

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

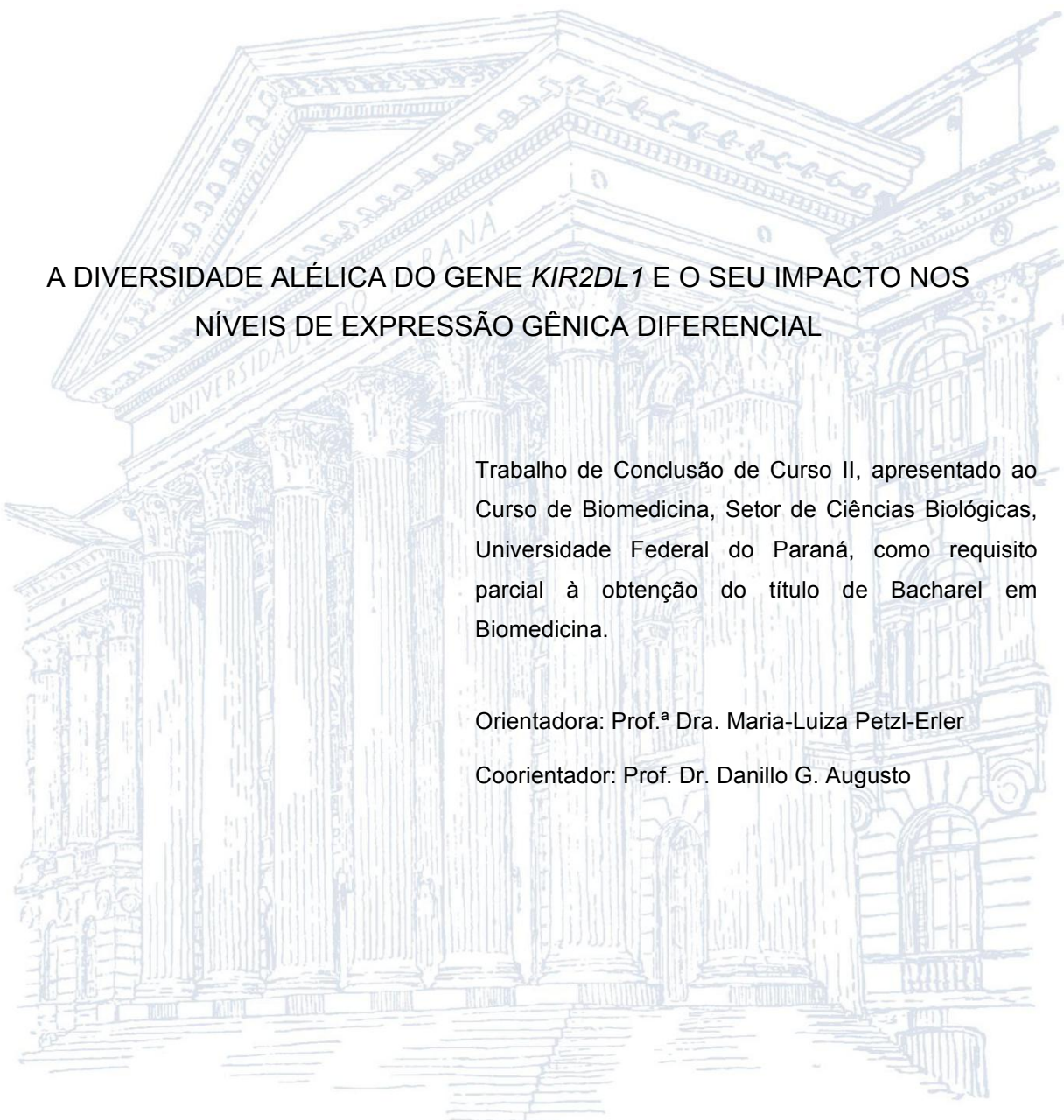
LUCIANA DE BRITO VARGAS

A DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE *KIR2DL1* E O SEU IMPACTO NOS
NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

CURITIBA

2017

LUCIANA DE BRITO VARGAS



A DIVERSIDADE ALÉLICA DO GENE *KIR2DL1* E O SEU IMPACTO NOS
NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

Trabalho de Conclusão de Curso II, apresentado ao Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria-Luiza Petzl-Erler

Coorientador: Prof. Dr. Danillo G. Augusto

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao Prof. Dr. Danillo, que com muita paciência e companheirismo me aceitou como orientanda pelos últimos três anos. Obrigada por sempre nos cobrar o nosso melhor, e escutar e responder a todos os meus "por quê?".

A Profa. Maria Luiza e todos os professores do LGMH, que estão sempre abrindo as portas do laboratório para novos alunos e fazem um trabalho admirável para manter a rigorosidade nos trabalhos realizados pelo grupo, sempre motivando nosso crescimento pessoal e profissional.

Além disso, gostaria de agradecer a Renata Dourado, Verônica Calonga Solís e Mariana Castro pela amizade e pelas inúmeras horas de ajuda nos procedimentos de citometria e sequenciamento, além de toda assistência na análise estatística e revisão de trabalhos e apresentações ao longo deste projeto. Hellen Issler, obrigada por aprender tudo tão rápido, pela prestatividade e ajuda com sequenciamento. Ao Leonardo Amorim, melhor pessoa que tira placas do mundo, por realizar a genotipagem de *HLA-C* e por ir a noite e fins de semana retirar as placas do termo e do Viia 7. A Débora Lemos pelos bons ouvidos, carinho e revisão de trabalhos, além do treinamento em técnicas do seu projeto.

A equipe do LIGH, principalmente José Samuel, Georgia e Joandrei, pela colaboração com o sequenciamento.

A Ticiania, Luana, Amanda, Gabriela, Gabriel, Tamy, Sara e toda a equipe do LGMH, com certeza a união e colaboração dentro desse grupo fortalece tanto nosso conhecimento quanto nossa amizade.

Gostaria de agradecer a minha família, meus pais Cilos e Rosália por todo o suporte com os meus estudos. Obrigada paizão por escutar e se interessar por todos os detalhes das pesquisas mesmo sem entender os detalhes em si. Também ao meu primo e amigo Diego Metz, por inúmeras horas de tutoria e incentivo para que atualmente estivesse apresentando meu trabalho de conclusão de curso em Biomedicina pela Universidade Federal do Paraná (e também por aguentar meus os inúmeros "por quês").

Por fim, agradeço ao governo federal e as agências de fomento CAPES e CNPq, que me ofereceram bolsas e outros recursos para a sólida formação científica e realização deste projeto de pesquisa.

RESUMO

Os genes dos receptores semelhantes a imunoglobulina das células *natural killer* (KIR) codificam proteínas transmembrana que medeiam a função efetora das células NK (do inglês, *natural killer*) contra células alogênicas, ou células próprias infectadas ou neoplásicas. Esse reconhecimento se dá pela interação das moléculas KIR com os antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *human leukocyte antigens*) de classe I na superfície de células-alvo. O HLA-C é uma das moléculas mais importantes na interação com KIR, sendo que as moléculas HLA do grupo C2 são reconhecidas por KIR2DL1 e contribuem para a inibição nas células NK. Nesse contexto, a diversidade genética e os níveis de expressão diferencial de *KIR2DL1* tem papel chave na atividade das células NK. Nesse trabalho, foram estudadas sete diferentes populações (duas urbanas e cinco Ameríndias dos grupos Guarani e Kaingang; n=290) com o objetivo de caracterizar a diversidade alélica de *KIR2DL1* e verificar se a variação nesse gene impacta nos padrões de expressão gênica diferencial em indivíduos da população de Curitiba (n=49), principalmente através de técnicas de sequenciamento de DNA e citometria de fluxo. Encontramos onze diferentes alelos do gene *KIR2DL1*, sendo o alelo *KIR2DL1*003* o mais frequente em todas as populações (f=0,50 a 1,00). A população de eurodescendentes de Curitiba não se agrupou com os descendentes de japoneses e ameríndios, baseado em análise de componentes principais. Dentre as populações ameríndias, a população de Guarani Ñandeva se apresentou mais distante das demais, o que corrobora estudos anteriores que mostram maiores taxas de miscigenação para essa população. Demonstramos que os níveis de expressão de KIR2DL1 na superfície celular estão associados com sua variação alélica, e também se associam com a presença do genótipo homocigoto para o ligante HLA-C2. Esses resultados podem indicar que o genótipo de HLA possivelmente influencia o desenvolvimento e educação das células NK. Além da implicação funcional de nossos achados, descrevemos pela primeira vez as frequências alélicas de *KIR2DL1* em populações brasileiras, o que fornece a base da compreensão da variação normal desse gene e sua possível implicação na susceptibilidade diferencial a doenças e na compreensão das relações evolutivas entre as famílias KIR e HLA.

Palavras chave: Células NK. *KIR2DL1*. Variabilidade alélica. Expressão diferencial.

ABSTRACT

Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes encode surface transmembrane molecules that mediate NK (natural killer) cell function against neoplastic, infected and allogeneic cells. In order to promote this response, KIR interact with human leukocyte antigens class I on the surface of target cells. HLA-C is one of the most important molecules involved in KIR recognition and is recognized by KIR2DL1, which contributes to the increasing of inhibitory signals and consequently HLA-C mediated NK-cell inhibition. Therefore, *KIR2DL1* genetic diversity and its differential expression levels are candidates to play major role on NK cell function. This study aimed to characterize *KIR2DL1* allelic diversity in seven different Brazilian populations (two urban and five Amerindians belonging to the Guarani and Kaingang groups; n=290). In order to verify the impact of *KIR2DL1* allelic variation on the receptor surface expression levels, we analyzed a set of euro-descendant individuals from Curitiba (n=50) through sequence-based typing method and flow cytometry. Eleven different alleles were found, being *KIR2DL1*003* the most frequent in all populations (f=0.50 to 1.00). Euro-descendants from Curitiba did not group with Japanese descendants and Amerindians based on principal component analysis. Among Amerindian populations, Guarani Nandeva was the most distant, which corroborates previous results that indicate miscegenation in this population. Here, we demonstrated that KIR2DL1 expression and its presence on the NK surface are associated with both *KIR2DL1* genetic variation and homozygosity for *HLA-C2* allele groups, which could be influencing NK cell education and development. Besides the functional insights, we provide the first report of *KIR2DL1* allelic frequencies in Brazilian populations, which may provide the basis for the comprehension of differential disease susceptibility and *KIR-HLA* co-evolution.

