do RNA mensageiro (VILCHES e PARHAM, 2002).

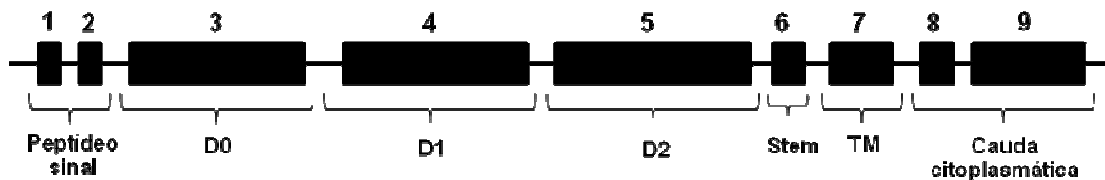


FIGURA 6 - MODELO ESQUEMÁTICO DOS GENES *KIR*. São mostrados os exons (1-9) e os domínios da proteína que são codificados por cada exon.

Os receptores KIR representam um importante repertório para as células *NK* e, embora sejam conhecidos tanto receptores KIR ativadores como inibidores, a função inibidora parece ser preponderante para regulação das células *NK*. Estes receptores ligam principalmente moléculas *MHC* de classe I, porém para muitos genes *KIR* ainda não se conhecem os ligantes. Embora os genes *KIR* e os genes que codificam as moléculas *MHC* de classe I (*HLA* de classe I em humanos) segreguem independentemente, a estreita relação funcional entre estes genes sugere que a expressão de ambos esteja inter-relacionada. A interação KIR:HLA é fundamental na seleção clonal das células *NK*.

A diversidade de receptores KIR expressos pelas células *NK* é dada pelas diferentes combinações dos genes *KIR* nos haplótipos, pelos polimorfismos presentes nos genes e por mecanismos epigenéticos, como a metilação e a condensação da cromatina, e por características da região promotora destes genes, onde se ligam diferentes fatores de transcrição (THOMAS et al., 2008). A expressão de *KIR* na superfície das células *NK* também parece ser influenciada pelo genótipo *HLA* (GARDNER, 2007).

2.1.1.1 Imunogenética dos receptores KIR

Os genes *KIR* constituem um importante componente na regulação das células *NK* possibilitando a tolerância aos constituintes próprios do organismo e a ativação dos mecanismos de defesa contra a invasão do organismo por patógenos

ou o surgimento de células neoplásicas (HSU et al., 2002). Os diferentes genes *KIR* atuam epistaticamente, de modo que cada célula pode expressar um conjunto diferente de receptores que possuem funções correspondentes (SINGLE et al., 2007).

Os haplótipos formados pelos genes *KIR* são agrupados em dois haplogrupos (haplogrupo A e haplogrupo B). O haplogrupo A é representado por um único haplótipo, o haplótipo A, que contém sete genes dos quais apenas *KIR2DS4* funciona como ativador. Este gene possui um alelo não funcional que ocorre em frequências elevadas em todas as populações estudadas. O haplogrupo B é formado por um grande número de haplótipos, contendo um número variável de genes, entre os quais estão presentes outros genes *KIR* ativadores, além de *KIR2DS4* (PARHAM et al., 2005b). Com exceção de *KIR2DL4*, que é expresso por todas as *NK*, os demais genes *KIR* são expressos em diferentes combinações pelas *NK*. Essa expressão diferencial entre as células *NK* de um mesmo indivíduo ocorre pela ação de mecanismos epigenéticos que regulam a expressão dos diferentes genes *KIR* (GARDNER, 2007).

Os receptores *KIR* inibidores reconhecem moléculas *MHC* de classe I, expressas pelas células normais, enquanto que para a maioria dos receptores ativadores não se conhecem os ligantes, embora alguns deles também se liguem a moléculas do *MHC*. Na presença de sinais ativadores e inibidores a influência inibidora é predominante e a célula *NK* se encontra inativa, impedindo assim a morte de células normais. A transformação maligna das células ou a infecção por microrganismos patogênicos pode levar à expressão alterada das moléculas *MHC* de classe I, de modo que o sinal inibidor é perdido e as células *NK* são ativadas (JANEWAY et al., 2002). Esse modelo é conhecido como “*missing-self*” (falta do próprio), pois as células assassinas naturais agem quando não encontram as moléculas que conferem a identidade da célula própria, ao contrário dos linfócitos T que geralmente agem pelo reconhecimento de moléculas alteradas (“*altered-self*”) (KÄRRE, 2002).

Os receptores *KIR* ativadores possuem em seu domínio citoplasmático de um a três motivos *ITAM* (imunoreceptor ativador baseado em tirosina) e geralmente estão associados às moléculas DAP10 ou DAP12, produzindo citocinas, como

interferons e TNF (fator de necrose tumoral), entre outras, permitindo a completa ativação e diferenciação das células *NK*. Ao contrário, os receptores inibidores estão associados a motivos *ITIM* (imunoreceptor inibidor baseado em tirosina), que recrutam as proteínas SHP1 e SHP2 (tirosina-fosfatases) e atuam bloqueando os sinais ativadores das células *NK* (SALTER et al., 1997; WILSON et al., 2000; BAXTER e SMYTH, 2002; VIVIER, NUNÈS e VÉLY, 2004;).

Embora seja considerável a importância da ativação das células *NK* para a imunidade inata, os receptores inibidores são fundamentais para o controle da ativação das células *NK* e para a manutenção da tolerância periférica. O elevado grau de polimorfismo tanto nos genes *KIR* quanto nos ligantes *HLA* e a segregação independente destes genes permite considerar que certas combinações *HLA* e *KIR* representam um fator de risco relevante na patogênese de algumas doenças. Vários estudos recentes correlacionaram a incidência e progressão de diversas doenças com a expressão de alguns genes *KIR* em particular, entre as quais doenças infecciosas, doenças auto-imunes, doenças relacionadas à reprodução e o câncer. As diferentes combinações *KIR:HLA* também desempenham um importante papel na resposta de indivíduos transplantados com medula óssea (PARHAM, 2004; KELLEY e TROWSDALE, 2005). A variação do conteúdo gênico e a diversidade alélica dos genes *KIR* podem afetar a função e o nível de especificidade e sensibilidade das células *NK*.

Muitos pesquisadores investigaram a relação entre determinadas doenças e os receptores das células *NK*, particularmente dos receptores *KIR* e seus ligantes conhecidos. Estudos mostram que os genes *KIR2DS1* e *2DS2* estão associados a uma maior susceptibilidade à artrite psoriática caso haja ausência de ligantes *HLA-C* para os receptores inibidores *KIR2DL1* e/ou *2DL2/3* (MARTIN et al., 2002). A presença dos genes *KIR2DS1*, em conjunto com a ausência dos ligantes dos genes *KIR2DL2* e *2DL3*, está associada a uma pior recuperação de pacientes com leucemia mielóide após transplante de medula óssea (COOK et al., 2004). O diabetes tipo 1 foi associado ao aumento no número de genes *KIR* ativadores nos haplótipos em conjunto com a combinação de *KIR2DS2* e a presença de *HLA-C* com asparagina 80 (van der SLIK et al., 2003). De forma semelhante, a combinação entre *KIR2DS2* e *HLA-C* com asparagina na posição 80 está associada à vasculite reumatóide, que ocorre como complicação da artrite reumatóide (YEN et al., 2001).

Outros estudos revelam a importância da interação de determinados receptores KIR e seus ligantes no combate a doenças infecciosas. Indivíduos homocigotos para a presença de *KIR2DL3* e HLA-C1 possuem uma marcante vantagem no combate ao vírus da hepatite C, em relação aos demais (KHAKOO et al. 2004). Além disso, nas infecções com o vírus HIV, a progressão da infecção é menor nos pacientes que possuem o receptor KIR3DS1 e um ligante HLA com epítipo *Bw4* que contenha isoleucina na posição 80 (MARTIN et al., 2007). Estudos que relacionam genes *KIR* com doenças reprodutivas revelam que mulheres homocigotas para o haplogrupo A, cujos fetos sejam homocigotos para o grupo HLA- C2, apresentam maior risco no desenvolvimento da pré-eclampsia (HIBY et al., 2004).

No entanto, é importante salientar que essas associações de doenças a determinados genes *KIR* podem ser decorrentes de desequilíbrio de ligação com outros locos. Dessa forma, ainda permanecem desconhecidos os reais motivos que levam células *NK*, responsáveis pela defesa inata do organismo, a estarem associadas às doenças auto-imunes.

2.1.1.2 Aspectos evolutivos dos genes *KIR*

Os genes *KIR* são exclusivos de poucos grupos de mamíferos e a sua grande diversidade, tanto inter quanto intraespecífica, permite sugerir que estes genes evoluíram rapidamente (MORETTA e MORETTA, 2004). Estes genes possuem grande similaridade na sua sequência de nucleotídeos (85-99%), de modo que eles provavelmente surgiram por repetidos eventos de duplicação e recombinação não homóloga (SCHILLING et al., 1998). Mutações também desempenharam um importante papel na diversificação dos genes *KIR*.

Estudos com primatas revelam que os genes *KIR* evoluíram rapidamente após a divergência entre os primatas e outras ordens de mamíferos. A evolução destes genes ocorreu de modo espécie-específico, ou seja, os genes *KIR* e seus alelos diferem de uma espécie para outra. Comparações entre as sequências dos genes *KIR* em diferentes espécies de primatas demonstram as extensas alterações

sofridas por estes genes, o que condiz com a sua ampla diversidade alélica e genotípica, características das diferentes espécies. Além disso, diferenças nas frequências dos genes *KIR* em populações próximas também são evidências da rápida evolução destes genes (SINGLE et al., 2007). Por meio de seleção balanceadora a diversidade destes genes foi mantida durante a sua história evolutiva (SALTER et al., 1997).

Apesar da grande similaridade, os genes *KIR* e seus alelos codificam proteínas que diferem quanto a ligação às moléculas MHC, a expressão na superfície celular, sinalização intracelular e conformação da proteína. Além disso, a diversidade na sequência de nucleotídeos da região reguladora influencia o nível de transcrição de alguns genes *KIR* e seus alelos (BASHIROVA et al., 2006).

O papel central atribuído à interação KIR:HLA na modulação da resposta imune sugere que estes locos evoluíram conjuntamente mantendo interações funcionais apropriadas, de modo que algumas moléculas codificadas por determinados alelos *KIR* possuem maior ou menor afinidade às diferentes moléculas HLA (KHAKOO et al., 2002). A análise das sequências dos diferentes genes *KIR* indica que as principais alterações ocorreram nos sítios de ligação das moléculas MHC, como resultado da ação de diferentes fatores evolutivos (HSU et al., 2002; MARTINEZ-BORRA e KHAKOO, 2008). Essas alterações influenciam a ligação KIR:HLA e podem estar sob ação de seleção natural, implicando na diversificação dos genes *KIR*.

Os genes do sistema *HLA* são uma das famílias mais polimórficas do genoma humano e sua diversidade foi mantida nas populações humanas por meio de seleção balanceadora, embora inúmeros eventos de seleção purificadora tenham ocorrido durante a evolução destes genes. Os eventos de seleção positiva sobre os genes *HLA*, favorecendo alelos vantajosos na defesa do organismo contra determinadas doenças, desempenharam um importante papel na evolução e diversificação dos genes *KIR* (GENDZEKHADZE et al., 2006; DENIS et al., 2005). A evolução dos genes *KIR* ocorreu, portanto, indiretamente, através da forte pressão seletiva sobre as moléculas *MHC* de classe I, mas também, diretamente, por meio da interação com diferentes patógenos (MARTINEZ-BORRA e KHAKOO, 2008).

A idéia de co-evolução entre *HLA* e *KIR* é sustentada por estudos que correlacionam genótipos destes genes com doenças, bem como por estudos de genética comparativa entre diferentes espécies de primatas. Vários trabalhos descrevem a existência de co-evolução tanto alélica quanto genotípica e haplotípica entre *HLA* e *KIR* (NORMAN et al. 2007; SINGLE et al. 2007; MARTIN et al. 2007; THANANSHAI et al. 2007; CARR, PANDO e PARHAM, 2005; HALFPENNY et al., 2004). Em alguns casos é evidente a ação da seleção direcional atuando a favor de determinados haplótipos, genótipos ou alelos (NORMAN et al. 2007; YAWATA et al. 2006). Single e colaboradores (2007), analisando a diversidade global dos genes *KIR* e *HLA*, observaram uma clara correlação negativa entre os *KIR* ativadores e seus ligantes. Porém, na maioria das populações estudadas, os genes *KIR* estão sob ação da seleção balanceadora e a sua diversidade é mantida (PARHAM 2005b; SINGLE et al. 2007; NORMAN et al. 2007; YAWATA et al. 2006; TONEVA et al., 2001; RAJALINGAM et al., 2008).

Durante a evolução dos genes *KIR*, repetidos eventos de duplicação seguidos de recombinação deram origem aos diferentes genes conhecidos atualmente. A relativa proximidade destes genes no cromossomo, bem como a grande semelhança nas sequências intergênicas são responsáveis por recombinações não homólogas que dão origem aos diferentes haplótipos com um número variado de genes *KIR* (GARDINER et al., 2001; HAO e NEI, 2005). A diversidade dos genes *KIR* resulta das diferentes combinações dos genes nos haplótipos, bem como do elevado grau de polimorfismos presente nestes genes. A diversidade alélica de *KIR*, assim como de outros genes, é gerada por mutações de ponto, por eventos de conversão gênica e por recombinação homóloga, porém a contribuição relativa de cada um destes mecanismos varia de um gene para outro (THOMAS et al., 2008). Embora o polimorfismo alélico tenha sido descrito para todos os genes *KIR* ele parece ser muito mais intenso para os genes *KIR3DL1* e *KIR3DL2* (GARDNER et al., 2001; VILCHES e PARHAM, 2002).