Key-words: NK cells. *KIR2DL1*. Allelic diversity. Expression levels.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 CÉLULAS <i>NATURAL KILLERS</i> (NK)	13
2.2 RECEPTORES SEMELHANTES A IMUNOGLOBULINA DE CÉLULAS NK (KIR)	15
2.3 GENES KIR	17
2.4 GENE <i>KIR2DL1</i>	21
2.5 POPULAÇÕES AMERÍNDIAS	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	25
4.2 GENOTIPAGEM DE PRESENÇA E AUSÊNCIA DO GENE <i>KIR2DL1</i>	26
4.3 ENSAIO DE CITOMETRIA	27
4.3.1 Coleta e separação do PBMC	27
4.3.2 Marcação das células	28
4.3.3 Estratégia de gates	28
4.3.4 Obtenção dos resultados	29
4.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>KIR2DL1</i>	29
4.5 GENOTIPAGEM PARA DISTINÇÃO DOS GRUPOS ALÉLICOS DE HLA-C	31
4.6 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL	32
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO 1	79

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - CONJUNTO DE RECEPTORES KIR, DESTACANDO SEUS DOMÍNIOS EXTRACELULARES E MOTIVOS BASEADOS EM TIROSINA.....	16
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DO <i>LOCUS</i> DE KIR NA REGIÃO LCR NO CROMOSSOMO 19.	18
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DE DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE PRESENÇA DE GENES KIR, SEPARANDO REPRESENTANTES DOS HAPLOGRUPOS A E B.	20
FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>KIR2DL1</i>	21
FIGURA 5 - ESTRATÉGIA DE GATES PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS NK E QUANTIFICAÇÃO DE <i>KIR2DL1</i>	29
FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>KIR2DL1</i>	31
FIGURA 7 - RELAÇÕES EVOLUTIVAS ENTRE ALELOS DO GENE <i>KIR2DL1</i>	43
FIGURA 8 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE <i>KIR2DL1</i> NA POPULAÇÃO DE AMERÍNDIOS GUARANI KAIOWÁ (GKW).	44
FIGURA 9 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE <i>KIR2DL1</i> NA POPULAÇÃO DE GUARANI ÑANDEVA (GND).....	45
FIGURA 10 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE <i>KIR2DL1</i> NA POPULAÇÃO DE KAINGANG DE RIO DAS COBRAS (KRC).	46
FIGURA 11 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE <i>KIR2DL1</i> NA POPULAÇÃO DE DESCENDENTES DE JAPONESES (OR).	47
FIGURA 12 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE <i>KIR2DL1</i> NA POPULAÇÃO DE EURODESCENDENTES DE CURITIBA (CWB).	48
FIGURA 13 – GUARANI ÑANDEVA NÃO SE AGRUPOU COM OUTROS GUARANIS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	52
FIGURA 14 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE <i>KIR2DL1</i> DE ACORDO COM DIFERENTES ALELOS.	54
FIGURA 15 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE <i>KIR2DL1</i> EM HEMIZIGOTOS E HOMOZIGOTOS.	55
FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE <i>KIR2DL1</i> DE ACORDO COM O SNP rs34721508 (C>T), QUE CAUSA SUBSTITUIÇÃO NÃO-SINÔNIMA DE CISTEÍNA POR ARGININA NA POSIÇÃO 245.....	55

FIGURA 17 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE KIR2DL1 DE ACORDO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>HLA-C</i>	56
FIGURA 18 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EXPRESSANDO KIR2DL1 DE ACORDO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>HLA-C</i>	57

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS SETE AMOSTRAS ESTUDADAS.	26
TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA TIPAGEM DA PRESENÇA DE <i>KIR2DL1</i> POR PCR-SSP.	27
TABELA 3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS LONGOS (A E B) DE <i>KIR2DL1</i>	31
TABELA 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA O SEQUENCIAMENTO POR ÉXON DE <i>KIR2DL1</i>	31
TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS COM BASES LNA PARA A GENOTIPAGEM DE GRUPOS ALÉLICOS DE HLA-C.	32
TABELA 6 - OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PCR EM TEMPO REAL DE <i>KIR2DL1</i>	33
TABELA 7 - SÍTIOS VARIÁVEIS ANALISADOS PARA DETERMINAÇÃO ALÉLICA DE <i>KIR2DL1</i>	39
TABELA 8 - FREQUÊNCIA DE PORTADORES DE CADA ALELO DE <i>KIR2DL1</i>	41
TABELA 9 – NEM TODOS OS INDIVÍDUOS DE CURITIBA APRESENTARAM DUAS CÓPIAS DO GENE <i>KIR2DL1</i>	42
TABELA 10 – <i>KIR2DL1*002</i> E <i>KIR2DL1*003</i> FORAM OS ALELOS MAIS FREQUENTES NA AMOSTRA POPULACIONAL DE CURITIBA.	42
TABELA 11 - VALORES DE DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE <i>KIR2DL1</i> NAS SETE POPULAÇÕES ESTUDADAS.	50
TABELA 12 - A FREQUÊNCIA ALÉLICA DE <i>KIR2DL1</i> NA POPULAÇÃO DE EURODESCENDENTES DE CURITIBA É DIFERENTE DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE OUTRAS POPULAÇÕES PREVIAMENTE DESCRITAS.	50
TABELA 13 - A FREQUÊNCIA DE PORTADORES DE <i>KIR2DL1</i> NA POPULAÇÃO DE EURODESCENDENTES DE CURITIBA É SIMILAR A OUTROS EURODESCENDENTES, MAS DIFERENTE DE AMERÍNDIOS, ASIÁTICOS E AFRICANOS.	51
TABELA 14 - TESTES DE NEUTRALIDADE SELETIVA PARA <i>KIR2DL1</i> NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.	53
TABELA 15 - EFEITOS REGULATÓRIOS PREDITOS DE SNPS DE <i>KIR2DL1</i> ASSOCIADOS COM EXPRESSÃO PROTEICA (P<0,001).	58

1 INTRODUÇÃO

Os genes da família *KIR* (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) codificam os receptores semelhantes a imunoglobulina presentes na superfície das células NK (*natural killer*) e NKT (linfócitos T citotóxicos). As células NK são linfócitos grandes e granulares, importantes para a imunidade inata e adaptativa, que reconhecem células infectadas, neoplásicas e, na ocorrência de transplantes, células alogênicas (BIRON, 1997; HAYAKAWA, 2006). As moléculas KIR podem ser ativadoras ou inibidoras da resposta da NK, e reconhecem antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I. Essa interação pode gerar uma resposta global de ativação ou inibição das células NK, modulando sua atividade citotóxica (PEGRAM et al., 2011).

Os genes KIR se localizam na região genômica 19q13.4 (WENDE et al., 1999). Existem vários níveis de diversidade *KIR*, sendo mais estudado o incomum polimorfismo de presença e ausência de genes. Diferente da maior parte dos genes, *KIR* podem estar presentes ou ausentes no cromossomo, o que gera uma grande diversidade de haplótipos de conteúdo gênico. Ainda, cada gene apresenta elevado polimorfismo alélico, o que aumenta ainda mais a complexidade da variação genética dessa família. Em decorrência, é muito pouco provável encontrar dois indivíduos não relacionados geneticamente que possuam as mesmas variantes *KIR*. Somada a essa grande diversidade, os genes *KIR* apresentam uma expressão variegada e aleatória na superfície celular, o que significa que nem todas as células NK de um mesmo indivíduo apresentam as mesmas moléculas KIR na superfície celular. Soma-se ainda o fato de que cada indivíduo pode ou não apresentar ligantes HLA específicos para cada KIR, já que os genes HLA estão localizados no cromossomo 6 e segregam-se independentemente dos genes KIR. Dessa forma, indivíduos podem ou não apresentar genes KIR, e mesmo que apresentem, podem não possuir o ligante HLA que o tornaria funcional.

Essa complexa combinação de genótipos de *KIR* e de seus ligantes HLA já foi associada com doenças autoimunes, susceptibilidade a infecções virais, e câncer (RAJAGOPALAN & LONG, 2005), estando ainda envolvida no processo de placentação (TROWSDALE & MOFFETT, 2008; XIONG et al., 2013) e tendo também grande importância nos transplantes terapêuticos (COOLEY et al., 2010).

Dentre as moléculas HLA de classe I clássicas, HLA-C apresenta os níveis de expressão proteica mais baixos (APPS et al., 2015), possivelmente pela sua especialização em modular a função das NK (AUGUSTO & PETZL-ERLER, 2015; OLDER AGUILAR et al., 2010). Já foi demonstrado que KIR2DL1 é o ligante de HLA-C que desencadeia resposta inibidora mais forte dentre os receptores KIR (NORMAN & PARHAM, 2005; MOESTA et al., 2008). Isso justifica a escolha do gene *KIR2DL1* nesse estudo, que é assim nomeado por sua proteína possuir dois domínios de imunoglobulina extracelulares (2D) e um domínio citoplasmático longo (L de *long*, em inglês, longo) com função inibidora (IVARSSON et al., 2014).

Dentre os vários níveis de polimorfismo de *KIR*, a variação de presença e ausência é a mais bem caracterizada (GUINAN et al., 2010). Em contrapartida, a diversidade alélica de *KIR* ainda é pouco conhecida e estudada em populações, sobretudo as não europeias. Atualmente, já foram descritos 26 alelos de *KIR2DL1* no banco de dados IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010), sendo que sabe-se muito pouco sobre o impacto da variação alélica na expressão gênica diferencial de KIR2DL1. Nesse trabalho, foi estudado o gene *KIR2DL1* com relação a seu polimorfismo de presença e ausência, seu polimorfismo alélico e a avaliação do possível impacto da variação alélica na expressão gênica diferencial, levando em consideração o contexto da presença do ligante HLA-C2.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÉLULAS *NATURAL KILLERS* (NK)

As células NK são linfócitos grandes e granulares do sistema imune, classificados tradicionalmente como componentes do sistema imune inato, mas que tem demonstrado grande importância tanto na imunidade inata quanto adaptativa. Reconhecem, principalmente, células infectadas e neoplásicas (BIRON, 1997; HAYAKAWA, 2006). Devido a sua capacidade natural de atacar sem necessitar de um sinal de ativação – somente a falta de inibição já é suficiente – foram nomeadas de células assassinas naturais, ou ainda exterminadoras naturais (do inglês, *natural killer cells*) (PARHAM, 2004).