As frequências, tanto alélicas como genotípicas e haplotípicas, dos genes *KIR* podem variar enormemente entre populações como resultado de diferentes pressões seletivas, bem como pela ação da deriva genética, do efeito fundador e do fluxo gênico (RAJALINGAM et al., 2008; KULKARNI et al. 2008). A variação nas frequências dos alelos para muitos dos genes *KIR*, entre diferentes populações,

permite que esses genes sejam utilizados como marcadores de ancestralidade, evidenciando a história evolutiva da espécie humana (GARDNER, 2007; DENIS et al., 2005). Populações com histórias biológicas distintas podem mostrar diferenças nas frequências dos genes *KIR* devido a diferentes fatores evolutivos endógenos e exógenos aos quais estão submetidas.

A análise da diversidade global dos genes *KIR* revela diferenças entre populações com diferentes ancestralidades (TONEVA et al., 2001; YAWATA et al., 2006; GENDZEKHADZE et al., 2006; FLORES et al., 2007; RAJALINGAM et al., 2008; KULKARNI et al. 2008). Estas diferenças são menos intensas entre populações geograficamente próximas, o que está diretamente relacionado com a história evolutiva das populações. As frequências dos haplogrupos A e B permitem agrupar as populações humanas em três grandes grupos, de acordo com a diversidade destes haplogrupos: 1) A população europeia e africana, onde os haplogrupos A e B são igualmente distribuídos; 2) A população asiática, onde o haplogrupo A é predominante e; 3) As populações nativas da Austrália e da América, onde o haplogrupo B predomina. Essas diferenças podem ser resultado de pressões evolutivas atuando sobre as diferentes populações provavelmente devido a mudanças ambientais que ocorreram durante as migrações pré-históricas. De modo interessante, essas diferenças interpopulacionais, que mostram um significativo aumento na frequência dos haplótipos pertencentes ao haplogrupo B em populações ameríndias, nos permitem sugerir que estas populações adquiriram diferentes genes *KIR* ativadores durante sua história evolutiva. A ativação das células *NK* é fundamental no combate a infecções e neoplasias, além de ter um importante papel nas fases iniciais da resposta imune adaptativa e na reprodução.

2.1.1.3 *KIR3DL1* e *KIR3DS1*

Os genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1* aparentemente ocupam a mesma região genômica em diferentes haplótipos (WILSON et al., 2000) e estudos de segregação indicam que eles são alelos do mesmo loco (GARDINER et al., 2001). Estes genes

apresentam 97% de similaridade na sua sequência de nucleotídeos. Entretanto, já foram descritos haplótipos raros em que ocorre a presença ou ausência de ambos os genes (GARDINER et al., 2001). Curiosamente, em sul-asiáticos, estes haplótipos representam 10% dos haplótipos KIR, tendo surgido possivelmente por permuta desigual (GARDINER et al., 2001 e CRUM et al., 2000; NORMAN et al., 2002). O gene *KIR3DS1* surgiu provavelmente por duplicação seguida de deleção do gene *KIR3DL1* (GARDINER et al., 2001) e, ao contrário de *KIR3DL1*, para *KIR3DS1* são conhecidos poucos alelos em todas as populações estudadas, embora apresente uma frequência elevada. A ação de seleção purificadora sobre *KIR3DS1* pode explicar por que este gene é pouco variável, mesmo tendo surgido a milhares de anos. Neste trabalho estes genes são tratados como alelos do mesmo loco e serão denominados *KIR3DL1/3DS1*.

A evolução dos genes *KIR* em humanos a partir da divergência entre os chimpanzés e o homem ocorreu de forma acelerada. O gene *KIR3DL1/3DS1* evoluiu a partir de três linhagens ancestrais distintas que permanecem bem representadas em todas as populações por mais de três milhões de anos. Estas linhagens são caracterizadas pelos alelos *KIR3DL1*005*, *KIR3DL1*01502* e *KIR3DS1*013*. Em todas as populações estes três alelos são os mais comuns e representam aproximadamente 50% de todos os alelos conhecidos, estando, claramente, ambas as linhagens sob ação de seleção balanceadora (NORMAN et al. 2007). A população africana representa uma exceção e nesta população existem evidências de seleção direcional a favor da linhagem *KIR3DL1*01502*, que apresenta uma frequência significativamente maior que as demais linhagens. Durante a evolução deste gene outras linhagens surgiram por recombinação das linhagens ancestrais (NORMAN et al. 2007).

A inibição das células *NK* é fundamental para a manutenção da tolerância ao próprio. Assim, os genes *KIR* que codificam receptores inibidores estão virtualmente presentes em todos os indivíduos. Por outro lado, são conhecidos vários haplótipos que não possuem genes ativadores. Dentre os genes que codificam receptores KIR inibidores, o gene *KIR3DL1* possui grande importância na modulação da ativação das células *NK* e sua frequência é elevada em todas as populações estudadas (SINGLE et al. 2007). O receptor ativador 3DS1 também possui frequências

elevadas e sua importância na ativação das células NK no combate a infecções já foi verificada em estudos anteriores (p. e. MARTIN et al., 2007)

Nas populações investigadas neste trabalho as frequências do gene *KIR3DL1/3DS1* foram determinadas em estudos anteriores do nosso grupo e são mostradas na tabela 1. Nestes mesmos estudos, através da comparação entre as frequências dos genes *KIR* e dos ligantes HLA, nenhuma correlação entre essas frequências foi encontrada (AUGUSTO, 2008). Embora não tenham sido encontradas evidências de co-evolução entre os locos *KIR* e *HLA*, como indicativo de seleção natural, todos os indivíduos analisados possuem pelo menos um ligante KIR funcional.

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR3DL1* E *KIR3DS1* NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS NESTE TRABALHO.

	CTBA	ORI	GRC	GND	GKW	KRC	KIV
<i>KIR3DL1</i>	93%	23%	69%	86%	81%	80%	78%
<i>KIR3DS1</i>	35%	43%	82%	56%	71%	66%	56%

CTBA - Curitiba; ORI - Oriental; GND - Guarani Nandeva; GKW - Guarani Kaiowá; GRC - Guarani M'byá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras; KIV - Kaingang de Ivaí.

As frequências dos genes *HLA* e *KIR* variam de uma população para outra e a importância da interação KIR:HLA na modulação da atividade das células NK sugere que estes locos podem ter evoluído conjuntamente. Vários estudos evidenciaram a existência de co-evolução entre alelos de *KIR3DL1/3DS1* e *HLA-A/B* (NORMAN et al. 2007; MARTIN et al. 2007; THANANSHAI et al. 2007; CARR, PANDO e PARHAM, 2005; THOMAS et al., 2008). A expressão dos alelos *KIR3DL1/3DS1* na superfície das células NK é determinada por polimorfismos presentes ao longo da sequência de nucleotídeos e por diferenças na região promotora dos diferentes alelos.

KIR3DL1/3DS1 é um gene bastante polimórfico cujo produto se liga a moléculas HLA com epítipo *Bw4* (HLA-A e HLA-B), que exibem grande diversidade. Os alelos *KIR3DS1* ligam-se exclusivamente a moléculas HLA-Bw4 com isoleucina na posição 80. São conhecidos 57 alelos para o gene *KIR3DL1/3DS1*, cujas frequências variam entre as populações estudadas. O polimorfismo deste gene tem

uma importância funcional significativa na regulação das células *NK* (YAWATA et al., 2006). Variações na região transmembrana e nos três domínios extracelulares, principalmente, estão relacionadas com o nível de expressão dos diferentes alelos *KIR3DL1/3DS1* na superfície celular e com a afinidade pelo ligante HLA. Dessa forma, os diferentes alelos *KIR3DL1* possuem um potencial inibidor distinto. Os polimorfismos na região transmembrana e nos domínios extracelulares podem alterar o dobramento da proteína causando a sua retenção no interior das células, ou impedir o seu ancoramento na membrana celular, de modo que alguns alelos são superexpressos (por exemplo, *KIR3DL1*002*), enquanto outros são expressos em baixos níveis (por exemplo, *KIR3DL1*005*) ou mesmo não expressos (por exemplo, *KIR3DL1*004*). Polimorfismos na região promotora do gene *KIR3DL1/3DS1* também podem estar relacionados com o nível de expressão dos diferentes alelos na superfície das células (GARDINER et al., 2001). Além disso, as variações nos domínios extracelulares podem alterar a afinidade da interação com HLA (GARDINER et al., 2001; PANDO et al., 2003; O'CONNOR et al., 2007).

A diversidade alélica do gene *KIR3DL1/3DS1* é resultado, principalmente, de eventos de recombinação e de mutações de ponto que ocorreram durante a sua história evolutiva (SCHILLING et al., 1998; GARDINER et al., 2001). As mutações de ponto, embora tenham contribuído para a diversificação deste gene, são menos pronunciadas que a recombinação. Fatores evolutivos como a seleção e a deriva também são importantes para explicar a diversidade do gene *KIR3DL1/3DS1* (GARDINER et al., 2001). Comparações na sequência de aminoácidos entre diferentes indivíduos revelam a existência de 21 posições, distribuídas entre os três domínios extracelulares (D0, D1 e D2), que estão sob seleção positiva, sendo que algumas destas posições são variáveis, enquanto outras são conservadas de um indivíduo para outro (FIGURA 7). Muitas destas posições que possivelmente estão sob seleção positiva correspondem a resíduos que participam da interação com as moléculas HLA (NORMAN et al., 2007).

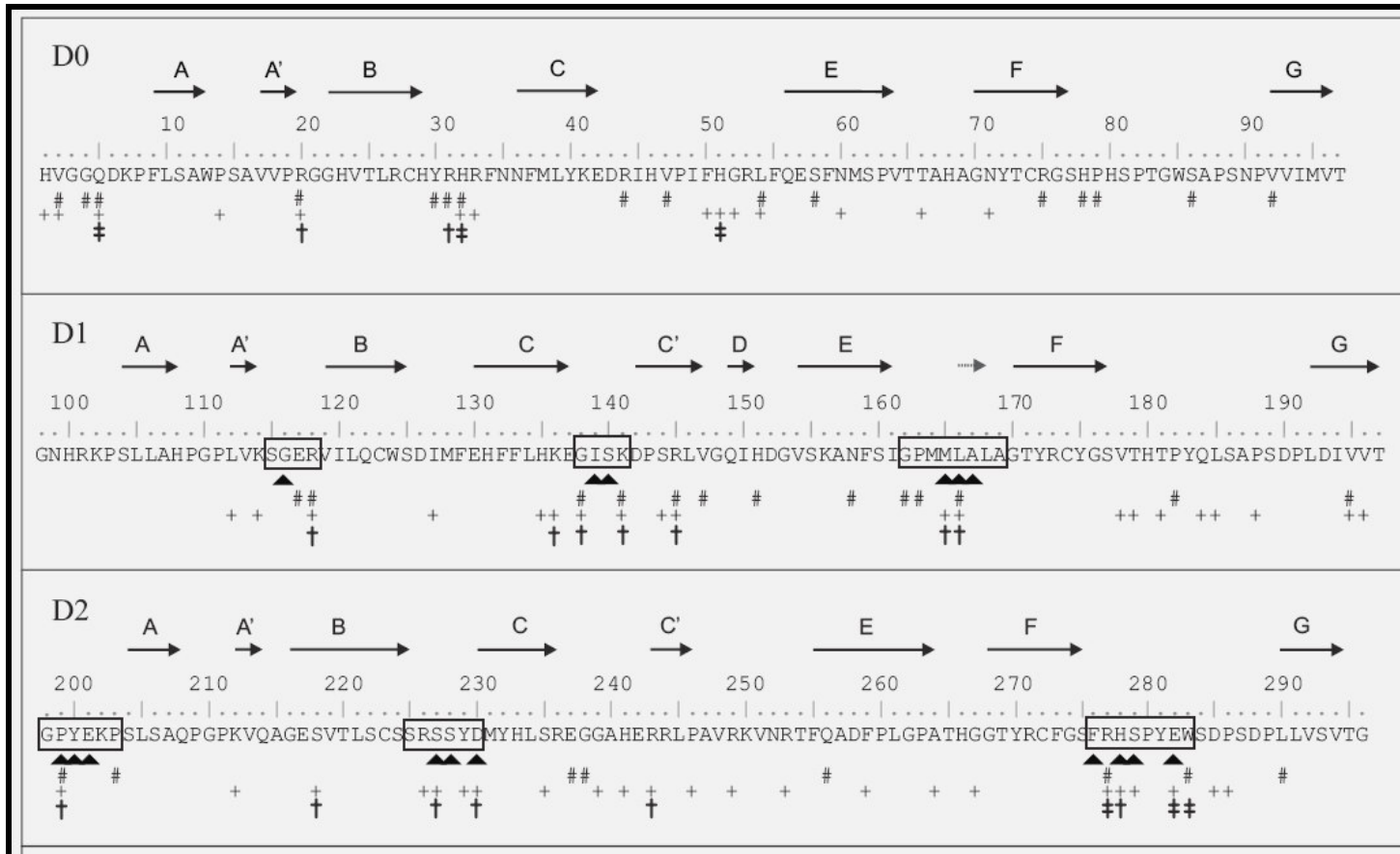


FIGURA 7 - SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ALELO *KIR3DL1*015* MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DAS POSIÇÕES QUE ESTÃO SOB SELEÇÃO POSITIVA NOS TRÊS DOMÍNIOS EXTRACELULARES (D0, D1 E D2) DOS RECEPTORES KIR3DL1/3DS1. Estas posições estão indicadas pelos símbolos \ddagger e \ddagger e os retângulos representam os sítios de contato com as moléculas HLA. **Fonte:** NORMAN et al., 2007.

Embora o domínio zero (D0) destes receptores não participe diretamente da interação KIR:HLA ele atua na modulação da interação entre D1/2 (domínios 1 e 2) com HLA. Variações em D0, principalmente nas posições 49 a 52 da sequência de aminoácidos, podem alterar a conformação dos domínios D1 e D2 influenciando na ligação com as moléculas HLA-Bw4 (KHAKOO et al., 2002; PANDO et al., 2003; NORMAN et al. 2007). A diversidade funcional dos alelos do gene *KIR3DL1/S1*, que é determinada principalmente pelos três domínios extracelulares, evoluiu sob ação de seleção balanceadora. Porém, na população africana, ao contrário das demais, os domínios D1 e D2 estão sob ação de seleção direcional a favor da linhagem *3DL1*015* e apenas para D0 existem evidências de seleção balanceadora (NORMAN et al. 2007).

As frequências alélicas de *KIR3DL1/3DS1* diferem de uma população para outra, sendo que um alelo que possui frequência elevada em determinada população pode estar em baixa frequência em outra população. Essas diferenças populacionais podem ocorrer devido à seleção natural tendo os diferentes alelos adquirido diferentes especificidades de interação com as moléculas HLA. Além disso, alguns alelos são exclusivos de determinadas populações. Gendzekhadze e colaboradores (2006) investigando a diversidade dos genes *KIR* em populações ameríndias da Venezuela identificaram a presença de cinco alelos *KIR3DL1* e dois alelos *KIR3DS1*. Estes alelos se distribuem uniformemente entre os haplótipos identificados nestas populações. Neste estudo, uma nova variante *KIR3DS1* foi identificada (*3DS1*047*). Essa variante é caracterizada por uma substituição não-sinônima de nucleotídeo no domínio extracelular D1 e parece ser exclusiva dos indígenas da tribo Warao.

Apesar de em alguns estudos a diversidade alélica de *KIR3DL1/3DS1* em populações humanas já ter sido investigada (por exemplo, GENDZEKHADZE et al., 2006; HALFPENNY et al., 2004; FLORES et al., 2007), a diversidade deste gene, bem como a implicação funcional desta diversidade, permanece desconhecida em muitas populações.

2.2 POPULAÇÕES AMERÍNDIAS

Ao contrário das populações urbanas, nas quais o fluxo gênico parece ter um papel preponderante, nas populações indígenas, que são populações pequenas e isoladas, a ação do efeito fundador e da deriva genética desempenha um importante papel na determinação da sua diversidade genética. Estudos genéticos de populações ameríndias, aliados a abordagens arqueológicas, paleontológicas e lingüísticas levaram à elaboração de hipóteses acerca do povoamento das Américas.

O continente americano foi um dos últimos locais a ser povoado pela espécie humana, e a hipótese mais aceita entre os cientistas é de que o homem veio da Sibéria para a América, durante a última glaciação, através do estreito de Bering. Análises do DNA mitocondrial, cromossomo Y e outras regiões polimórficas apóiam mais de uma hipótese, e ainda hoje não há um consenso sobre a data da primeira migração, número de migrações e rotas utilizadas.

Os resultados obtidos através do sequenciamento do genoma mitocondrial humano, 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 cinco mil anos na Beríngia, evidenciado por um pequeno efeito de gargalo de garrafa. A entrada no continente americano ocorreu há aproximadamente 18 a 19 mil anos, quando houve um grande aumento populacional (FAGUNDES, KANITZ e BONATTO, 2008; FAGUNDES et al., 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 restam apenas 230, totalizando cerca de 600 mil indivíduos (0,2% da população brasileira), falantes de mais de 180 línguas distintas. Dentre esses, 36 mil são Guarani e 28 mil são Kaingang. No Paraná existem aproximadamente nove mil indígenas distribuídos por 17 áreas, incluindo as etnias Kaingang, Guarani (Ñandeva e M'byá) e Xetá. Os 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. No Mato Grosso do Sul vivem nove etnias indígenas, dentre as quais Guarani Kaiowá e Ñandeva, totalizando aproximadamente 55 mil indivíduos (Instituto Socioambiental).

Vários estudos analisaram o polimorfismo dos genes *HLA*, outros genes do *MHC* e marcadores desta 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 (OLIVEIRA et al., 2008). Dentre as populações ameríndias foram encontrados alelos *HLA* exclusivos destas populações, que surgiram a partir dos alelos fundadores principalmente por eventos de conversão gênica (PARHAM et al., 1997).

Por se tratarem de genes importantes na regulação da atividade das células *NK*, os genes *KIR* podem estar sob ação de diferentes fatores evolutivos, sendo especialmente interessantes para os estudos de genética de populações. Alguns estudos que investigaram os haplótipos formados pelos diferentes genes *KIR* foram desenvolvidos em populações ameríndias, e, em comparação com os extensos trabalhos em populações urbanas, as populações ameríndias apresentam uma diversidade genética (combinações dos diferentes genes *KIR*) significativamente menor (FLORES et al., 2007; GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2006;

GENDZEKHADZE *et al.*, 2006). Estes mesmos estudos revelam que alguns haplótipos raros nas populações urbanas possuem uma frequência consideravelmente maior nas populações indígenas. Os efeitos demográficos parecem ser os principais agentes que contribuem para a ampla diversidade haplotípica dos genes *KIR* nas populações urbanas (FLORES *et al.*, 2007).

Nas populações ameríndias, onde o fluxo gênico é muito baixo, ou mesmo ausente, a pressão de seleção pode explicar porque a diversidade haplotípica de *KIR* é relativamente baixa nessas populações. Durante a história destas populações podem ter sido selecionados determinados haplótipos em detrimento de outros. Além disso, outros fatores estocásticos como o efeito fundador e a deriva, podem estar relacionados com a diversidade genética destas populações.

Considerando a importância na regulação da atividade do sistema imune inato e na reprodução, a combinação *KIR:HLA* deve ter representado um importante papel na sobrevivência e manutenção das populações ameríndias, estando, estes locos, sob ação de diferentes fatores evolutivos (YAWATA *et al.*, 2006; GENDZEKHADZE *et al.*, 2006).

2.2.1 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 etnia indígena quanto ao tamanho da população. A tribo é dividida em dois grupos, Kamé e Kairu, sendo que os indivíduos de um grupo devem se casar com os do grupo oposto, e os descendentes recebem a filiação paterna, ou seja, as famílias são patrilineares. Apesar do padrão patrilinear de descendência, a forma tradicional de residência entre os Kaingang é a matrilocalidade - após o casamento o genro passa a morar na casa do sogro. Sua

língua é o Kaingang, classificado na família Jê, tronco linguístico Macro-Jê (INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL) (FIGURA 8).

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 na 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.

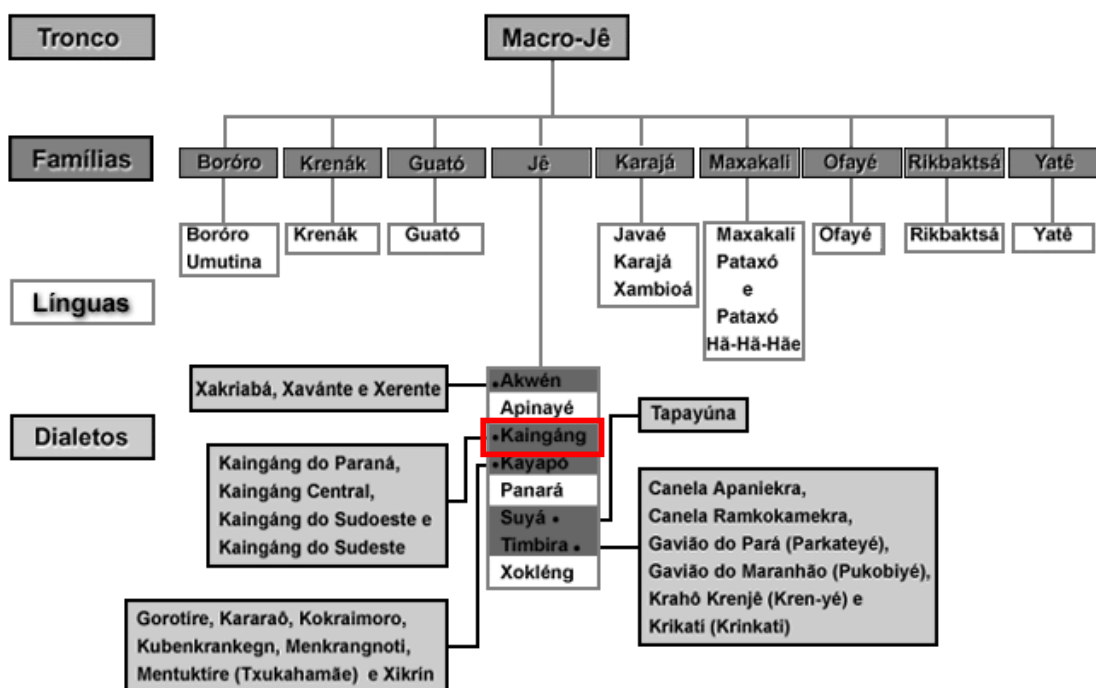


FIGURA 8 - FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGUÍSTICO MACRO-JÊ. Destacado em vermelho estão os quais os dialetos Kaingang das populações analisadas neste estudo. **Fonte:** INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL.

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 também no estado do Mato Grosso do Sul, além de países vizinhos. Os Guarani têm como base de sua organização social, econômica e política, a família extensa, isto é, grupos macro familiares que detêm formas de organização da ocupação espacial dentro dos tekoha (território habitado) determinada por relações de afinidade e consangüinidade. A família é composta pelo casal, filhos, genros, netos, irmãos e constitui uma unidade de produção e consumo. Os casamentos devem ocorrer entre membros de famílias distintas, havendo regras explícitas de proibição de casamentos dentro de uma mesma família. 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 (INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL) (FIGURA 9).

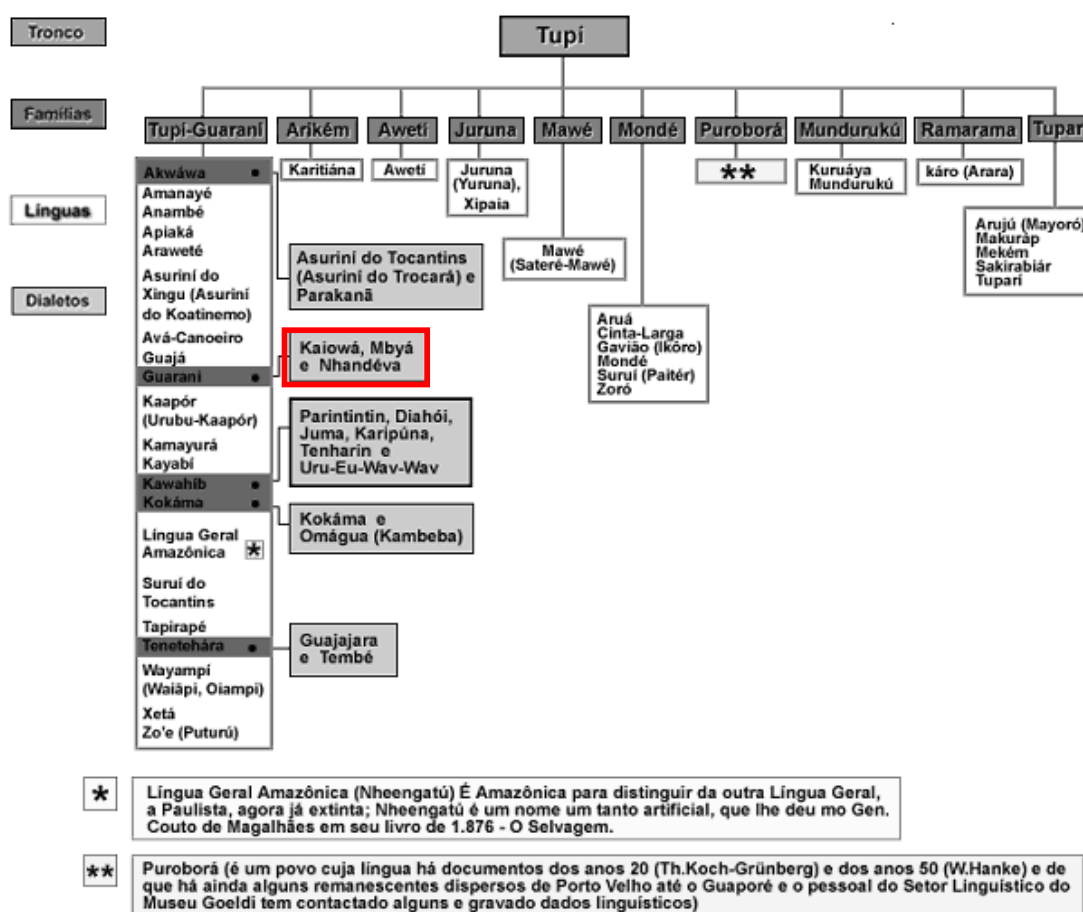


FIGURA 9 - FAMÍLIAS, LÍNGUAS E DIALETOS PERTENCENTES AO TRONCO LINGÜÍSTICO TUPI. Destacado em vermelho os dialetos Guarani das populações analisadas neste estudo: Guarani M'byá, Kaiowá e Nhandéva. **Fonte:** INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL.

Os Guarani analisados neste estudo pertencem a três grupos distintos, nomeados pelo dialeto que falam: Guarani M'byá (da área indígena Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras, PR); Guarani Kaiowá, das aldeias Amambaí (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 Amambaí, Mato Grosso de Sul; e Guarani Ñandeva, de Amambaí e Porto Lindo (23°48'S; 54°30'O), MS, que abriga aproximadamente 1.600 pessoas.

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 DNAmT e em menor grau quanto a haplogrupos de cromossomo Y. A quantidade de variação interpopulacional 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).

2.3 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, de onde provém a amostra analisada neste 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 europeia 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).