Fenotipicamente, a caracterização de células NK pode ser feita pela presença de proteínas em sua superfície, que constituem os marcadores de diferenciação. Na superfície das células NK, há a presença dos marcadores CD56 e CD16 e ausência de expressão de CD3. O CD16 é um receptor Fc, responsável pela resposta mediada por anticorpo das células NK. O CD56 (do inglês, *cluster of differentiation 56*), é uma proteína de adesão celular já descrita em células NK, neurônios e subtipos de células T CD4+ e CD8+. O CD3 (do inglês, *cluster of differentiation 3*) é um correceptor necessário para ativação de células T e, portanto, marcador desse subtipo celular. A ausência do CD3 é avaliada pois faz a diferenciação entre células NK e células T, que não podem ser diferenciadas pelos outros marcadores (DUNPHY et al., 2015; LANIER et al., 1989).

A função efetora das NK está relacionada a exocitose de vesículas que contém moléculas líticas, como perforinas e granzimas. Essas formam poros na membrana da célula alvo, que alteram sua permeabilidade e contribuem para lise osmótica, bem como no desencadeamento de processos pró-apoptóticos. Além disso, tem como função ainda a liberação de citocinas e quimiocinas, que atraem outras células do sistema imune (LANIER, 2008; SMYTH et al., 2005)

Uma vez que a célula NK é ativada, ela é capaz de estabelecer múltiplos contatos breves com diversas células, tendo por isso, sido chamadas não só de assassinas naturais, mas também de assassinas em série (do inglês, *serial killers*). Nesses contatos, as células NK levam à lise a grande maioria das células que

atacam e são capazes de sobreviver a diversos ataques nesses meios líticos, com depleção e restauração temporal do seu estoque de perforinas e granzimas (BHAT & WATZL, 2007).

Os receptores das NK podem gerar sinais ativadores ou inibidores, e são ativados mediante a uma 'sinapse imunológica', em que há a ligação simultânea de vários receptores de células NK a vários ligantes na célula-alvo. A desregulação no balanço de sinais de ativação e inibição mediada por esses receptores é responsável pela função efetora da célula, o que gera uma resposta imune citotóxica ou de secreção de citocinas. Embora esteja bem caracterizada sua capacidade de agir sem necessitar de um sinal de ativação, e somente a falta de inibição, atualmente sabe-se que a regulação da ativação das células NK é mais complexa do que isso, e é altamente regulada por sinais ativadores e inibidores (MACE et al., 2014; PARHAM, 2004).

Mesmo sendo linfócitos, as células NK diferem por não possuírem receptores TCR, sendo, portanto, timo independentes. Os receptores de células NK (NKR) pertencem a duas classes de receptores principais, os semelhantes a lectina, como Ly49 e NKG2, e os semelhantes a imunoglobulina, os KIR (UHRBERG et al., 2001). Esses receptores interagem predominantemente com regiões oligomórficas de moléculas HLA próprias, mas também com outras moléculas, como CD58, CD66 e CD99, que são moléculas reguladoras do sistema imune (LANIER, 2008).

Os receptores KIR interagem com moléculas HLA de classe I na superfície de outras células. As células normais apresentam um perfil de expressão de HLA reconhecido como normal na superfície celular. Essa expressão normal de HLA é reconhecida pelas células NK predominantemente na forma de sinais inibidores. Isso gera uma inibição global das células NK, o que as impede de atacar células saudáveis, impedindo uma resposta autoimune (KIM et al., 2005; PARHAM, 2004).

Já células não-próprias, infectadas ou neoplásicas, normalmente apresentam um perfil de expressão de HLA diferente na sua superfície. Essas alterações normalmente levam à redução da expressão de HLA, o que desregula o balanço de sinais das células NK e promove a sua ação citotóxica. A hipótese do "*missing self*" ou "perda do próprio" sugere que, quando isso acontece em uma célula, as células NK são menos inibidas pela redução anormal nos níveis de HLA. Além disso, para que uma célula NK possa atacar uma célula alterada, é necessária a sinalização de pelo menos um KIR inibidor. Esse fenômeno é conhecido como

licenciamento (por alguns, também chamado de educação) das células NK, em um modo de indução de auto-tolerância essencial na distinção do próprio e do não-próprio (KARRE et al., 1986; KIM et al., 2005).

O reconhecimento da perda do próprio, juntamente com o licenciamento, gera um mecanismo de proteção a infecção por patógenos, que evadem a resposta de linfócitos T CD8+ por suprimirem a expressão de receptores HLA nas células infectadas, mas não são capazes de evadir a resposta de células NK. Em contrapartida, as células NK podem reconhecer essas células também pela superexpressão de moléculas HLA ligantes de NKR ativadores (PARHAM, 2004). Sendo assim, tanto a ativação quanto a inibição de células NK são processos importantes na resposta inata contra patógenos (PARHAM, 2004; PEGRAM et al., 2011; ILCHESES & PARHAM, 2002)

Apesar de sua resposta abranger principalmente a linha de defesa primária, com uma resposta aguda potente, existem várias características de células NK associadas com a imunidade adaptativa. Dentre elas, estão a expansão clonal após a ativação, o fato dessas células continuarem circulantes mesmo após a cessão da resposta, bem como a capacidade de reativação dessas células de "memória" frente a um novo estímulo (ORR & LANIER, 2008; SUN et al., 2009)

2.2 RECEPTORES SEMELHANTES A IMUNOGLOBULINA DE CÉLULAS NK (KIR)

Os receptores semelhantes a imunoglobulina de células NK (KIR) receberam este nome por terem sido primeiramente descritos nesse conjunto de células. Porém, são também encontrados em uma subpopulação de linfócitos T, as células NKT (UHRBERG et al., 2001). Os sinais inibidores desses receptores em células T podem afetar as funções mediadas pelos receptores de células T (TCR), induzindo tolerância nesses subtipos celulares (IKEDA et al., 1997). São receptores de membrana, que possuem domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulina, uma região transmembrana e um domínio intracelular efetor. Assim, os receptores KIR são nomeados pelo Comitê de Nomenclatura HUGO (do inglês, *Human Genome Organization*) de acordo com: a quantidade de domínios semelhantes a imunoglobulina extracelulares (D), que podem ser dois ou três (2D ou 3D); e de

acordo com a estrutura do seu domínio citoplasmático, que pode ser curto ou longo (S, do inglês *short* ou L, do inglês, *long*).

A função ativadora ou inibidora de KIR está associada a motivos específicos baseados em tirosina em seu domínio citoplasmático (FIGURA 1). Os domínios longos estão geralmente associados a motivos inibidores baseados em tirosina (ITIMs, do inglês *immune tyrosine-based inhibitory motifs*), enquanto os domínios curtos geralmente se associam a moléculas adaptadoras DAP (DAP10 ou DAP12), que contém motivos ativadores baseados em tirosina (ITAMs, do inglês *immune tyrosine-based activating motifs*) (VILCHES & PARHAM, 2002). A exceção é KIR2DL4, que apesar de ter domínio longo, transduz sinais inibidores e ativadores, com função ativadora preponderante (FAURE & LONG, 2002).

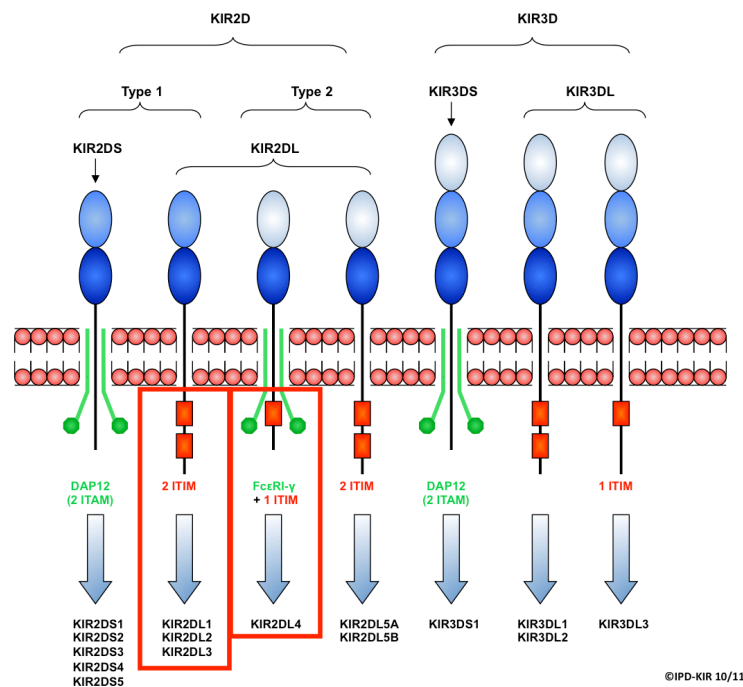


FIGURA 1 - CONJUNTO DE RECEPTORES KIR, DESTACANDO SEUS DOMÍNIOS EXTRACELULARES E MOTIVOS BASEADOS EM TIROSINA.

Os domínios em vermelho são correspondentes aos ITIM e em verde são representados os domínios ITAM. Estão destacados o receptor KIR2DL4, que possui domínio curto e atividade inibidora, e o receptor KIR2DL1, abordado nesse estudo. Fonte: IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010), modificado pelo autor (2017).

O motivo ativador imune baseado em tirosina (ITAM) contém um resíduo de aspartato que ajuda na associação desse receptor, quando estimulado, com outros receptores de cargas elétricas opostas (FENG et al., 2005). Formam um complexo que permite a fosforilação dos resíduos de tirosina, que desencadeiam uma cascata ativadora de mecanismos citotóxicos. Com isso, os receptores ativadores são capazes de promover a reorganização do citoesqueleto e a liberação de grânulos contendo perforinas e granzimas, bem como a ativação da transcrição de genes de citocinas e quimiocinas e a proliferação das células NK (LANIER, 2008; SMYTH, 2005).

Já o motivo inibidor imune baseado em tirosina (ITIM) tem seus resíduos de tirosina fosforilados quando os receptores inibidores encontram seus ligantes, e são capazes de recrutar uma cascata de fosforilação que culmina na desfosforilação de tirosinas quinases associadas aos receptores ativadores (LANIER, 2008; SMYTH, 2005). Portanto, sua função inibidora consiste na própria supressão da ativação dos receptores ativadores.