A população da região metropolitana de Curitiba (com 1.828.092 de habitantes, conforme dados coletado pelo IBGE em 2007) é composta por 84,65% de brancos, 11,34% de pardos, 2,49% de negros e 1,07% de amarelos. Para o percentual restante não foi feita declaração (Prefeitura Municipal de Curitiba). Entretanto, alguns estudos genéticos recentes evidenciam a verdadeira ancestralidade da população curitibana. Um estudo, analisando genes *HLA* de classe I (*HLA-A*, *-B* e *C*) e II (*HLA-DR* e *-DQ*), mostrou que o componente europeu é predominante entre os brancos (80,6%), sendo que a contribuição de africanos é de 12,5% e a de ameríndios é de 7,0%. Já para os mulatos o componente predominante foi o africano (49,5%), sendo as contribuições europeia de 41,8% e ameríndia de 8,7% (PROBST et al., 2000). BRAUN-PRADO et al. (2000), analisando genes *HLA* de classe I, mostraram 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.

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Considerando a importância dos genes *KIR* na resposta imunológica, particularmente na interação *KIR3DL1/3DS1* com *HLA-A/B*, e a falta de estudos que investiguem as implicações funcionais da diversidade alélica nas populações ameríndias e em outras populações, passa a ser significativa a contribuição de estudos populacionais caracterizando a variabilidade alélica dos genes *KIR* e suas implicações na imunidade e doenças. Além disso, o estudo da sequência nucleotídica dos genes é bastante útil para a compreensão da origem e dinâmica dos seus polimorfismos, auxiliando no entendimento dos mecanismos evolutivos que atuam sobre estes genes.

O objetivo deste trabalho é caracterizar a diversidade alélica do gene *KIR3DL1/3DS1* em populações ameríndias dos estados do Mato Grosso do Sul e do Paraná, bem como na população mestiça brasileira (de origem predominantemente europeia e africana), em na população oriental e na população africana. Os objetivos específicos compreendem:

Produzir dados preliminares acerca das frequências alélicas e genotípicas de *KIR3DL1* e *KIR3DS1* nas populações estudadas.

Levantar hipóteses acerca da existência de novos alelos do loco *KIR3DL1/3DS1* nas populações estudadas.

Comparar as frequências encontradas nas diferentes populações e estimar a distância genética entre estas populações.

Verificar se há indícios de fatores evolutivos atuando sobre o gene *KIR3DL1/3DS1*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Neste estudo foram analisados indivíduos pertencentes a oito populações distintas. As frequências alélicas do gene *KIR3DL1/S1* foram determinadas para uma amostra das populações africana (AFRI, n=14), oriental (ORI, n=24), urbana de Curitiba e região metropolitana (CTBA, n=21) e para cinco populações ameríndias pertencentes às tribos indígenas Guarani M'byá (GRC, n=21), da reserva indígena Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras - PR, Guarani Kaiowá (GKW, n=22), dos municípios de Limão Verde e Amambaí, Mato Grosso do Sul, Guarani Nandeva (GND, n=26), dos municípios de Amambaí e Porto Lindo, MS, e Kaingang, das aldeias indígenas Rio das Cobras (KRC, n=23) e Ivaí (KIV, n=28), município de Manoel Ribas, PR (FIGURA 10). Alguns indivíduos das populações CTBA, GRC, GKW, GND e KRC foram selecionados de acordo com o haplótipo de genes *KIR*, cujas tipagens foram realizadas anteriormente por nosso grupo (AUGUSTO, 2008). Foram escolhidos os indivíduos portadores de perfis únicos e a mostra foi completada aleatoriamente. As amostras foram coletadas a partir da década de 1980 pela equipe do LGMH (Laboratório de Genética Molecular Humana).



FIGURA 10 - MAPA DA AMÉRICA DO SUL. Em destaque a localização das áreas de reserva onde vivem as populações indígenas analisadas neste estudo. **Fonte:** 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 Amambaí e Limão Verde, município de Amambaí, estado do Mato Grosso do Sul; 4: área de reserva indígena Porto Lindo, MS.

A amostra da população oriental é composta principalmente de indivíduos descendentes de japoneses vindos para o Brasil nos últimos 100 anos. Já a amostra populacional africana é formada por indivíduos nascidos em três países da África (FIGURA 11), na sua maioria estudantes que vieram concluir seus estudos na cidade de Curitiba. A amostra da população brasileira é representada pela

população residente em Curitiba e região metropolitana, cujas amostras foram coletadas a partir de 1994 pela equipe do LGMH.

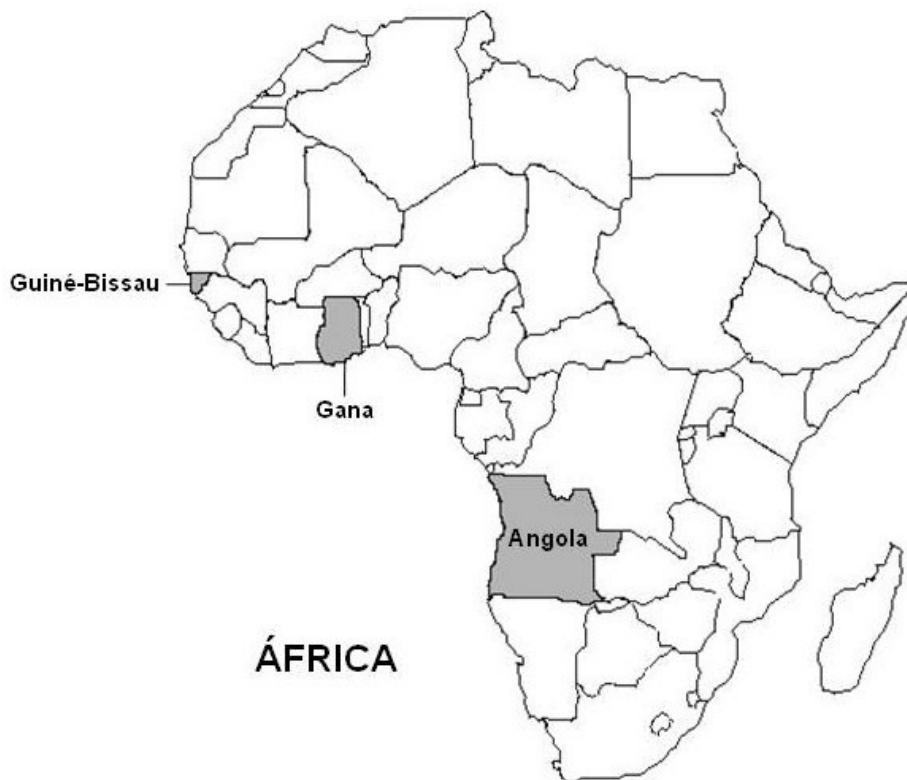


FIGURA 11 - MAPA DO CONTINENTE AFRICANO. **Fonte:** adaptado de <http://clio.rediris.es/actividades/africa/africa.htm>

Nota: em destaque os países de origem dos africanos analisados neste trabalho: Guiné-Bissau, Gana e Angola.

O DNA foi extraído a partir do sangue total, através dos métodos fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989, com protocolo adaptado do 13° IHWC, 2000) e salting-out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991). Os indivíduos foram voluntários e assinaram um termo de consentimento para participação em pesquisa. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do SCB (Setor de Ciências Biológicas) da Universidade Federal do Paraná. A coleta de sangue dos indígenas foi autorizada pela Fundação Nacional do Índio (FUNAI), Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e pelos líderes das tribos.

4.2 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

As regiões correspondentes aos exons três, quatro e cinco do gene *KIR3DL1/3DS1*, que codificam os domínios extracelulares D0, D1 e D2, respectivamente, foram amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir do DNA genômico. Após a amplificação, as amostras foram analisadas através do sequenciamento direto dos produtos de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores para a reação de PCR e também para as reações de sequenciamento foram escolhidos com base na sequência do gene disponível no banco de dados IPD-KIR Database, através da análise das sequências escolhidas no programa Oligo Analyzer[®] 3.0 e são mostrados na tabela 2. Alguns dos oligonucleotídeos para a reação de amplificação foram adaptados do trabalho de Halfpenny e colaboradores (2004). Em alguns casos, os oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos da reação de amplificação.

TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 3, 4 E 5 DOS GENES *KIR3DL1* E *3DS1*.

	Localização	Sequência (5' - 3')	T	Tamanho
Exon 3 - D0				
Amplificação	Exon 2	KIR3DL1/S1EX3FOR_A: TTGGTCCAGAGGGCCGGTC	62.3	1059 pb
	Exon 3	KIR3DL1/S1EX3REV_A: CCTGTGACCATGATCACCA(C/T)	55.6/54.6	
Sequenciamento		KIR3DL1/S1EX3FOR_S: CCATGCCGTGTCTACTTTGT KIR3DL1/S1EX3REV_S: CTGTGACCATGATCACCA		
Exon 4 - D1				
Amplificação	Exon 4, intron 3	KIR3DL1/S1EX4FOR_A: TCCCCTGGTCAAATCAGGAGA	57.7	261 pb
	Exon 4	KIR3DL1/S1EX4REV_A: GTGACCACGATGTCCAGGGGA	61.2	
Sequenciamento		KIR3DL1/S1EX4FOR_S: TCCCCTGGTCAAATCAGGAGA KIR3DL1/S1EX4REV_S: GTGACCACGATGTCCAGGGGA		
Exon 5 - D2				
Amplificação	Exon 4	KIR3DL1/S1EX5FOR_A: GCTACGGTTCTGTTACTCACA	54.4	1912 pb
	Exon 5	KIR3DL1/S1EX5REV_A: TGACCA(C/T)TCGTAGGGAGAGTG	56/57.8	
Sequenciamento		KIR3DL1/S1EX5FOR_S: GGGAGTGAGTTCTCAGCTCA KIR3DL1/S1EX5REV_S: TGACCACTCGTAGGGAGAGTG		

T - Temperatura de fusão (ou TM) calculada pelo programa Oligo Analyser 3.0. Disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

Os protocolos para as reações de amplificação dos exons 3, 4 e 5 foram:

1) Exon 3 - Tampão Sulfato 1X, 1,5mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 0,1mM de dNTP, 0,3 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (*Taq Platinum*, Invitrogen[®]) e 40ng de DNA genômico, em um volume final de 50 μ l. As condições de ciclagem foram: a - desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos; b - 15 ciclos de desnaturação a 96°C por 1min, hibridação a 68°C por 1min e extensão a 72°C por 1min; c - 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 1min, hibridação a 62°C por 1min e extensão a 72°C por 1min e; d - uma etapa final de alongamento, a 72°C por 10 minutos.

2) Exon 4 - Tampão Sulfato 1X, 1,5mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 0,1mM de dNTP, 0,3 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (*Taq Platinum*, Invitrogen[®]) e 40ng de DNA genômico, em um volume final de 50 μ l. As condições de ciclagem foram: a - desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos; b - 15 ciclos de desnaturação a 96°C por 1min, hibridação a 66°C por 1min e extensão a 72°C por 1min; c - 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 1min, hibridação a 62°C por 1min e extensão a 72°C por 1min e; d - uma etapa final de alongamento, a 72°C por 10 minutos.

3) Exon 5 - Tampão Sulfato 1X, 2mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 0,1mM de dNTP, 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (*Taq Platinum*, Invitrogen[®]) e 40ng de DNA genômico, em um volume final de 50 μ l. As condições de ciclagem foram: a - desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos; b - 15 ciclos de desnaturação a 96°C por 1min, hibridação a 62°C por 1min e extensão a 72°C por 1min; c - 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 1min, hibridação a 58°C por 1min e extensão a 72°C por 1min e; d - uma etapa final de alongamento, a 72°C por 10 minutos.

Após a amplificação, a qualidade da reação foi verificada através da corrida eletroforética a 70V por 60 minutos em gel de agarose 1% utilizando como corante GelRed (Biotium[®]) 2 X em DMSO diluído em solução azul de bromofenol e visualizado sob luz UV. Os tamanhos dos fragmentos amplificados para o exon 3, 4 e 5 foram 1059pb, 261pb e 1912pb, respectivamente (FIGURA 12).

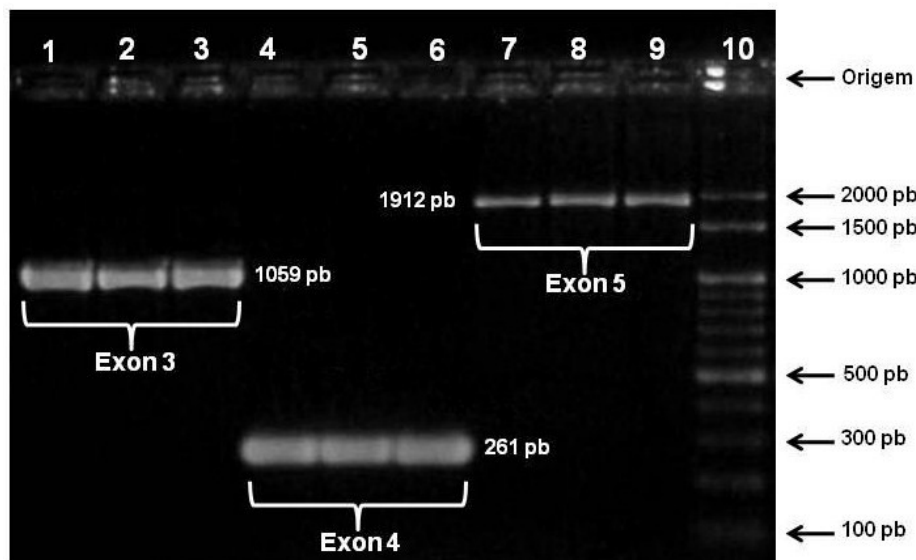


FIGURA 12 - FRAGMENTOS DO GENE KIR3DL1/3DS1 ANALISADOS NESTE ESTUDO. Fotografia de um gel de agarose mostrando os tamanhos dos fragmentos amplificados para os exons 3, 4 e 5. Na coluna 10 está o marcador de peso molecular.