A combinação de genes *HLA* e *KIR* já foi relacionada com várias doenças, como a síndrome da imunodeficiência humana (aids) (MARTIN et al., 2002), infecção pelo vírus da Hepatite C (KHAKOO et al., 2004), neoplasia cervical induzida pelo papilomavírus humano (CARRINGTON et al., 2005), artrite psoriática (NELSON et al., 2004), diabetes tipo I (VAN DER SLIK et al., 2003), pré-eclâmpsia (HIBY et al., 2004) e pênfigo foleáceo (AUGUSTO et al., 2015) (revisado por RAJAGOPALAN e LONG, 2005). Isso sugere que as interações dos receptores KIR com seus ligantes são os maiores responsáveis pela modulação da resposta das células NK.

2.3 GENES KIR

A família *KIR* contém 16 *loci* de genes localizados no complexo de receptores leucocitários (LCR) humanos, na região genômica 19q13.4 (WENDE et al., 1999), representado na FIGURA 2. Essa família tem como particularidades a proximidade física dos seus genes dentro do *locus*, a similaridade de suas regiões intergênicas, bem como a presença de vários elementos repetitivos e sítios CpG nas suas sequências. A diversidade de genes *KIR* é caracterizada pelo polimorfismo de presença e ausência, levando a um polimorfismo haplotípico com relação ao seu

conteúdo de genes, por polimorfismos alélicos e ainda por uma expressão alélica diferencial e variegada (UHRBERG, 2005; PARHAM, 2004).

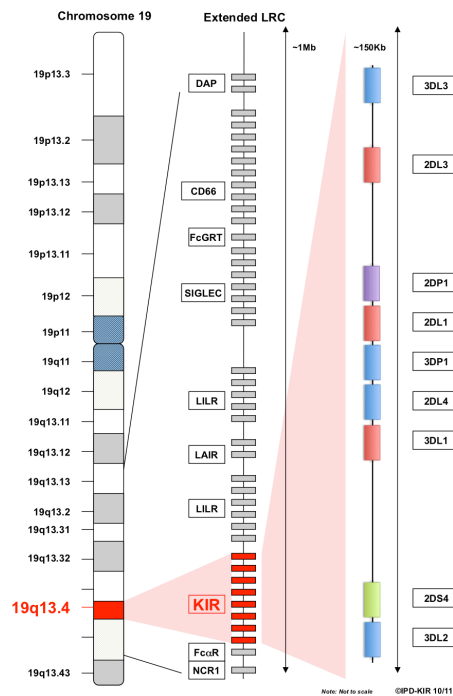


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DO LOCUS DE KIR NA REGIÃO LCR NO CROMOSSOMO 19.

Fonte: IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010).

A variação de ausência e presença gera grande diversidade de haplótipos de conteúdo gênico, que podem ser classificados em dois grandes grupos: haplogrupos A e B (FIGURA 3). O haplogrupo A contém um número normalmente fixo de sete genes e dois pseudogenes. Possui apenas um gene ativador de cauda curta clássico, o *KIR2DS4*, além do *KIR2DL4* que é ativador mas possui cauda citoplasmática longa. É portanto um haplótipo com maior potencial inibidor. Já o haplogrupo B contém uma maior combinação de haplótipos, podendo apresentar de um a seis genes ativadores (PARHAM, 2008; UHRBERG, 2002; VALIANTE et al., 1997). Esses dois haplogrupos foram encontrados em todas as populações estudadas até o momento, mas suas frequências variam muito entre populações. Por exemplo, em japoneses existe uma frequência de 80% do haplótipo A (YAWATA et al., 2006) e em aborígenes australianos a frequência deste haplogrupo é de 2% (TONEVA et al. 2001). Sugeriu-se ainda que o haplogrupo A está mais relacionado a

imunidade e o haplogrupo B é mais especializado na reprodução e combate a patógenos (PARHAM et al., 2008).

Existem genes com presença constitutiva em ambos os haplogrupos, que são *KIR2DL3*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2*, e ainda o pseudogene *KIR3DP1*, que são chamados de genes moldura. Esses genes se localizam nas extremidades (*KIR3DL3* e *KIR3DL2*) e no meio (*KIR2DL4* e *KIR3DP1*) do *locus* de genes *KIR* (VILCHES & PARHAM, 2002), definindo dois intervalos onde há variação no número de genes. O intervalo centromérico é delimitado pelos genes *3DL3* e *3DP1*, enquanto os genes *2DL4* e *3DL2* margeiam o segmento telomérico (FIGURA 3). Alguns genes nesses intervalos podem ser duplicados e raramente, algum gene moldura não está presente. A variação no número de genes nos haplogrupos *KIR* é explicada pela similaridade e proximidade física das sequências dos genes *KIR*, que permitem maior ocorrência de eventos de duplicação e recombinação não recíproca (HSU et al., 2002; MARTIN et al., 2003; VILCHES e PARHAM, 2002; WILSON et al., 2000).

Uma das dificuldades geradas na identificação da presença e ausência de genes e portanto, da identificação dos haplótipos, é o fato da ausência ser recessiva (UHRBERG, 2002). Em outras palavras, quando um gene está presente, não se consegue saber se ele está em apenas um ou nos dois cromossomos. Isso se deve às limitações das técnicas de detecção desses genes. Em outras palavras, não é possível identificar com precisão os haplótipos *KIR*, a menos que sejam feitos estudos em famílias ou se utilize técnicas de sequenciamento de identificação de fase.

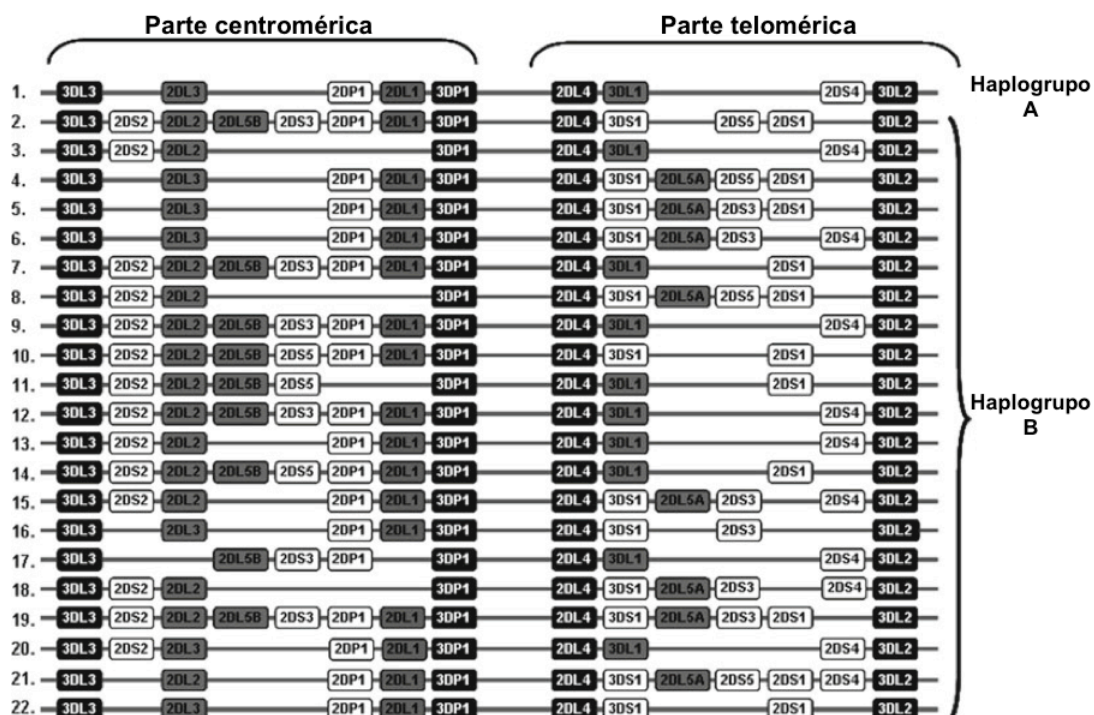


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DE DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE PRESENÇA DE GENES KIR, SEPARANDO REPRESENTANTES DOS HAPLOGRUPOS A E B.

Fonte: RAJALINGAM (2012) Adaptado pelo autor (2017).

Ao contrário de receptores de outros linfócitos, como células T e B, os genes de receptores de células NK não sofrem processos de rearranjo gênico para gerar diversidade entre as células. Em contrapartida, possuem diversidade de expressão variegada de seus receptores na superfície. Sugeriu-se que as células NK são inicialmente originadas com alto nível de metilação na região dos genes *KIR*, e que, durante a maturação, adquirem um estado de cromatina aberta, em que há a desmetilação aleatória de genes, com exceção do gene *KIR2DL4*, que marca o início do processo. Como consequência, cada clone de células NK expressa um subconjunto diferente de moléculas KIR em sua superfície (ORR & LANIER, 2008; UHRBERG, 2005).

Além disso, os receptores KIR não silenciados tem uma expressão diferencial na superfície das células NK, mas não se sabe ao certo o que controla essa expressão. O que é conhecido é que o polimorfismo alélico de alguns genes *KIR* influencia sua expressão na superfície, e o genótipo de *HLA* influencia a expressão de certos receptores, como na combinação de *HLA-C1* e *KIR2DL3* (DUNPHY et al., 2015).

2.4 GENE *KIR2DL1*

O gene *KIR2DL1* é um gene que pode ser presente ou ausente, sendo observado com frequências de presença que abrangem um intervalo de 83% em palestinos (NORMAN et al., 2001) até 100% em algumas populações de asiáticos (YAWATA et al., 2006). A frequência mais baixa desse gene em uma população brasileira foi em indígenas Guarani, com frequência de 84% (AUGUSTO et al., 2013). O gene é composto de 9 éxons, sendo um deles um pseudoéxon, o éxon 3 (FIGURA 4). Esse pseudoéxon surge por uma variante que introduz um códon de parada. Em outros genes, esse éxon é responsável pela codificação do domínio D0, e foi silenciado não só em *KIR2DL1* como também em outros genes *KIR* que codificam receptores com dois domínios, como *KIR2DL1-3* e *KIR2DS1-5*. A ausência de D0 seria responsável por conferir a essas proteínas a capacidade de se ligar a moléculas HLA-C (VILCHES et al., 2000).