Os produtos de PCR foram purificados para eliminar os reagentes em excesso e tornar viável a reação de sequenciamento. O protocolo de purificação é baseado na precipitação do DNA amplificado por PCR através de Polietilenoglicol (PEG), etanol, baixa temperatura e centrifugações. Inicialmente, o produto de cada reação de PCR é transferido para um tubo 0,5 ml e é adicionado o mesmo volume de PEG 8000 20% NaCl 2,5M (50 μ l). Esta mistura permanece em banho-maria a 37°C por 30 minutos e é então centrifugada a 13000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante é descartado invertendo o tubo bruscamente. Adiciona-se 125 μ l de etanol 80% gelado. Após um minuto a solução é novamente centrifugada a 13000 rpm durante dois minutos e o sobrenadante descartado, virando o tubo bruscamente. Em seguida é adicionado 125 μ l de etanol absoluto gelado e o sobrenadante descartado. Na última etapa o tubo é posto para secar em banho seco e em seguida são adicionados 10 μ l de água ultrapura. A solução resultante é incubada em banho-maria a 37°C até o dia seguinte, para ressuspensão.

A quantificação dos produtos de PCR se deu através de eletroforese em gel de agarose 1% com 2 μ l do marcador de quantificação (*Low DNA Mass Ladder*,

Invitrogen[®]), por comparação com as bandas do marcador, após corrida eletroforética com corante GelRed (Biotium[®]) 2 X a 80V por 60 minutos.

As reações de sequenciamento utilizaram diferentes quantidades de produto de PCR e de MIX para o sequenciamento (*DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit*, GE Healthcare[®]), dependendo do tamanho do fragmento a ser sequenciado. Para fragmento correspondente ao exon 4 (261pb) foram usados 50ng de DNA e 3µl de MIX de sequenciamento. Já para os fragmentos maiores correspondentes aos exon 3 e 5 (1059pb e 1912pb, respectivamente) foram utilizadas de 150 a 200ng de DNA e 4µl de MIX. A concentração final do oligonucleotídeo iniciador para a reação de sequenciamento foi de 0,25uM. O volume final da reação foi ajustado para 10µl. A reação tem um passo inicial de desnaturação a 95°C por 20 segundos, seguida por 35 ciclos com hibridação a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

Após a reação de sequenciamento, uma nova purificação foi realizada antes da injeção das amostras no sequenciador. Para a precipitação do DNA foi adicionado 1µl de acetato de amônio 7,5M e 30µl de etanol absoluto, seguindo-se a centrifugação a 3220rcf por 45min a 15°C. A placa é então virada bruscamente para descartar o sobrenadante e centrifugada invertida rapidamente a 300rcf. São adicionados 100µl de etanol 70% à temperatura ambiente e é feita uma centrifugação rápida a 2500rcf com a placa aberta. O sobrenadante é novamente descartado virando bruscamente e a placa é centrifugada invertida a 300rcf rapidamente. As amostras foram ressuspensas em 10µl de solução desnaturante *loading solution* (formamida, do kit de sequenciamento da GE Healthcare[®]) e armazenadas a -20°C.

As corridas de sequenciamento foram realizadas no sequenciador MegaBACE[®] 1000. Os parâmetros de corrida foram variáveis entre os fragmentos sequenciados. A injeção ocorreu sempre a 2 KV por 30 ou 60 segundos e a corrida se deu a 6 KV por 90 minutos para o exon quatro e por 240 minutos para os exons três e cinco. A visualização dos cromatogramas e a análise da qualidade das sequências foram realizadas através dos programas Phred, Phrap e Consed (EWING e GREEN, 1998; GORDON, ABAJIAN e GREEN, 1998; GREEN, 1994), em ambiente Linux. O alinhamento das sequências foi realizado através do programa

ClustalW (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994), disponível no BioEdit (HALL, 1999), em ambiente Windows.

4.3 ANÁLISES

A identificação da fase gamética dos sítios heterozigotos encontrados e determinação dos alelos presentes em cada indivíduo foi realizada com o auxílio do programa *online dbLRC* disponível no NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>).

Como o tamanho amostral de cada população incluída neste estudo foi reduzido e um grande número de alelos foi encontrado, além do fato de uma parte da amostra ter sido selecionada, as análises estatísticas de comparação entre diferentes populações, utilizando os programas computacionais que levam em consideração as frequências alélicas e genotípicas, não foi realizada. A comparação entre as populações foi feita por contagem direta, levando em consideração as frequências absolutas dos alelos nas diferentes populações. As frequências genotípicas também foram determinadas por contagem direta, apenas para verificar as diferentes combinações dos alelos encontrados nas diferentes populações. O teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado a partir da sequência do exon 3, através do teste exato de Fisher, implementado pelo algoritmo metropolis, disponível no ARLEQUIN versão 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005).

As distâncias genéticas entre as populações foram estimadas através do cálculo de F_{ST} , a partir da sequência completa do exon 3, obtida neste estudo, com o auxílio do programa ARLEQUIN versão 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). Um dendrograma foi construído utilizando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987), com o auxílio do programa MEGA v. 4 (TAMURA et al., 2007) para evidenciar a relação entre os alelos já descritos e os novos alelos identificados neste estudo. As análises evolutivas, como o teste de neutralidade seletiva foram realizadas no programa ARLEQUIN versão 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005).

5 RESULTADOS

5.1 DIVERSIDADE ALÉLICA E GENOTÍPICA

O gene *KIR3DL1/3DS1* é um dos genes *KIR* mais bem estudados e inúmeros alelos deste gene já foram descritos na literatura. Através da análise das sequências obtidas para os exons 3, 4 e 5 foram identificadas sete novos possíveis alelos para o gene *KIR3DL1/3DS1* (FIGURA 13).

(The) por Isoleucina (Ile). Essa nova variante foi identificada em dois indivíduos da população Guarani Ñandeva. No códon 82, exon 3, ocorre uma transversão (309C>A) (*v3DL1*1B(309C>A-ex3)*), identificada nas populações Guarani Ñandeva e Guarani M'byá, que não ocasiona a substituição de aminoácidos na proteína. Os cromatogramas que mostram picos heterozigotos das três novas variantes citadas são mostrados na figura 14.

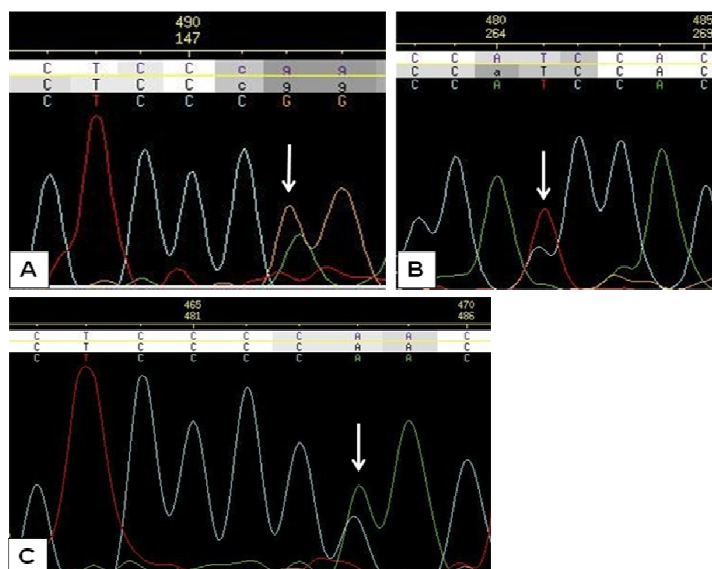


FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS MOSTRANDO AS SEQUÊNCIAS IDENTIFICADAS PARA OS NOVOS ALELOS. A – Variante do exon 5 identificada na população Africana; B – Variante do exon 5 encontrada na população Guarani Ñandeva e; C – Variante identificada nas populações GND e GRC. As setas indicam os picos dos heterozigotos onde foram identificadas as novas variantes.

A variante do códon 226 é muito semelhante aos alelos já descritos *3DL1*007*, *3DL1*01501*, *3DL1*017*, *3DL1*018* e *3DL1*031*, diferindo destes alelos apenas pela substituição de G por A na posição 741 da sequência de nucleotídeos. O novo alelo identificado no códon 265 pertence ao grupo de alelos ativadores do gene *KIR3DL1/3DS1* e semelhante aos alelos *3DS1*010*, *3DS1*01302* e *3DS1*045*, sendo caracterizado pela presença de T na posição 857. Já o alelo descrito para o exon 3 possui grande similaridade com os alelos *3DL1*007*, *3DL1*01501*, *3DL1*017*, *3DL1*018*, *3DL1*029*, *3DL1*031* e *3DL1*038* (FIGURA 15).

Outras mutações de ponto foram identificadas nas diferentes populações. Na população Guarani Ñandeva uma transição A>G caracteriza uma nova variante para o exon 3 (posição 202) (*v3DL1*1F(202A>G - ex3)*). Nesta mesma população uma transição C>T na posição 702 do exon 5 caracteriza outra variante *3DL1(v3DL1*1G(702C>T - ex5)*). Estas variantes encontradas na população GND são muito similares aos alelos **016*, **026* e **00102* já descritos, diferindo apenas nas posições mencionadas, não levam à substituição de aminoácidos na proteína (FIGURA 15).

Um novo alelo, comum a todas as populações, também foi identificado. Esse alelo é bastante semelhante ao alelo ativador já descrito *3DS1*014*, sendo caracterizado por uma transversão A>T na posição 223 no exon 3 e pela transição G>A na posição 235 também do exon 3 (*v3DS1*1D(S*14_223A>Te235G>A-ex3)*). Essas alterações de bases no exon 3 não ocasionam a substituição de aminoácidos na proteína. Um possível evento de recombinação foi identificado no exon 3 (84G>A, 123G>A, 155G>A, 193A>G, 202G>A, 235G>A e 319C>T) e caracteriza um novo alelo, descrito em dois indivíduos da população curitibana (*v3DS1*1E(*S14 - recEx3)*) (FIGURA 15).

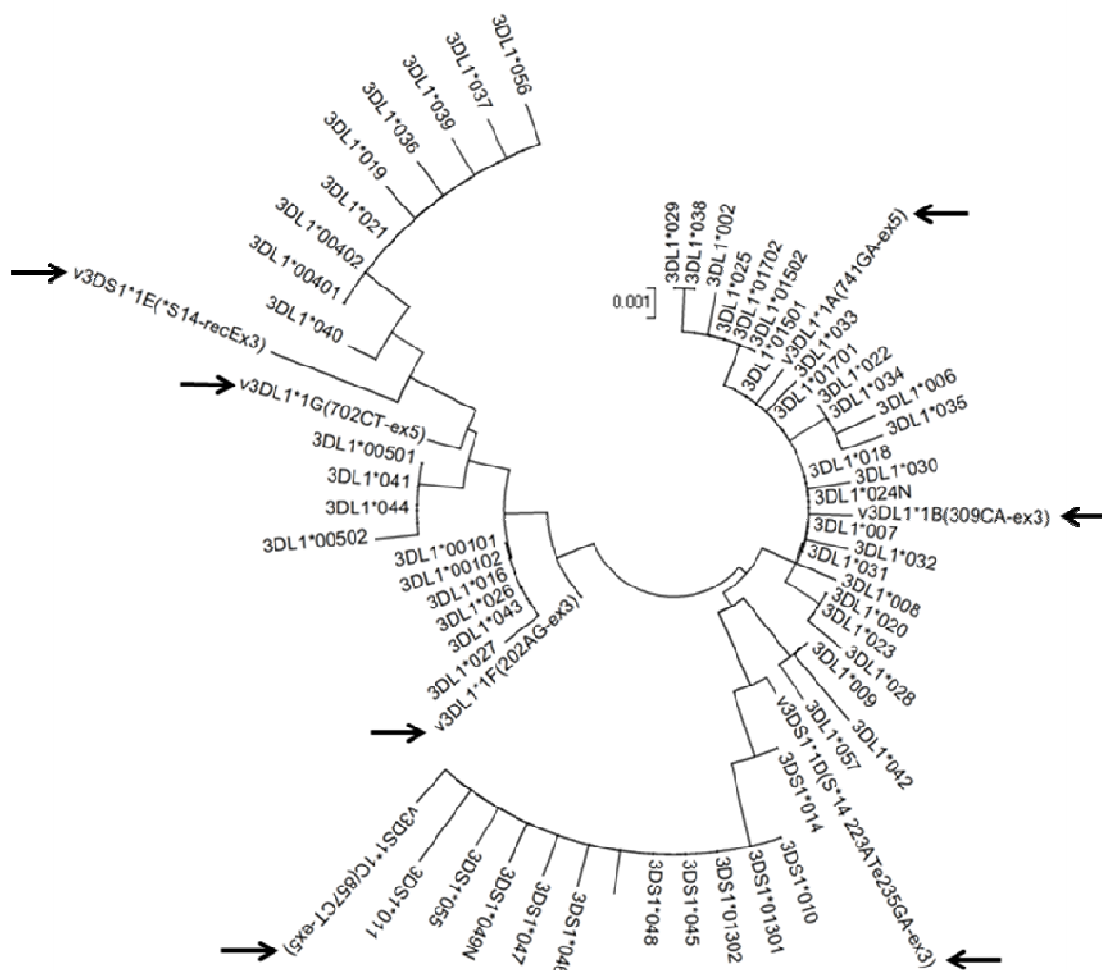


FIGURA 15 - DENDROGRAMA QUE MOSTRA A RELAÇÃO DOS ALELOS DESCRITOS NESTE ESTUDO COM OS ALELOS JÁ CONHECIDOS DO GENE *KIR3DL1/3DS1*. O dendrograma foi construído a partir das sequências dos exons 3, 4 e 5, utilizando o método *Neighbor-Joining*. As setas indicam as novas variantes.

São conhecidos 57 alelos para o gene *KIR3DL1/3DS1*, determinados por polimorfismos presentes ao longo de toda sequência do gene. O sequenciamento dos exons 3, 4 e 5 permite a identificação de grupos alélicos e, em alguns casos, de um alelo específico, que é determinado por algum polimorfismo presente nesses exons. Com o auxílio do programa online *dbLRC* disponível no NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>) as sequências de cada indivíduo foram comparadas com sequências já publicadas e os diferentes alelos encontrados em cada população estão listados na tabela 3.