O receptor *KIR2DL1* interage com moléculas HLA-C do grupo C2, que contém um resíduo de asparagina na posição 77 e lisina na posição 80 (PARHAM, 2004). O HLA-C2 é reconhecido por *KIR2DL1*, mas também pelo receptor ativador *KIR2DS1*, e observa-se ainda baixo reconhecimento cruzado deste com *KIR2DL2* e *KIR2DL3*. Dentre esses três, o *KIR2DL1* é o receptor que se liga com mais afinidade e especificidade ao HLA-C2 (MOESTA et al., 2008), enquanto *KIR2DL2* e *KIR2DL3* reconhecem HLA-C do grupo C1. Já foi demonstrado ainda que a expressão de *KIR2DL1* altera a capacidade citotóxica das células NK, causando menor inibição quando em níveis mais baixos e um consequente aumento na atividade citolítica dessas células (XUE et al., 2013).

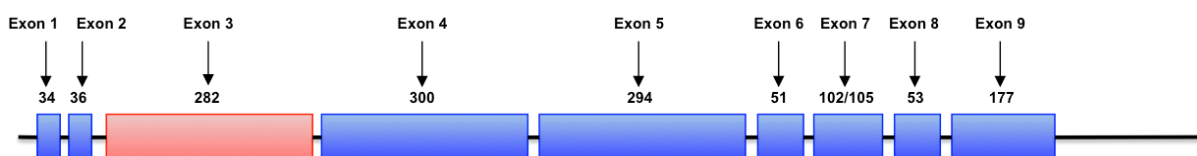


FIGURA 4 - ORGANIZAÇÃO DO GENE *KIR2DL1*.

As setas indicam cada um dos éxons e o número representa a quantidade de aminoácidos na proteína codificados por cada éxon. A caixa em vermelho representa o pseudoéxon 3. Fonte: IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010).

2.5 POPULAÇÕES AMERÍNDIAS

Populações isoladas são importantes para o estudo de genética de populações humanas e para a compreensão da diversidade normal da espécie. As populações ameríndias são especialmente importantes, pois podem ajudar a entender a história das migrações e povoamentos das Américas.

Várias das populações ameríndias continuaram isoladas ao longo de gerações, em função principalmente de barreiras culturais e de linguagem. O fluxo gênico entre as populações ameríndias e não-ameríndias do presente estudo foi estimada por TSUNETO et al. (2003), com base nas frequências de alelos dos genes *HLA*. Foi estimado que a população de Guarani Ñandeva possui a taxa de fluxo gênico mais alta (14,3%), seguido das populações Kaingang (7,2%) e Guarani M'byá (3,7%). Nesse mesmo estudo, não foi encontrada evidência de fluxo gênico na população de Guarani Kaiowá.

Com relação a origem das populações ameríndias, há fortes evidências de que essas são descendentes de populações do nordeste asiático. As populações asiáticas teriam migrado do continente asiático para as Américas através do Estreito de Bering, em três diferentes ondas de migração. A onda de migração responsável pelo povoamento da América do Sul teria ocorrido a partir de uma população ancestral denominada paleoíndios, ou "primeiros homens". Novas evidências sugerem que a origem dos povos da América podem ter influências também da Australasia (que inclui a Austrália, Melanésia e ilhas do Sudeste Asiático), porém essa influência é muito inferior à das populações do nordeste asiático. Todas as análises indicam que os ameríndios atuais são mais próximos geneticamente das populações asiáticas (REICH et al., 2012; SKOGLUND et al., 2015) do que de populações de qualquer outra região geográfica.

Foram selecionadas cinco populações ameríndias brasileiras para esse estudo, que pertencem a dois grupos étnicos principais, os Guarani e os Kaingang. Os ameríndios Guarani são indígenas que tem como língua o Tupi-Guarani. As populações Guarani podem ser encontradas nas regiões do sul, sudeste e região central do Brasil, além de Paraguai, Argentina e Bolívia. Já os Kaingang vivem majoritariamente no sul do Brasil e sua língua nativa pertence ao grupo linguístico Gê (TSUNETO et al., 2003).

O polimorfismo de presença e ausência de genes *KIR* foi caracterizado por AUGUSTO et al. (2013) em quatro das cinco populações de ameríndios incluídas nesse trabalho. A frequência de presença do gene *KIR2DL1* foi de 84% em Guarani M'byá e Kaingang de Rio das Cobras, e 98% em Guarani Kaiowá e Ñandeva. Até o momento do presente estudo, não foram descritas frequências alélicas de nenhum dos genes *KIR* em populações ameríndias brasileiras (GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade alélica de *KIR2DL1* em sete populações de ameríndios, orientais e eurodescendentes de Curitiba e verificar se a diversidade alélica de *KIR2DL1* impacta nos níveis de expressão gênica diferencial do receptor KIR2DL1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar as frequências alélicas de *KIR2DL1* em amostras de três populações de ameríndios Guarani (Guarani Kaiowá, Guarani Ñandeva e Guarani M'byá), duas populações de ameríndios Kaingang (provenientes de Ivaí e Rio das Cobras) e duas amostras urbanas de Curitiba (PR) e região metropolitana (uma de descendentes de japoneses e outra predominante de eurodescendentes).
- Comparar as frequências das populações estudadas com outras previamente descritas.
- Verificar se os alelos encontrados de *KIR2DL1* estão associados a níveis diferenciais de expressão na superfície das células NK.
- Verificar se a presença do ligante HLA-C2 impacta nos níveis de expressão e distribuição de KIR2DL1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para análise populacional, foram selecionados 290 indivíduos de um painel de amostras do biorrepositório do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) da UFPR, subdivididos em sete populações, descritas na TABELA 1. O material biológico em estoque dessas amostras foi previamente coletado e o DNA foi extraído ao longo dos anos pelo método do Fenol Clorofórmio Álcool isoamílico, descrito por SAMBROOK et al. (1989), e estocado a -80°C. A coleta de sangue e extração de DNA ocorreu ao longo das últimas décadas e foram realizadas pela equipe do LGMH.

Para análise de expressão de KIR2DL1, foram coletadas amostras frescas de sangue periférico de 56 voluntários. O critério de seleção foi ser de ascendência predominantemente europeia e ter residência em Curitiba e região metropolitana, sem relato de nenhuma doença conhecida ou gravidez no momento da coleta. Para esse ensaio, foram coletados 8 mL de sangue em tubos VACUETTE® (*Greiner-Bio One*, Austria) contendo EDTA. A separação das células mononucleares periféricas do sangue (PBMC) foi feita utilizando o tubo de separação Leucosep™ (*Greiner Bio-One*, Austria) que contém uma membrana de separação seletiva e Ficoll Hypaque (*Sigma Aldrich*, Missouri, EUA), que permite a separação do PBMC e do plasma.

Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, ANEXO 1) admitindo que participaram voluntariamente e estavam de acordo com a utilização das amostras de sangue no projeto de pesquisa. O projeto foi registrado sob o número: 02727412.4.00000096 para a Certificação de apresentação para apreciação ética (CAAE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Universidade Federal do Paraná e o parecer de aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) é de número 505.988.

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS SETE AMOSTRAS ESTUDADAS.

Etnia	Especificação	Abreviação ¹	Idade média	Localização da no momento da coleta ²			Número amostral (n=290)
				Região	Latitude	Longitude	
Eurodescendentes	Curitiba	CWB	25,95	Curitiba/PR	-25.45	-49.22	49
Descendentes de japoneses	Curitiba	OR	30,62	Curitiba/PR	-25.45	-49.22	52
Kaingang	Rio das Cobras	KRC	-	Nova Laranjeiras/PR	-25.18	-52.32	31
	Ivaí	KIV	-	Ivaí/PR	-24.50	-51.67	36
Guarani	M'byá	GRC	-	Nova Laranjeiras/PR	-25.18	-52.32	29
	Kaiowá	GKW	25,57	Limão Verde/MG	-23.12	-55.05	40
				Amambai/MG	-23.06	-55.12	
Ñandeva	GND	-	Amambai/MG	-23.06	-55.12	53	

1 - Abreviação usada não é convenção e foi adotada apenas neste trabalho. 2 TSUNETO et al. (2003).

4.2 GENOTIPAGEM DE PRESENÇA E AUSÊNCIA DO GENE *KIR2DL1*

Trabalhos anteriores analisaram a presença de genes *KIR* na população de Curitiba (AUGUSTO et al., 2012). Os indivíduos desse presente estudo que não foram previamente genotipados tiveram a presença do gene *KIR2DL1* avaliada pelo método de PCR de sequência específica (PCR-SSP). Essa técnica utiliza dois pares de oligonucleotídeos específicos para *KIR2DL1* e um par de oligonucleotídeos específicos para o gene *DRB1* que é utilizado como controle de amplificação (TABELA 2). Esse método é capaz de identificar apenas a ausência ou presença do gene, sem distinção entre a presença em homozigose ou hemizigose.

TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA TIPAGEM DA PRESENÇA DE *KIR2DL1* POR PCR-SSP.

Gene	Oligonucleotídeos	Sequência	Tamanho fragmento (pb)
<i>KIR2DL1</i>	KIR2DL1_17B_F	CCATCAGTCGCATGACG	90
	KIR2DL1_17B_R	TCACTGGGAGCTGACAC	
	KIR2DL1_16_F	TGGACCAAGAGTCTGCAGGA	348
	KIR2DL1_16_R	TGTTGTCTCCCTAGAAGACG	
<i>DRB1</i>	DRB1_F	TGCCAAGTGGAGCACCCAA	782
	DRB1_R	GCATCTTGCTCTGTGCAGAT	

DRB1 ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO RELACIONADO AO ANTÍGENO D, CADEIA BETA 1; C: CONTROLE; F: *FORWARD* (DIRETO); R: *REVERSE* (REVERSO).

A análise dos produtos das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose banhado em TBE (Tris-Borato-EDTA), usando 2 µL de produto de PCR e 2 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol e glicerol). A concentração do gel foi de 2%, sendo submetido a uma voltagem de 80V por 60 minutos, usando o corante de DNA UniSafe (*Uniscience*, São Paulo, BR) e ainda o marcador de peso molecular de 1kb Scada® (*Sinapse Inc.*, São Paulo, BR) para analisar o tamanho dos fragmentos amplificados.

4.3 ENSAIO DE CITOMETRIA

A quantificação da expressão gênica de *KIR2DL1* foi feita através do ensaio de citometria, que permite a quantificação de células *KIR2DL1* positivas e quantificação da expressão de *KIR2DL1* na superfície dessas células.