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS, EM NÚMEROS ABSOLUTOS, DOS ALELOS ENCONTRADOS NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.

Alelo (ou grupo alélico)	População							
	CTBA (n=21)	AFRI (n=14)	ORI (n=24)	GRC (n=21)	GND (n=26)	GKW (n=22)	KRC (n=23)	KIV (n=28)
<i>DL*00102/*003/*01502/*01702/*025</i>	4	11	24	3	7	1	12	21
<i>DL*00201/*007/*01501/*017/*018/*031</i>	9	4	6	16	1	8	1	3
<i>DL*00102/*016/*026</i>	2	1	7		10	3	7	6
<i>DL*029/038</i>				5	3	9	3	
<i>DL*005/*041</i>	4				3		3	
<i>DL*00401/*00402</i>	9	5						2
<i>DL*020</i>	1	2						2
<i>DL*009/*042/*057</i>	1						1	
<i>DL*022/*034</i>		3						
<i>DL*008</i>						1		
<i>DS*010/*01302/*045</i>	9		6	8	14	12	12	10
<i>v3DL1*1A (741G>A-ex5)</i>		1						
<i>v3DL1*1B (309C>A-ex3)</i>				2	1			
<i>v3DS1*1C (857C>T-ex5)</i>					2			
<i>v3DS1*1D (S*14_223A>Te235G>A-ex3)</i>	1	1	5	10	9	10	7	12
<i>v3DS1*1E (*S14 - recEx3)</i>	2							
<i>v3DL1*1F (202A>G - ex3)</i>					1			
<i>v3DL1*1G (702C>T - ex5)</i>					1			

Em cinza são mostradas as novas variantes identificadas neste estudo. CTBA - Curitiba; AFRI - Africanos; ORI - Orientais; GRC - Guarani M'byá; GND - Guarani Nandeva; GKW - Guarani Kaiowá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras, KIV - Kaingang de Ivaí.

Com exceção do alelo *3DL1*008*, que foi encontrado apenas na população GKW, e do alelo **022* (ou **034*) que foi identificado apenas na população africana, todos os demais alelos ocorrem em pelo menos duas populações, sendo que alguns alelos ocorrem em todas as populações, como **00102* (e relacionados) e **00201* (e relacionados). Algumas das novas variantes também são exclusivas de determinadas populações. O novo alelo *v3DL1*1A(741G>A-ex5)* foi identificado apenas na população africana. A variante *v3DS1*1E(*S14 - recEx3)* é exclusiva da população curitibana, e foi identificada em dois indivíduos que possuem ancestralidade predominantemente européia. As variantes *v3DS1*1C (857C>T-ex5)*, *v3DL1*1F(202A>G - ex3)* e *v3DL1*1G(702C>T - ex5)* são exclusivas da população Guarani Nandeva.

Os alelos mais frequentes em todas as populações são os pertencentes aos grupos *3DL1*00102/*003/*01502/*01702/*025*, que representa 50% dos alelos da população oriental e aproximadamente 38% dos alelos na população KIV, *3DL*00201/*007/*01501/*017/*018/*031*, que representa aproximadamente 38% dos alelos da população GRC, e *3DS1*010/*01302/*045*, com frequência de aproximadamente 27% na população GND. Na população africana nenhum alelo relacionado ao grupo de alelos ativadores (*3DS*010/S*01302/S*045*) foi encontrado, apenas um outro alelo ativador, relacionado ao alelo *3DS1*014*, e que possivelmente representa uma nova variante (*v3DS1*1D(S*14_223A>Te235G>A-ex3)*), que também foi identificada nas demais populações. As populações indígenas são mais semelhantes à população oriental quanto a distribuição dos diferentes alelos, principalmente na distribuição do grupo de alelos ativadores *3DS*010/*01302/*045* e da nova variante *v3DS1*1D(S*14_223A>Te235G>A-ex3)*. A população GRC foi a única população em que o grupo de alelos *DL*00102/*016/*026*, que é comum a todas as populações, não foi identificado.

A diversidade alélica (número de diferentes alelos) foi bastante semelhante em todas as populações. O número de alelos e de diferentes combinações (genótipos) nas populações estudadas é mostrado na tabela 4.

TABELA 4 - NÚMERO DE DIFERENTES ALELOS E GENÓTIPOS ENCONTRADOS EM CADA POPULAÇÃO.

População	N. alelos	N. genótipos
CTBA (n=21)	10	19
AFRI (n=14)	8	10
ORI (n=24)	5	5
GRC (n=21)	6	9
GND (n=26)	9	13
GKW (n=22)	7	8
KRC (n=23)	8	10
KIV (n=28)	7	8

Nessa tabela também estão computadas as possíveis novas variantes identificadas. CTBA - Curitiba; AFRI - Africanos; ORI - Orientais; GRC - Guarani M'byá; GND - Guarani Nandeva; GKW - Guarani Kaiowá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras, KIV - Kaingang de Ivaí.

A análise dos sítios polimórficos na sequência do exon 3 mostrou que a heterozigosidade é maior para a população curitibana em comparação com as demais populações (TABELA 5). A heterozigosidade nas populações oriental e ameríndias foi semelhante e nas populações GKW e KRC ela foi bastante reduzida se comparada com as demais populações. No teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg todas as populações apresentaram um valor de P inferior a 0,05, o que não é inesperado, dado o pequeno tamanho das populações analisadas neste estudo.

TABELA 5 - HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.

CTBA (n=21)	AFRI (n=14)	ORI (n=24)	GRC (n=21)	GND (n=26)	GKW (n=22)	KRC (n=23)	KIV (n=28)
0,428	0,231	0,182	0,143	0,200	0,087	0,095	0,200

CTBA - Curitiba; AFRI - Africanos; ORI - Orientais; GRC - Guarani M'byá; GND - Guarani Nandeva; GKW - Guarani Kaiowá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras, KIV - Kaingang de Ivaí.

O número de alelos pertencentes ao grupo de alelos ativadores (DS) e inibidores (DL) difere, aparentemente, entre as populações. Nas populações indígenas o número de alelos ativadores é maior do que o observado nas populações Africana, Curitibana e Oriental (TABELA 6). Além disso, a presença do grupo de alelos relacionados ao alelo *004, que não é expresso na superfície das

células, foi identificada apenas na população curitibana, aparecendo nove vezes, na população africana, cinco vezes, e em dois indígenas Kaingang (KIV). Nos indivíduos Kaingang esse alelo ocorre em heterozigose com um alelo que é expresso normalmente. Em todas as demais populações o alelo *004 (ou outro alelo relacionado) não foi identificado (ver tabela 3). Em um indivíduo da população curitibana o alelo *004 ocorre em homozigose.

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS DOS ALELOS ATIVADORES E INIBIDORES NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.

População	Ativadores (DS)	Inibidores (DL)
CTBA (n=21)	11	31
AFRI (n=14)	1	27
ORI (n=24)	11	37
GRC (n=21)	17	25
GND (n=26)	24	28
GKW (n=22)	22	22
KRC (n=23)	19	27
KIV (n=28)	20	36

CTBA - Curitiba; AFRI - Africanos; ORI - Orientais; GRC - Guarani M'byá; GND - Guarani Nandeva; GKW - Guarani Kaiowá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras, KIV - Kaingang de Ivaí.

As populações foram comparadas duas a duas através do cálculo de FST com o auxílio do programa ARLEQUIN (TABELA 7), utilizando as sequências do exon 3 obtidas para cada população. O cálculo de FST leva em consideração a variância genética entre as populações, relacionando estas populações conforme a diversidade encontrada em cada uma. O valor de FST dá uma idéia da distância genética entre as populações. As populações que mais diferem são as populações africana, seguida pela população curitibana. A população oriental não difere significativamente das demais populações, com exceção da população curitibana. A população GKW mostrou ser semelhante a todas as demais.

TABELA 7 - VALORES DE FST PARA OS PARES DE POPULAÇÕES ANALISADAS.

	AFRI	GKW	GND	GRC	KRC	KIV	ORI	CTBA
AFRI		0.00901	0.01802	0.04505	0.11712	0.01802	0.53153	0.06306
GKW	-		0.41441	0.07207	0.43243	0.45045	0.32432	0.08108
GND	+	-		0.00901	0.04505	0.96396	0.05405	0.21622
GRC	+	-	+		0.46847	0.00000	0.12613	0.00000
KRC	-	-	+	-		0.03604	0.45045	0.00000
KIV	+	-	-	+	+		0.03604	0.21622
ORI	-	-	-	-	-	-		0.01802
CTBA	+	-	-	+	+	-	+	

Na parte inferior são mostradas as populações que diferem (+) ou não (-) significativamente e na parte superior os valores de *P* para as comparações. AFRI - Africanos; GKW - Guarani Kaiowá; GND - Guarani Nandeva; GRC - Guarani M'byá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras; KIV - Kaingang de Ivaí; ORI - Oriental; CTBA - Curitiba.

O teste *Tajima's D* (TAJIMA, 1989), disponível no programa ARLEQUIN, foi utilizado para verificar se há indícios de seleção direcional no exon 3 nas populações investigadas neste estudo (TABELA 8). Os resultados deste teste mostram que em nenhuma das populações há evidências de seleção direcional, dado que nenhuma destas populações apresentou um valor negativo de *D*.

TABELA 8 - VALORES PARA O TESTE DE NEUTRALIDADE SELETIVA (*TAJIMA'S D*) NAS DIFERENTES POPULAÇÕES.

	CTBA (n=21)	AFRI (n=14)	ORI (n=24)	GRC (n=21)	GND (n=26)	GKW (n=22)	KRC (n=23)	KIV (n=28)
<i>D</i>	1,80	0,38	0,647	0,98	1,66	1,20	2,33	0,35
<i>P</i>	0,95	0,68	0,76	0,83	0,95	0,90	0,99	0,67

P - valor de *P* para o teste *Tajima's D*. CTBA - Curitiba; AFRI - Africanos; ORI - Orientais; GRC - Guarani M'byá; GND - Guarani Nandeva; GKW - Guarani Kaiowá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras, KIV - Kaingang de Ivaí.

6 DISCUSSÃO

Embora a maior parte da variação genética seja encontrada dentro das populações, as frequências alélicas variam entre diferentes populações (SUZUKI et al., 1998). Estas variações ocorrem devido à ação de fatores evolutivos, de acordo com a história de cada população. A caracterização genética das populações humanas é importante para a reconstrução da história da fundação ou migração e investigação da estrutura genética das populações, possibilitando a inferência de teorias a respeito das relações entre as diferentes populações. O estudo da diversidade de genes do sistema imune é particularmente interessante, pois estes genes podem estar sob efeito de diferentes pressões seletivas, refletindo a história evolutiva das diferentes populações.

Os receptores KIR representam um importante repertório na regulação das células *NK*, que são fundamentais para a resposta imune inata. A diversidade alélica do gene *KIR3DL1/3DS1* possui implicações funcionais sobre a regulação da atividade das células *NK*, pois alguns alelos são expressos em altos níveis enquanto outros são pouco expressos ou mesmo não expressos (YAWATA et al., 2006). As células *NK* também desempenham um importante papel na reprodução. Considerando sua importância na regulação da atividade do sistema imune inato e na reprodução, a combinação KIR:HLA pode ter representado um importante papel na sobrevivência e manutenção das populações ameríndias estando estes locos sob ação de diferentes fatores evolutivos (YAWATA et al., 2006; GENDZEKHADZE et al., 2006).

6.1 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ALELOS

A rápida evolução dos genes *KIR* a partir da divergência entre os primatas e as demais ordens de mamíferos já foi mencionada em estudos anteriores (p. e. MORETTA e MORETTA, 2004). A diversidade alélica dos diferentes genes *KIR* nas populações humanas pode ocorrer como resultado de mutações de ponto, de

conversão gênica e de recombinação. Dos sete novos alelos identificadas neste estudo, seis são resultado de mutações de ponto e um se deve provavelmente a um evento de recombinação entre diferentes alelos. As variações foram encontradas no exon 3 e no exon 5. O exon 3 codifica o domínio zero (D0) dos receptores KIR e, embora esse domínio não participe diretamente da interação com as moléculas HLA, os polimorfismos presentes nesse domínio podem alterar a conformação dos domínios D1 e D2, interferindo na ligação com os ligantes. Nenhuma das mutações de ponto encontradas no exon 3 ocasiona a substituição de aminoácidos na proteína e provavelmente essas variações não devem ter grande importância sobre a conformação dos domínios D1 e D2.

A rápida evolução dos genes *KIR* pode explicar a ocorrência de um grande número de alelos e a existência de alelos que são exclusivos de determinadas populações.

Das três transições identificadas para o exon 5, a transição G>A na posição 741 (códon 226) leva a substituição do aminoácido arginina (Arg) por glutamina (Gln) dentro de um dos sítios de interação com as moléculas HLA e foi identificada apenas na população africana. Essa substituição pode alterar o padrão de interação do receptor com seu ligante, uma vez que o aminoácido arginina é um aminoácido de caráter básico, enquanto a glutamina é um aminoácido neutro. Para se entender qual a verdadeira implicação dessa substituição não sinônima no exon 5 é necessário o desenvolvimento de um estudo funcional que avalie a interação com os ligantes HLA.

O alelo *v3DS1*1C(857C>T-ex5)* foi identificado em dois indivíduos da população Guarani Ñandeva. Embora a transição 857C>T, no códon 265, exon 5, que ocasiona a substituição do aminoácido Treonina (The) por Isoleucina (Ile), não ocorra dentro do sítio de interação de KIR com HLA, essa substituição pode alterar a conformação do domínio 2 (D2), modificando o padrão de interação do receptor com o ligante. Aqui também a implicação funcional dessa substituição precisa ser mais bem investigada.

A variante *v3DS1*1E (*S14 - recEx3)* identificada na população curitibana é, provavelmente, resultado de um evento de recombinação entre um alelo do grupo ativador (DS) e um alelo do grupo inibidor (DL). Essa variante é caracterizada por

possuir o exon 3 semelhante aos alelos inibidores e os exons 4 e 5 semelhantes aos alelos ativadores. A análise das posições variáveis nos exon 3, 4 e 5 mostra que o exon 3 dessa variante é semelhante ao exon 3 dos alelos *3DL1*040* e *3DL1*056* e que os exons 4 e 5 são semelhantes aos exons 4 e 5 dos alelos *3DS1*010*. A recombinação entre esses alelos pode ter dado origem a essa nova variante.

6.2 DIVERSIDADE DOS ALELOS *KIR3DL1/3DS1*

Limitações para o cálculo das frequências dos alelos nas populações estudadas e para uma análise mais detalhada da diversidade do gene *KIR3DL1/S1* foram impostas pelo número amostral de cada população incluída neste estudo. Independentemente do tamanho amostral, essa investigação preliminar das populações evidenciou o elevado grau de polimorfismo do gene em estudo, como já foi relatado em estudos anteriores.

A diversidade de *KIR* nas populações indígenas é menor em relação às populações urbanas (FLORES et al., 2007). Nas populações indígenas, que são populações pequenas e isoladas, onde a ação de fatores evolutivos, como a deriva, é mais pronunciada, é esperado que a diversidade alélica também seja menor que nas populações urbanas. Os resultados deste estudo mostram uma similaridade entre todas as populações (urbanas e indígenas) quanto ao número de diferentes alelos (ou grupos alélicos) do gene *KIR3DL1/3DS1*. As combinações dos alelos (genótipos) encontrados também foram semelhantes entre as populações (Tabela 4). Porém um sutil acréscimo na frequência dos alelos pertencentes ao grupo ativador foi verificado nas populações indígenas (Tabela 6), o que condiz com estudos anteriores que mostram um relativo aumento na frequência dos genes *KIR* ativadores nas populações ameríndias (GENDZEKHADZE et al., 2006; FLORES et al., 2007; RAJALINGAM et al., 2008; KULKARNI et al. 2008). Esse aumento da frequência de genes *KIR* ativadores deve-se, a pressões seletivas atuando sobre os diferentes genótipos *KIR*, já que os genes *KIR* ativadores são importantes na ativação das células *NK*, que por sua vez desempenham um importante papel nas respostas imunológicas contra agentes infecciosos e células cancerígenas.

A análise dos resultados também revelou um dado interessante que diz respeito à distribuição dos grupos funcionais dos alelos do gene *KIR3DL1/3DS1* (alelos com diferentes níveis de expressão) entre as populações. Em concordância com o fato de as populações indígenas possuírem uma frequência maior dos genes *KIR* ativadores, que desempenham um importante papel na ativação das células *NK* e que, portanto, podem ter representado um fator favorável à manutenção destas populações, apenas dois indivíduos da população Kaingang (KIV) possuem o alelo não funcional *KIR3DL1*004*, que não é expresso na superfície das células. Em ambos os indivíduos esse alelo ocorre em heterozigose com um alelo funcional. Nas demais populações indígenas esse alelo não foi identificado.

O alelo não funcional **004* é comum em populações de diferentes ancestralidades (PANDO et al., 2003) e sua frequência na população Africana (aproximadamente 18% nesse estudo) sugere que este alelo ocorre nas populações humanas por um tempo considerável. Em nenhum indivíduo da população de ancestralidade oriental esse alelo não funcional foi identificado. Esse resultado é condizente com o encontrado nas populações indígenas, onde o alelo **004* também não foi encontrado (com exceção dos dois indivíduos Kaingang). 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 Ñandeva e 7% para Kaingang. Para Guarani Kaiowá não foi detectada evidência de fluxo gênico (PETZL-ERLER et al., 1993; TSUNETO et al., 2003). O fluxo gênico recente pode explicar a presença do alelo não funcional na população Kaingang, entretanto, a aparente ausência desse alelo nas demais populações pode ser resultado de erros de amostragem, dado reduzido tamanho amostral de cada população.

A maior heterozigozidade encontrada na população curitibana (Tabela 5), em comparação com as demais populações, é esperada já que essa população é miscigenada e o fluxo gênico é intenso. Essa população é formada pela contribuição dos componentes europeu, africano e ameríndio, em diferentes proporções. (PROBST et al., 2000; BRAUN-PRADO et al., 2000). Uma heterozigozidade elevada na população africana também era esperada, uma vez que as demais populações apresentam, em geral, apenas uma parte da diversidade genética encontrada no continente africano (KIDD et al., 1998; CAVALLI-SFORZA e FELDMAN, 2003;

LONJOU et al., 2003). Nas populações ameríndias se espera que a diversidade e, por consequência a heterozigosidade, seja menor que nas demais populações. De fato a heterozigosidade observada nas populações indígenas foi menor que nas populações curitibana e africana, porém também possui um valor alto, refletindo a diversidade do gene *KIR3DL1/3DS1* nessas populações. Nas populações GND, GRC e KIV ela foi semelhante à observada na população de ancestralidade oriental. Estudos populacionais da diversidade genética de outros locos também demonstram que, em geral, a heterozigosidade é menor nas populações ameríndias quando comparadas com as demais populações (BELTRAME, 2008).

As semelhanças e diferenças entre as populações, observadas através do cálculo de F_{ST} (Tabela 7), refletem em parte as relações entre as populações. É esperado que a população africana seja geneticamente diferente das demais populações, uma vez que a divergência entre essas populações ocorreu há bastante tempo. A miscigenação também pode explicar por que a população curitibana difere das demais populações. A semelhança entre a população oriental e as populações indígenas observada é esperada, uma vez que essas populações são mais próximas geneticamente que as demais populações. As populações ameríndias também apresentam certa diferença entre si, fato que reflete as diferentes histórias evolutivas destas populações, que permaneceram isoladas umas das outras.

Embora nenhuma afirmação conclusiva possa ainda ser feita acerca das frequências dos diferentes alelos nas populações estudadas, a maior similaridade na distribuição dos alelos, particularmente do grupo de alelos ativadores, evidenciada entre as populações ameríndias, está de acordo com a relação entre essas populações, uma vez que as populações ameríndias são originárias, provavelmente, de uma única onda migratória vinda do nordeste asiático há cerca de 20 mil anos (FAGUNDES, KANITZ e BONATTO, 2008; FAGUNDES et al., 2008).

O teste de neutralidade seletiva *Tajima's D* mostra que há indícios de seleção balanceadora no loco *KIR3DL1/3DS1* em algumas populações, como CTBA, GND e KRC. O elevado valor de *D* verificado nestas as populações é uma evidência de que este gene evoluiu sob ação seleção balanceadora por um longo período de tempo, como também foi verificado por Norman e colaboradores (2007), estudando a diversidade global do gene *KIR3DL1/3DS1*. Nas demais populações deste estudo

o valor de P se aproxima do limiar de significância de modo que outros estudos são necessários para a compreensão da real história evolutiva deste gene nestas populações.

O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, observado em todas as populações, pode, num primeiro momento, ser atribuído ao reduzido tamanho amostral de cada população. A grande diversidade alélica dos genes *KIR* também pode ser responsável por esse desvio observado, uma vez que são conhecidos 57 alelos para o gene *KIR3DL1/3DS1*. Entretanto outras hipóteses podem ser consideradas principalmente para o desvio observado nas populações indígenas. O isolamento e o tamanho reduzido fazem que com que a ação de fatores evolutivos e demográficos, como o efeito Wahlun, que caracteriza um excesso de homozigotos, sejam mais intensos nessas populações, levando a desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, como o observado. A possibilidade de erros de genotipagem pela técnica de sequenciamento também não está descartada.

O estudo de mais indivíduos e de outros domínios do gene que possibilitem a diferenciação total dos alelos permitirá uma compreensão da verdadeira diversidade do gene *KIR3DL1/3DS1* nas populações e o entendimento das implicações funcionais dessa diversidade.

6.3 LIGANTES *HLA-Bw4*

As frequências dos ligantes HLA com epítipo Bw4 ou Bw6, em números absolutos, nos indivíduos de cada população incluídos neste estudo são mostradas na tabela 9. O tamanho amostral não permitiu uma análise mais detalhada da distribuição dos diferentes alelos *KIR3DL1/3DS1* em comparação com a distribuição dos alelos HLA, que são os ligantes para o gene *KIR3DL1/3DS1*. Dentre as moléculas HLA que com epítipo Bw4, apenas as que possuem Isoleucina na posição 80 são ligantes para os receptores ativadores KIR3DS1. Apenas para as populações GND e GKW, são conhecidos os indivíduos que possuem isoleucina ou treonina na posição 80 molécula HLA. Dos 26 indivíduos sequenciados para o gene *KIR3DL1/3DS1* da população GND cinco possuem pelo menos uma cópia do alelo

HLA-Bw4(80I) e destes, apenas um não possui nenhum alelo ativador *KIR3DS1*, e dos 22 sequenciados para a população GWK dois indivíduos possuem pelo menos um alelo *HLA-Bw4(80I)* e ambos possuem um alelo ativador *KIR3DS1*.

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, EM NÚMEROS ABSOLUTOS, DE HLA COM EPÍTOPO BW4/6 NOS INDIVÍDUOS ANALISADOS NESTE ESTUDO EM CADA POPULAÇÃO.

População	Bw4	Bw6
GRC (n=21)	3	39
GND (n=26)	6	46
GWK (n=22)	2	40
KRC (n=23)	15	31

Para as populações africana, curitiba, oriental e KIV deste estudo não são conhecidos alelos HLA. GRC - Guarani M'byá; GND - Guarani Nandeva; GWK - Guarani Kaiowá; KRC - Kaingang de Rio das Cobras. **Fonte:** AUGUSTO, 2008.

Inúmeros indivíduos em todas as populações não possuem nenhum alelo *HLA* com epítipo *Bw4*. Na amostra analisada da população KRC a frequência dos alelos *HLA-Bw4* é maior se comparada com a frequência nas demais populações. Entretanto, esse aumento não foi relacionado ao acréscimo na frequência de nenhum alelo *KIR3DL1/3DS1* específico, já que os alelos identificados se distribuem de forma semelhante entre as diferentes populações.

7 CONCLUSÕES

Foram identificados seis novos alelos que resultam de mutações de ponto no exon 3 e no exon 5 do gene *KIR3DL1/3DS1* (*v3DS1*1D(S*14_223A>Te235G>A-ex3)*, *v3DL1*1A(741G>A-ex5)*, *v3DL1*1F(202A>G - ex3)*, *v3DL1*1G(702C>T - ex5)*, *v3DS1*1C(857C>T-ex5)* e *v3DL1*1B(309C>A-ex3)*) e um novo alelo que foi formado pela recombinação entre dois alelos já descritos (*v3DS1*1E(*S14 - recEx3)*).

As populações africana, curitibana, oriental e as cinco populações indígenas incluídas neste estudo exibem uma grande diversidade de alelos do gene *KIR3DL1/3DS1*. Essa diversidade está relacionada com a rápida evolução sofrida pelos genes *KIR* ao longo de sua história evolutiva.

Alguns alelos (ou grupos alélicos) são comuns a todas as populações, como *3DL1*00102/*003/*01502/*01702/*025*, *3DL*00201/*007/*01501/*017/*018/*031* e a nova variante *v3DS1*1D(S*14_223A>Te235G>A-ex3)*, enquanto outros são exclusivos de determinadas populações, como o alelo *3DL1*008*, que foi encontrado apenas na população GKW e o alelo **022* (ou **034*) que foi identificado apenas na população africana.

Algumas das novas variantes também são exclusivas de determinadas populações. O novo alelo *v3DL1*1A(741G>A-ex5)* foi identificado apenas na população africana. A variante *v3DS1*1E(*S14 - recEx3)* é exclusiva da população curitibana, e foi identificada em dois indivíduos que possuem ancestralidade predominantemente europeia. As variantes *v3DS1*1C(857C>T-ex5)*, *v3DL1*1F(202A>G - ex3)* e *v3DL1*1G(702C>T - ex5)* são exclusivas da população Guarani Nandeva.

As semelhanças e diferenças na diversidade e distribuição dos diferentes alelos *KIR3DL1/3DS1* observadas entre as populações deste estudo refletem em parte as relações entre essas populações. Há uma maior similaridade entre a população oriental e as populações indígenas. Por outro lado as populações africana e curitibana são as que mais diferem das demais.

Os elevados valores para o teste de neutralidade seletiva (*Tajima's D*) em todas as populações mostram que o gene *KIR3DL1/3DS1* evoluiu sob ação de seleção balanceadora por um longo período de tempo. Em nenhuma das populações estudadas há indícios de seleção direcional a favor de algum alelo *KIR3DL1/3DS1*, embora um estudo mais detalhado desse gene seja essencial para a compreensão da sua verdadeira história evolutiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTO, D. G. **Diversidade de genes *KIR* em uma população de descendência predominantemente européia.** Dissertação de Mestrado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BASHIROVA, A. A.; MARTIN, M. P.; McVICAR, D. W.; CARRINGTON, M. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: Tuning the genome defense. **Annual Reviews of Genomics and Human Genetics**, v. 7, p. 277-300, 2006.
- BAXTER, G. A.; SMYTH, M. J. The role of NK cell in autoimmune disease. **Autoimmunity**, v. 35, p. 1-14, 2002.
- BIASSONI, R.; CANTONI C.; MARRAS, D.; GIRON-MICHEL, J.; FALCO, M.; MORETTA, L.; DIMASI, N. Human Natural Killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 7, p. 376-387, 2003.
- BELTRAME, M. H. **Estudo de populações de diferentes ancestralidades e evolução de polimorfismos dos genes *CD80* e *CD86*.** Dissertação de Mestrado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- 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**, v.56, p. 417-427, 2000.
- BROWN, M.G.; SCALZO, A.A.; YOKOYAMA, W.M. **The NKC and regulation of natural killer cell mediated immunity.** In MHC-Evolution Structure and Function, ed M. Kasahara; Tokyo:Springer, p. 287-304, 2000.
- CARR, W. H.; PANDO, M. J.; PARHAM, P. KIR3DL1 Polymorphisms That Affect NK Cell Inhibition by HLA-Bw4 Ligand. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 5222–5229, 2005.
- COOK, M.A.; MILLIGAN, D.W.; FEGAN, C.D.; DARBYSHIRE, P.J.; MAHENDRA, P.; CRADDOCK, C.F.; MOSS, P.A.; BRIGGS, D.C. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. **Blood**, v. 15, p. 1521-1526, 2004.