4.3.1 Coleta e separação do PBMC

Foram coletados 8mL de sangue periférico de cada voluntário em tubo VACUETTE® (*Greiner-Bio One*, Austria) contendo EDTA. A separação das células mononucleares periféricas do sangue (PBMC) foi feita utilizando o tubo de separação Leucosep™ (*Greiner Bio-One*, Austria) que contém uma membrana de

separação seletiva e Ficoll Hypaque (*Sigma Aldrich*, Missouri, EUA), que permite a separação do PBMC e do plasma. As PBMC foram quantificadas por contagem direta em câmara de Neubauer através microscópio óptico, com a padronização de $0,5 \times 10^6$ células por ensaio de citometria.

4.3.2 Marcação das células

As células foram então marcadas com os anticorpos específicos para caracterização de células NK, o anticorpo CD56 conjugado a molécula fluorescente ficoeritrina (PE) (*Miltenyi Biotec*, Alemanha) e o anticorpo CD3 conjugado a molécula de fluorescência ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5) (*Biolegend*, Califórnia, EUA). Para cada indivíduo, a marcação das células foi feita em um primeiro ensaio com o anticorpo anti-KIR2DL1 CD158a, clone REA284, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Miltenyi Biotec*, Alemanha), e em um segundo ensaio marcado com o isotipo REA Control conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Miltenyi Biotec*, Alemanha). O isotipo é utilizado para normalizar o aumento de fluorescência devido a ligações não específicas, ou seja, ligações não induzidas pelo epítipo do anticorpo, com outras moléculas presentes nas células analisadas. As células marcadas foram analisadas no citometro de fluxo BD FACSVerserTM (*BD Biosciences*, San Jose, CA). Os resultados foram obtidos pelo software do próprio equipamento, BD FacSuiteTM (*BD Biosciences*, San Jose, CA).

4.3.3 Estratégia de gates

A partir do gráfico com os parâmetros de granulosidade (SSC - *side scatter*) e tamanho (FSC - *forward scatter*), foi selecionada a população de linfócitos, que tem granulosidade baixa (SSC^{low}) e tamanho baixo (FSC^{low}). As células NK foram caracterizadas pela presença em superfície de CD56 e ausência de CD3. Portanto, as células mononucleadas analisadas foram apenas as CD56 (PE) positivas e CD3 (PE-Cy5) negativas, que representam o subconjunto das células NK. A partir destas, foi analisada a porcentagem de células NK KIR2DL1 positivas, através da contagem de FITC positivas e negativas. Para a quantificação da expressão, foi analisado o

valor de MFI (*median fluorescence intensity*) das células positivas para FITC (anti-KIR2DL1 ou isotipo), que são células KIR2DL1 positivas ou, no caso do isotipos, células apresentando sinal inespecífico (FIGURA 5).

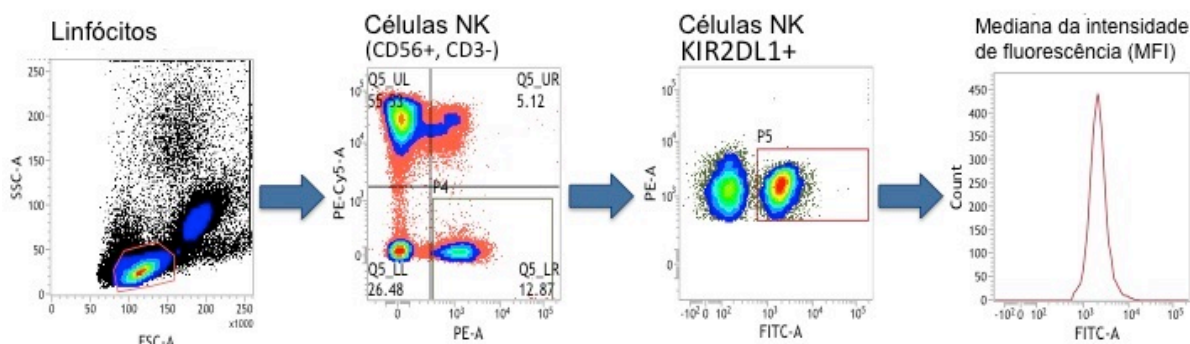


FIGURA 5 - ESTRATÉGIA DE GATES PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS NK E QUANTIFICAÇÃO DE KIR2DL1.

CD56+: células com presença de CD56 na superfície celular. CD3-: células com ausência de CD3 na superfície celular. KIR2DL1+: células com presença de KIR2DL1 na superfície celular. SSC: dispersão lateral (*side scatter*). FSC: dispersão frontal (*forward scatter*). PE: Ficoeritrina. FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

4.3.4 Obtenção dos resultados

O software BD FacSuite™ (*BD Biosciences*, San Jose, CA) permite a exportação dos gráficos e dos valores de estatística, que incluíram o número de eventos registrados, a mediana de SSC e FSC, a quantidade de células NK que foram KIR2DL1 positivas e de linfócitos KIR2DL1 positivos, além da MFI (*median fluorescence intensity*) de KIR2DL1 nas células KIR2DL1 positivas.

4.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE *KIR2DL1*

Além da tipagem de presença e ausência do gene *KIR2DL1*, foi feita a genotipagem alélica por sequenciamento pelo método de Sanger, permitindo a caracterização da extensão de polimorfismos do gene *KIR2DL1* nas populações estudadas. Para realizar a tipagem alélica desse gene, foi necessário fazer o

sequenciamento de sua região codificadora. Dos nove éxons do gene, foram selecionados apenas os éxons 1, 4, 5, 7 e 9, uma vez que o éxon 3 é um pseudoéxon e os éxons 2, 6 e 8 são não informativos para a distinção dos principais grupos alélicos. Apesar de não haver necessidade de uma reação individual para tipagem do éxon 8, a sequência desse éxon foi obtida durante o sequenciamento dos éxons 7 e 9, devido a proximidade física dos *loci*.

O processo foi otimizado utilizando a estratégia de amplificação de fragmentos longos, que dividiu o gene em dois grandes fragmentos para amplificação, sendo denominados fragmentos A e B (FIGURA 6). O fragmento A compreende os éxons de 1 a 5 e se estende por 5772 pares de base. O fragmento B compreende os éxons de 7 a 9, tendo a extensão de 2218 pares de base. O fragmento A foi amplificado utilizando o mix enzimático GoTaq® Long PCR Master Mix (*Promega*, Fitchburg, WI), que permite amplificação de até 30kb de DNA genômico humano, e o fragmento B foi amplificado utilizando Taq Platinum (*Invitrogen*, CA, EUA), a partir dos oligonucleotídeos descritos na TABELA 3.

Posteriormente, os grandes fragmentos amplificados foram utilizados para fazer o sequenciamento individual de cada éxon de *KIR2DL1*, utilizando o método de terminação de cadeia de Sanger. As reações foram realizadas em placas de reação de 96 poços Microcamp Optical (Life Technologies), usando o mix enzimático Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart v3.1 (Life Technologies), e os oligonucleotídeos descritos na TABELA 4. As condições de ciclagem foram 1 minuto a 95°C para desnaturação inicial, seguida de 25 ciclos, cada um contendo as seguintes etapas: 10 segundos a 95°C para desnaturação, 5 segundos a 50°C para hibridação e 4 minutos a 60°C para extensão.

Antes da injeção das amostras no sequenciador, estas foram ressuspensas em 10 µl de Hi-Di Formamida (Life Technologies). As leituras das sequências nucleotídicas foram realizadas por eletroforese capilar no sequenciador 3500xl Genetic Analyzer (Life Technologies), utilizando os seguintes reagentes: POP-7 Polymer for 3500/3500xl Genetic Analyzers, Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series, Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series e Conditioning Reagent 3500 Series (Life Technologies).

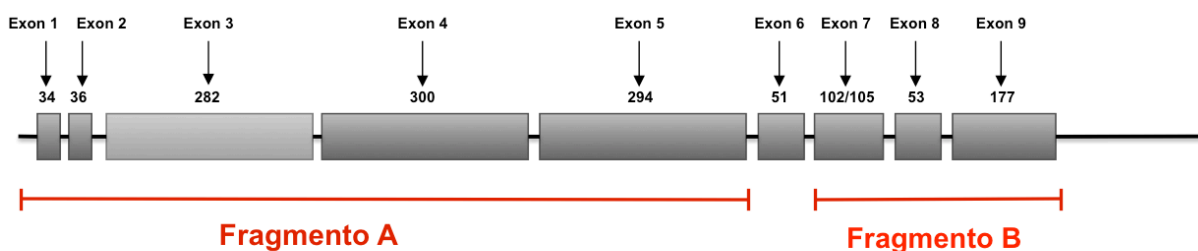


FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *KIR2DL1*.

Cada caixa cinza representa um éxon, e cada um deles está indicado por uma seta, juntamente com o seu tamanho em pares de base. O éxon 3 está em cinza claro pois é um pseudoéxon. Fonte: IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010), modificado pelo autor (2017).

TABELA 3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS LONGOS (A E B) DE *KIR2DL1*.

Fragmento	Éxons	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)
A	1 a 5	KIR2DL1_5'UTRf	CCATCAGTCGCATGACG	5772
		2DL1_Ex5_Rev	ACAAGCAGTGGGTCACCTTGAC	
B	7 a 9	2DL1_Int6_Fwd	TCACAGGAGGACAGGTGGTT	2,218
		2DL1_Int9_Rev	GCTGTTGTCTCCCTAGAAGACG	

Int: intron. Ex: éxon. F: oligonucleotídeo direto. R: oligonucleotídeo reverso.

TABELA 4 - OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA O SEQUENCIAMENTO POR ÉXON DE *KIR2DL1*.

Fragmento	Éxon	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
A	1	KIR2DL1_5'UTRf	CCATCAGTCGCATGACG
	4	2DL1_seq_Int3_Fwd	GAAGGAGAGAGATAAGACACCAGG
	5	2DL1_seq_Int4_Fwd	GAAGATCCTCCCTGAGGAAAC
C	7	2DL1_seq_Int6_Fwd	GGGTGCTTGTCTAAAGAGG
	8.9	2DL1_seq_Int7_Fwd	GCAACTGAGGGACCTCAGC

Int: intron. F: oligonucleotídeo direto. R: oligonucleotídeo reverso.

4.5 GENOTIPAGEM PARA DISTINÇÃO DOS GRUPOS ALÉLICOS DE *HLA-C*

Para definir se o contexto da expressão de *KIR2DL1* é afetada pela presença de seu ligante *HLA-C2*, foi feita genotipagem para distinção dos grupos alélicos *C1* e *C2* por curva de dissociação, utilizando os oligonucleotídeos descritos por Hong et al. (2011) e modificados com nucleotídeos LNA (do inglês, *locked*

nucleic acid) descritos na TABELA 5. Os LNA se encontram na extremidade 3' dos oligonucleotídeos e tem a vantagem de possuir uma modificação no anel da ribose que confere maior estabilidade termal e especificidade ao oligonucleotídeo, o que permite uma melhor discriminação de substituições de bases únicas em posições variáveis.

TABELA 5 - OLIGONUCLEOTÍDEOS COM BASES LNA PARA A GENOTIPAGEM DE GRUPOS ALÉLICOS DE *HLA-C*.

Grupo alélico	Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)
C1	HLA-C1 N80 F	AGCCAATCAGCGTCTCCGC+A	545
	HLA-C1 N80 R	GCTCTGGTTGTAGTAGCCGCGCAG+G	
C2	HLA-C2 K80 F	CCATTGGGTGTCGGGTTCT+A	569
	HLA-C2 K80 R	GCTCTGGTTGTAGTAGCCGCGCAG+T	

Os LNA estão indicados após o sinal (+). F: oligonucleotídeo direto. R: oligonucleotídeo reverso. pb: Pares de base.

4.6 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL

O conhecimento do número de cópias de *KIR2DL1* é fundamental para a determinação das frequências alélicas, já que o gene pode ou não estar presente no cromossomo e a ausência é recessiva (não pode ser detectada por PCR-SSP ou sequenciamento). O número de cópias de um gene pode ainda impactar nos seus níveis de expressão gênica. Para distinguir entre indivíduos homocigotos e hemizigotos para a presença do gene *KIR2DL1*, foi realizado um ensaio de PCR em tempo real para quantificação do número de cópias do gene no DNA genômico.

O ensaio foi padronizado e realizado em indivíduos da população de eurodescendentes de Curitiba, que haviam sido analisados tanto em ensaio de citometria quanto por sequenciamento (n=49). Foram selecionadas apenas as amostras que apresentaram apenas um alelo no sequenciamento (impossível de distinguir entre homocigoto e hemizigoto através de sequenciamento). Devido a alta sensibilidade do teste de qPCR, foi necessária uma padronização rigorosa da

concentração de DNA. Primeiramente, as amostras selecionadas foram quantificadas no equipamento Thermo Scientific™ NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), e diluídas em alíquotas de 20 ng/μL. A concentração dessas alíquotas foram novamente quantificadas pelo equipamento Quantus™ Fluorometer (*Promega*, Fitchburg, WI), que tem maior precisão, e diluídas proporcionalmente em alíquotas de 5 ng/μL, que foram utilizadas para quantificação do número de cópias no ensaio.

O ensaio foi realizado em triplicata para o gene alvo (*KIR2DL1*) e o gene utilizado como referência foi o *KIR3DL3*, por ser um gene moldura com número fixo de cópias. Os oligonucleotídeos iniciadores estão descritos na TABELA 6. Foi utilizada a amostra de um indivíduo heterozigoto como referência para a presença de dois alelos. A amostra de um indivíduo com ausência do gene e água deionizada foram usados como controles negativos. O reagente utilizado foi o SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO), e a reação ocorreu no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*, Foster City, CA).

TABELA 6 - OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PCR EM TEMPO REAL DE *KIR2DL1*.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	Tamanho fragmento (pb)	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
KIR2DL1_17B_F	CCATCAGTCGCATGACG	90	65°C
KIR2DL1_17B_R	TCACTGGGAGCTGACAC		
KIR3DL3_1C_F	TTCTGCACAGAGAGGGGATCA	165	
KIR3DL3_1C_R	GAGCCGACAACTCATAGGGTA		

F: oligonucleotídeo direto. R: oligonucleotídeo reverso.

4.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados do sequenciamento foram alinhados com a sequência nucleotídica de referência através do programa Mutation Surveyor® (*SoftGenetics*, PA, USA) para tipagem das posições variáveis necessárias para determinação alélica. As sequências obtidas foram inferidas manualmente com base no banco de dados IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010). A genotipagem de cada SNP e a

inferência de alelos foi feita manualmente, com base na descrição de alelos disponível no banco de dados IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010). As frequências alélicas e de portadores foram calculadas através de contagem direta.

Os resultados de PCR em tempo real foram analisados de forma manual utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A amostra de referência utilizada no ensaio possui duas cópias do gene, o que representa o nível basal 1,0. As amostras que apresentaram quantificação relativa de 0,5 foram determinadas como apresentando apenas uma cópia do gene; com base nos mesmos critérios, foi possível também detectar indivíduos que apresentaram mais que duas cópias de *KIR2DL1*. Os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ apenas foram considerados se estivessem com variação máxima de 0,15 em relação aos valores esperados para os números de cópias. Amostras que apresentaram valores com variação maiores que 0,15 aos valores esperados foram repetidas.

O desequilíbrio de ligação entre os SNPs de *KIR2DL1* foi estimado dentro de cada população utilizando o *software* Haploview (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) (FIGURAS 8-12). No gráfico, estão indicados o valor de LOD (logaritmo das chances, do inglês *logarithm of odds*), D' e o valor de r^2 (x100). Os valores de $D' < 1$ e $LOD < 2$ estão em branco, os valores de $LOD < 2$ e $D' = 1$ estão em azul, valores de $LOD \geq 2$ e $D' < 1$ estão em rosa, e por fim, os valores de $LOD \geq 2$ e $D' = 1$ estão em vermelho. O valor de LOD compara as chances de que dois marcadores em um experimento estão de fato ligados com a chance de observar esses mesmos dados por acaso. Assim, valores de LOD maiores que 3 indicam ligação e valor menores que -2.0 indicam independência. Por sua vez, o valor de D' indica a similaridade entre a frequência de dois marcadores, de certa forma é um indicativo da probabilidade de que esses marcadores sejam encontrados juntos. O valor de r^2 é o coeficiente de coincidência, e nos informa de fato quantas vezes dois marcadores são observados juntos.

As distâncias evolutivas entre os alelos de *KIR2DL1* encontrados foram calculadas através do método de probabilidade máxima de composição (*Maximum Composite Likelihood*) (TAMURA, NEI & KUMAR, 2004), e correspondem ao número de substituições de base por sítio. As distâncias foram usadas para gerar a árvore filogenética dos alelos de *KIR2DL1*, pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987), através do *software* MEGA7 (KUMAR et al., 2016). A árvore filogenética

consenso foi gerada a partir de 1000 replicatas em *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) e os ramos gerados em menos de 50% das repetições *bootstrap* foram unidos.

A análise de diferenciação genética entre as populações foi avaliada através do programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) utilizando dois testes, o valor de F_{ST} e o teste exato de diferenciação populacional (TABELA 11 e 12). Ambos os testes são baseados na variação das frequências alélicas entre diferentes populações. O teste F_{ST} (*fixation index*, do inglês, índice de fixação) calcula a variância da frequência alélica entre cada par de populações em relação a variância da frequência alélica na população total. Os valores de F_{ST} variam de 0 a 1, e indicam baixa (0 a 0,05), média (0,05 a 0,15) e alta (superiores a 0,15) diferenciação genética (WRIGHT, 1978). O teste exato de diferenciação populacional é baseado em um teste de contingência também entre pares de populações e é apresentado em valores de p com nível de significância de 0,05.

Nos testes de diferenciação genética, foram feitas as seguintes comparações:

- Frequências de portadores de *KIR2DL1* entre as sete populações estudadas (CWB, GKW, GND, GRC, KIV, KRC, OR).
- Frequências alélicas de *KIR2DL1* entre os eurodescendentes de Curitiba e entre outras três populações com frequências alélicas descritas no banco de dados *Allele frequencies.net* (GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2015), sendo essas chineses da província Han (TAO et al., 2014), africanos de Gana (NORMAN et al., 2013) e Japoneses (YAWATA et al., 2006).
- Frequências de portadores de *KIR2DL1* entre eurodescendentes de Curitiba e entre outras populações com essa mesma informação disponível no mesmo banco de dados, sendo elas populações de eurodescendentes dos Estados Unidos (GEDIL, STEINER & HURLEY, 2007), europeus do norte da Irlanda (*Ireland Northern KIR pop2*, não publicado), asiáticos hindu da Índia (RAJALINGAM et al., 2002), ameríndios Huichol do México (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2006) e africanos Ga-Adangbe de Gana (NORMAN et al., 2013).

Para estimar o padrão de distribuição da diversidade alélica de *KIR2DL1* foi realizada a análise de componente principal (PCA, do inglês, *principal component analysis*), através do *software* Minitab 17 (State College, PA). O teste foi realizado utilizando a frequência de portadores de cada alelo do gene nas diferentes populações. Esse teste calcula diversos componentes que explicam a variação

encontrada nos dados e utiliza os dois componentes com maior variância para gerar um gráfico de duas dimensões que permite comparar a similaridade entre a variação nas populações. Pode-se observar o número de componentes gerados, ou de fatores que explicam a variação, o valor de proporção, que indica a parcela da variabilidade que cada componente explica, e o valor do acumulado, que indica o quanto determinados componentes juntos explicam a variabilidade na amostra.

Para testar a hipótese de evolução neutra dos alelos de *KIR2DL1* nas populações estudadas foram feitos os testes de D de Tajima (TAJIMA, 1989), F de Fu, e D* e F* de Fu e Li (FU & LI, 1993), utilizando o *software* DnaSP v. 6 (ROZAS et al., 2017). A hipótese de neutralidade seletiva propõe que as frequências observadas sofrem variação por processos aleatórios de deriva genética, ao contrário da suposição de que estas variações seriam devidas a efeitos não aleatórios direcionais, como eventos de seleção natural. Os valores do D de Tajima próximos a 0 indicam que a população está evoluindo sem evidência de seleção, valores positivos indicam seleção balanceadora e valores negativos indicam seleção positiva. Os testes de Fu e Li (1993) consideram a genealogia dos alelos do gene para inferir frequências de mutação acima (valores negativos) ou abaixo (valores positivos) do esperado sob a hipótese de neutralidade.