CRUM, K.A.; LOGUE, S.E.; CURRAN, M.D.; MIDDLETON D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. **Tissue Antigens**, v. 56, p. 313-326, 2000.

DENIS, L.; SIVULA, J.; GOURRAUD, P.A.; KERDUDOU, N.; CHOUT, R.; RICARD, C; MOISAN, J.P.; GAGNE, K.; PARTANEN, J.; BIGNON, J.D. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. **Tissue Antigens**, v. 66, p. 267-276, 2005.

Di SANTO, J. P. Natural Killer cell developmental pathways: A question of balance. **Annual Reviews Immunology**, v. 24, p. 257-286, 2006.

EWING, B. AND GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 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**, 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**, v. 3, n. 9, 2008.

FLORES AC, MARCOS CY, 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. 568–576, 2007.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO (FUNAI). Disponível em: <<http://www.funai.gov.br>>. Acesso em: 20/11/2008.

GARDINER, C. M.; Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, p. 1–8, 2007.

GARDINER, C. M.; GUETHLEIN, L. A.; SHILLING, H. G.; PANDO, M.; CARR, W. H.; RAJALINGAM,; VILCHES, R. C. PARHAM, P. Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to *KIR3DL1* Gene Polymorphism. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 2992–3001, 2001.

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**, 2006.

GEOBIS INTERNATIONAL. Disponível em:
<http://www.geobis.com/mapas_africa_eng.htm>. Acesso em: 11/09/2008.

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**, v. 137, n. 2, p. 175-187, 2008.

GORDON D, ABAJIAN C, GREEN P. **Consed: a graphical tool for sequence finishing.** **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GREEN, P. Phrap: www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/phrap.htm, 1994.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, ME.; SANDOVAL-RAMIREZ, L.; DIAZ-FLORES, M.; MARSH, SG.; VALLADARES-SALGADO, A.; MADRIGAL, JA.; MEJIA-ARANGURE, JM.; GARCIA, CA.; HUERTA-ZEPEDA, A.; IBARRA-CORTES, B.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; CRUZ, M.. KIR Gene in ethnic and mestizo populations from Mexico. **Human Immunology**, v. 67, p. 85-93, 2006.

HALFPENNY, I. A.; MIDDLETON, D.; BARNETT, Y. A.; WILLIAMS, F. Investigation of Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Gene Diversity: IV. *KIR3DL1/S1*. **Human Immunology**, v. 65, p. 602–612, 2004.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41 p. 95-98, 1999.

HAO. L.; NEI, M. Rapid expansion of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in primates and their coevolution with MHC class I genes. **Gene (Elsevier)**, v. 347, p. 149-159, 2005.

HIBY, S. E.; WALKER, J. J.; O'SHAUGHNESSY, K. M.; REDMAN, C. W.G.; CARRINGTON, M.; TROWSDALE, J.; MOFFETT, A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 957–965, 2004.

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. **Immunological Reviews**, v. 190, p. 40-52, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo Demográfico**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em: 02/11/2008.

Instituto Socioambiental. Disponível em: <<http://www.socioambiental.org/website/pib/index.html>>. Acesso em: 15/11/2008.

IPD - KIR Database. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/align.html>>. Acesso em: 05/08/2008.

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

KARRE, K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, p. 221-228, 2002.

KELLEY, J.; TROWSDALE, J. Features of MHC and NK gene clusters. **Transplant Immunology**, v. 14, p. 129-134, 2005.

KHAKOO, S. I. GELLER, R.; SHIN, S.; JENKINS, J. A.; PARHAM, P. The D0 domain of KIR3D has a major histocompatibility complex class I binding enhancer. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 911-921, 2002.

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. C.; THOMAS, D. L.; CARRINGTON, M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. **Science**, v. 305, p. 872-874, 2004.

KOHLRAUSCH, F.B.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; SALZANO, F.M.; HUTZ, M.H. Geography

influences microsatellite polymorphism diversity in Amerindians. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 126, n. 4, p. 463-470, 2005.

KULKARNI, S.; R. SINGLE, M.; MARTIN, M. P.; RAJALINGAM R.; BADWE, R. JOSHI, N.; CARRINGTON, M. Comparison of the rapidly evolving KIR locus in Parsis and natives of India. **Immunogenetics**, v. 60, p. 121–129, 2008.

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

LENIER, L. L. NK cell recognition. **Annual Reviews Immunology**, v. 23, p. 225-274, 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**, v. 132, n. 2, p. 301-310. 2007.

MARTIN, M. P.; QI, Y.; GAO, X.; YAMADA, E.; MARTIN, J. N.; PEREYRA, F.; COLOMBO, S.; BROWN, E. E.; LESLEY, S. W.; PHAIR, J.; GOEDERT, J. J.; BUCHBINDER, S.; KIRK, D. G.; TELENTI, A.; CONNORS, M.; O'BRIEN, S. J.; WALKER, B. D.; PARHAM, P.; DEEKS, S. G.; MCVICAR, D. W.; CARRINGTON, M. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. **Nature Genetics**, v. 39, 2007.

MARTIN, M. P.; NELSON, G.; LEE, J. H.; PELLETT, F.; GAO, X.; WADE, J.; WILSON, M. J.; TROWSDALE, J.; GLADMAN, D.; CARRINGTON, M. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. **Journal of Immunology**, v. 169(6), p. 2818-2822, 2002.

MARTINEZ-BORRA, J.; KHAKOO, S. I. Speed and selection in the evolution of killer-cell immunoglobulin-like receptors. **International Journal Immunogenetics**, v. 35, p. 89-96, 2008.

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

MORETTA, L.; MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Current Opinion in Immunology (Elsevier)**, v. 16, p. 626-633, 2004.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 04.12.2008.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, 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**, 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**, v. 52, n. 1, p. 16-30, 2007.

NORMAN, P. J.; ABI-RACHED, L.; GENDZEKHADZE, K.; KORBEL, D.; GLEIMER, M.; ROWLEY, D.; BRUNO, D.; CARRINGTON, C. V. F.; CHANDANAYINGYONG, D.; CHANG, Y-H.; CRESP, C.; SARUHAN-DIRESKENELI, G.; FRASER, P. A.; HAMEED, K.; KAMKAMIDZE, G.; KORAM, K. A.; LAYRISSE, Z.; MATAMOROS, N.; MILA, J.; PARK, M. H.; PITCHAPPAN, R. M.; DAN RAMDATH, D.; SHIAU, M-Y.; STEPHENS, H. A. F.; M.; STRUIK, S.; VERITY, D. H.; VAUGHAN, R. W.; TYAN, D.; DAVIS, R. W.; RILEY, E. M.; RONAGHI, M.; PARHAM, P. Unusual selection on the KIR3DL1/S1 natural killer cell receptor in Africans. **Nature Genetics**, v. 39, 2007.

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

O'CONNOR, G. M.; GUINAN, K. J.; CUNNINGHAM, R. T.; MIDDLETON, D.; PARHAM, P.; GARDINER, C. M. Functional Polymorphism of the KIR3DL1/S1 Receptor on Human NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 235-241, 2007.

Oligo Analyzer 3.0. Integrated DNA Technologies. Disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>. Acesso em 05.08.2008.

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**, on line publication, 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**, v. 12, p.357-358, 1996.

PANDO, M. J.; GARDINER, C. M.; GLEIMER, M.; MCQUEEN, K. L.; PARHAM, P. The Protein Made from a Common Allele of *KIR3DL1(3DL1*004)* Is Poorly Expressed at Cell Surfaces due to Substitution at Positions 86 in Ig Domain 0 and 182 in Ig Domain. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 6640–6649, 2003.

PARHAM, P. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. **Molecular Immunology**, v. 42, p. 459–462, 2005a.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, 2005b.

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 evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americas. **Tissue Antigens**, 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**, 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**, v.51, pp.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**, v. 41, p. 227-237, 1993.

PHYLLIP. Felsenstein, J. Disponível em:
<<http://evolution.genetics.washington.edu/phyllip/getme.html> >

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**, v. 62, n. 4, p. 190-195, 2006.

Prefeitura Municipal de Curitiba (PMC). Disponível em:
<<http://www.curitiba.pr.gov.br/>> Acesso em: 20/11/2008.

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

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**, v. 54, p. 296-308, 2008.

RAJALINGAM, R.; DU Z.; MEENAGH, A.; LUO, L.; KAVITHA, V. J.; PAVITHRA-ARULVANI, R.; VIDHYALAKSHMI, A.; SHARMA, S. K.; BALAZS, I.; REED, E. F.; PITCHAPPAN, R. M.; MIDDLETON, D. Distinct diversity of KIR genes in three southern Indian populations: comparison with world populations revealed a link between KIR gene content and pre-historic human migrations. **Immunogenetics**, v. 60, p. 207–217, 2008.

ROBERTSON, M. J. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, 2002.

RODRIGUEZ, R.; TYAN, D.; PARHAM, P. Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human *KIR* Genotype. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 2307–2315, 2002.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v.19 p. 2496-2497, 2003.

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

SALTER, R. D.; CHEN, H.-W.; TADIKAMALLA, R.; LAWLOR, D. A. Domain organization and sequence relationship of killer cell inhibitory receptors. **Immunological Reviews**, v. 155, p. 175–182, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2. ed., Cold Spring Harbor laboratory Press, Plainview, 1989.

SCHILLING, H.G.; LIENERT-WIEDENBACH, K.; VALIANTE, N.M; UHRBERG, M.; PARHAM, P. Evidence for recombination as a mechanism for KIR diversification. **Immunogenetics**, v. 48, p. 413–416, 1998.

SINGLE, R. M.; MARTIN, M. P.; GAO, X.; MEYER, D.; YEAGER, M.; KIDD, J. R.; KIDD, K. K.; CARRINGTON, M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. **Nature Genetics** <<http://www.nature.com/naturegenetics>>, 2007.

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

TAJIMA, F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

THANANCHAI, H.; GILLESPIE, G.; MARTIN, M. P.; BASHIROVA, A.; YAWATA, N.; YAWATA, M.; EASTERBROOK, P.; MCVICAR, D. W.; MAENAKA, K.; PARHAM, P.; CARRINGTON, M.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S. Cutting Edge: Allele-Specific and Peptide-Dependent Interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 33–37, 2007.

THOMAS, R.; YAMADA, E.; ALTER, G.; MARTIN, M. P.; BASHIROVA, A. A.; NORMAN, P. J.; ALTFELD, M.; PARHAM, P.; ANDERSON, S. K.; MCVICAR, D. W.; CARRINGTON, M. Novel *KIR3DL1* Alleles and Their Expression Levels on NK Cells: Convergent Evolution of KIR3DL1 Phenotype Variation? **The Journal of Immunology**, v.180, p. 6743–6750, 2008.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p. 4673-4680, 1994.

TONEVA M.; LLEAPFAAYGE, V. G.; DULPHY, N.; BUSSON, M.; LESTER, S.; VU-TRIEU, A.; MICHAYLOVA, A.; NAUMOVA, E.; MCCLUSKEY, J.; CHARRON, D. Brief communication: Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue Antigens**, v. 57, p. 358–362, 2001.

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationship between MHC and NK receptor genes. **Immunity**, v. 15, p. 363-374, 2001.

TSUNETO, L.T.; PROBST, C.M.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M.; RODRIGUEZ-DELFIN, L.A.; ZAGO, M.A.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; RIBEIRO-DOS SANTOS, A.K.C.; PETZL-ERLER, M.L. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. **Tissue Antigens**, v. 62, p. 512-526, 2003.

van der SLIK, A.R.; KOELMAN, B.P.; VERDUIJIN, W.; BRUINING, G.J.; ROEP, B.O.; GIPHART, M.J. KIR in type I diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cells receptor in patients *versus* HLA-matched control subjects. **Diabetes**, v. 52, p. 2639-2642, 2003.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual Reviews Immunology**, v. 20, p. 217-251, 2002.

VIVIER, E.; NUNÈS, J. A.; VÉLY, F. Natural Killer cell signaling pathways. **Science**, v. 306, 2004.

WEG-REMERS, S.; BRENDEN, M.; SCHWARZ, E.; WITZEL, K.; SCHNEIDER, P.M.; GUERRA, L.K.; REHFELDT, I.R.; LIMA, M.T.; HARTMANN, D.; PETZL-ERLER, M.L.; de MESSIAS, I.J.; MAUFF, G. Major histocompatibility complex (MHC) class III genetics in two Amerindian tribes from Southern Brazil: the Kaingang and the Guarani. **Human Genetics**, v. 100, p. 548-556, 1997.

WILSON, M.J.; TORKAR, M.; HAUDE, A.; MILNE, S.; JONES, T.; SHEER, D.; BECK, S.; TROWSDALE, J. Plasticity in the organization and sequences of human *KIR/ILT* gene families. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 4778-4783, 2000.

YAWATA, M. N.; 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. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 633–645, 2006.

YEN, J. H.; MOORE, B. E.; NAKAJIMA, T.; SCHOLL, D.; SCHAID, D. J.; WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Major Histocompatibility Complex class I recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 1159-1168, 2001.