Os dados de citometria foram exportados através do software BD FacSuite, que gera os dados de intensidade de fluorescência mediana (MFI) e porcentagem de células NK que são *KIR2DL1* positivas. Esses dados foram relacionados com a tipagem alélica de cada indivíduo bem como o genótipo de *HLA-C* e analisados através do programa GraphPad Prism versão 6 (*GraphPad Software, Inc., CA, USA*) utilizando os testes não-paramétricos de Kruskal Wallis e Mann-Whitney. Nesse mesmo programa foram elaborados os gráficos de mediana de expressão por genótipo. Os dados de expressão foram analisados de acordo com o conteúdo alélico de *KIR2DL1*, o número de cópias do gene e de acordo com a variante *rs34721508*, que altera a função das células NK descrita por BARI e colegas (2009).

Cada um dos SNPs genotipados nesse estudo foi individualmente analisado para verificar sua associação com a expressão de *KIR2DL1*. Os SNPs associados foram analisados *in silico* para encontrar seu potencial de regulação de expressão utilizando as seguintes ferramentas: Haploreg3 (WARD & KELLIS, 2012), Regulome DB (BOYLE et al., 2012), D de Grantham (GRANTHAM, 1974), SIFT (KUMAR et al.,

2009), PolyPhen-2 (ADZHUBEI et al., 2010) e microSNiper (BARENBOIM et al. 2010).

5 RESULTADOS

As posições analisadas e suas implicações nas sequências nucleotídica e proteica estão na TABELA 7. Todas as posições encontradas que geram substituições não-sinônimas na sequência proteica foram preditas como toleradas pelo algoritmo de SIFT, com relação a seu efeito na função da proteína (KUMAR et al., 2009). Por sua vez, as diferenças físico-químicas entre os aminoácidos substituídos apresentaram valores variáveis na escala de GRANTHAM (1974), que atribui valores gradativamente maiores quanto maior a diferença nas propriedades dos aminoácidos envolvidos. Os nucleotídeos presentes nas posições variáveis de *KIR2DL1* em cada um dos alelos encontrados nesse estudo estão na TABELA 8.

TABELA 7 - SÍTIOS VARIÁVEIS ANALISADOS PARA DETERMINAÇÃO ALÉLICA DE *KIR2DL1*

Éxon	rs	Localização ¹	Posição na sequência codificadora ²	Posição no gene ²	Nucleotídeo substituído	Aminoácido substituído	D de Grantham ³	SIFT ⁴
Exon 1	rs2304224	55281315	13	13	G>T	V>F	50	Tolerado
	rs371289444	55284821	107	3519	G>A			
Exon 4	rs35509911	55284824	110	3522	C>G	P>R	103	Tolerado
	rs687000	55284858	144	3556	A>G			
	rs750705981	55284880	166	3578	G>T			
	rs200839187	55284908	194	3606	T>A			
	rs150190837	55284944	230	3642	A>G			
	rs79002558	55284976	262	3674	A>G	S>G	56	Tolerado
	rs375614836	55285027	313	3725	A>C			
	rs687885	55285045	331	3743	G>T			
	rs138345877	55285072	358	3770	A>G	I>V	29	Tolerado
	Exon 5	rs369705644	55286625	379	5320	G>C		
rs11673144		55286650	404	5345	C>T	P>L	98	Tolerado
rs199868260		55286700	454	5395	C>T	R>W	101	Tolerado
rs111799279		55286769	523	5464	C>A	P>T	38	Tolerado
rs12982263		55286795	549	5490	T>C			
rs147072532		55286796	550	5491	G>A	D>N	23	Tolerado
rs28465191		55286822	576	5517	C>T			
rs111277046		55286844	598	5539	G>A			
rs666590		55286854	608	5549	A>G	H>R	29	Tolerado
Exon 7	rs150580082	55286867	621	5562	C>T			
	rs149300913	55294382	724	13078	C>A			
	rs750228934	55294383	725	13079	G>A			
	rs772519861	55294397	739	13093	C>G			
	rs34721508	55294454	796	13150	C>T	R>C	180	Tolerado
		55294459	801	13155	G>A			
Exon 9	rs371209191	55294471	813	13167	A>G			
	rs142331298	55295106	888	13802	C>A			
	rs145950245	55295121	903	13817	A>G			
	rs756958902	55295125	907	13821	A>G ou C	T>V ou P	69(V) / 38(P)	Tolerado
		55295126	908	13822	C>T			
	rs777200236	55295167	949	13863	C>T			
	rs201644346	55295215	997	13911	A>G			

1. Localização no cromossomo 19 descrito em *GRCh37.p13 primary assembly*. 2. Posição de nucleotídeos de acordo com o banco de dados IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010). 3. Valores de D da escala de GRANTHAM (1974) para diferenças nas propriedades físico-químicas dos aminoácidos envolvidos nas substituições. Quanto mais alto o D, maior a diferença entre os aminoácidos (de 5 a 215). 4. O algoritmo de SIFT prediz se uma substituição aminoacídica afeta a função proteica (KUMAR et al., 2009).

TABELA 8 - NUCLEOTÍDEOS PRESENTES NAS POSIÇÕES VARIÁVEIS DE *KIR2DL1* NOS ALELOS ENCONTRADOS NESSE ESTUDO

Posição na sequência codificadora ¹	EXON 1				EXON 5																
	13	107	110	144	166	194	230	262	313	331	358	379	404	454	523	549	550	576	598	608	621
rs	rs230422	rs3712	rs3550	rs687	rs7507	rs2008	rs1501	rs790	rs3756	rs6878	rs1383	rs3697	rs1167	rs1998	rs1117	rs129	rs1470	rs284	rs1112	rs66	rs1505
Referência	4	89444	9911	000	05981	39187	90837	02558	14836	85	45877	05644	3144	68260	99279	82263	72532	65191	77046	6590	80082
Alelo	G	G	C	A	G	T	A	A	A	G	A	G	C	C	C	T	G	C	G	A	C
<i>KIR2DL1*001</i>
<i>KIR2DL1*002</i>	T
<i>KIR2DL1*003</i>	.	.	G	G	T
<i>KIR2DL1*004</i>	.	.	G	A	C	A	T	.	G	.
<i>KIR2DL1*006</i>	.	.	G	T	.	.	C
<i>KIR2DL1*007</i>	.	.	G	G	A	C	A	T	.	G	.
<i>KIR2DL1*009</i>	.	.	G	G	T
<i>KIR2DL1*010</i>	.	.	G	A	C	A	T	.	G	.
<i>KIR2DL1*011</i>	T	.	G	A	C	A	T	.	G	.
<i>KIR2DL1*012</i>	.	.	G
<i>KIR2DL1*020</i>	.	.	G	G	.	.	.	G	T

Posição na sequência codificadora ¹	EXON 7				EXON 8				EXON 9					
	724	725	739	796	801	813	825	849	888	903	907	908	949	997
rs	rs149300	rs7502	rs7725	rs347	NA	rs3712	rs1435	rs586	rs1423	rs1459	rs7569	NA	rs7772	rs2016
Referência	913	28934	19861	21508	NA	09191	86661	234	31298	50245	58902	NA	00236	44346
Alelo	C	G	C	C	G	A	G	A	C	A	A	C	C	A
<i>KIR2DL1*001</i>
<i>KIR2DL1*002</i>
<i>KIR2DL1*003</i>
<i>KIR2DL1*004</i>	.	.	.	T
<i>KIR2DL1*006</i>	.	.	.	T
<i>KIR2DL1*007</i>	.	.	.	T
<i>KIR2DL1*009</i>	G	T	.	.	.
<i>KIR2DL1*010</i>
<i>KIR2DL1*011</i>	A	.	.	T
<i>KIR2DL1*012</i>
<i>KIR2DL1*020</i>

1. Posição de nucleotídeos de acordo com o banco de dados IPD-KIR (ROBINSON et al., 2010).

As frequências de portadores de cada alelo nas sete populações estudadas estão apresentadas na TABELA 9. Foi encontrado um total de 11 alelos. O alelo mais frequente foi *KIR2DL1*003* (frequência de portadores de 57 a 100%), sendo que na população de Guarani M'byá este foi o único alelo observado. A população que apresentou maior polialelismo foram os eurodescendentes de Curitiba (10 alelos), seguida dos descendentes de japoneses de Curitiba (5 alelos).

De posse da informação de número de cópias, que foi obtida através de PCR em tempo real para a população de eurodescendentes de Curitiba (CWB) (TABELA 10), foi possível calcular a frequência alélica (TABELA 11). Os alelos mais comuns nessa população permaneceram sendo *KIR2DL1*003* ($f = 0,44$) e *KIR2DL1*002* ($f = 0,31$), seguidos do alelo *KIR2DL1*004* ($f = 0,10$), enquanto os outros alelos foram encontrados com frequências inferiores a 0,10. Ambas as frequências - de portadores e alélica - para essa população foram calculadas utilizando o Excel.

TABELA 9 - FORAM ENCONTRADOS 11 ALELOS DE *KIR2DL1* DENTRE AS 7 POPULAÇÕES ESTUDADAS, OS GUARANI ÑANDEVA APRESENTARAM ALELOS NÃO ENCONTRADOS EM OUTRAS POPULAÇÕES INDÍGENAS (EM FREQUÊNCIA DE PORTADORES).

População	GKW	GND	GRC	KIV	KRC	OR	CWB
n	40	53	29	36	31	52	49
	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)	F(%)
<i>KIR2DL1*001</i>		6					6
<i>KIR2DL1*002</i>	8	13			6	15	43
<i>KIR2DL1*003</i>	95	100	100	100	100	96	57
<i>KIR2DL1*004</i>	3					04	16
<i>KIR2DL1*006</i>							4
<i>KIR2DL1*007</i>							2
<i>KIR2DL1*009</i>		2					
<i>KIR2DL1*010</i>				3	3	2	4
<i>KIR2DL1*011</i>							2
<i>KIR2DL1*012</i>						2	2
<i>KIR2DL1*020</i>							4

n: Número de indivíduos analisados em cada população; F = frequência de portadores. Os valores apresentados são referentes aos alelos encontrados em cada população, quando em branco é referente a frequência de 0,0. GKW: Ameríndios Guarani Kaiowá. GND: Guarani Ñandeva. GRC: Guarani M'byá. KIV: Kaingang de Ivaí. KRC: Kaingang de Rio das Cobras. OR: descendentes de japoneses de Curitiba. CWB: eurodescendentes de Curitiba.

TABELA 10 – NEM TODOS OS INDIVÍDUOS DE CURITIBA APRESENTARAM DUAS CÓPIAS DO GENE *KIR2DL1*.

Número de cópias (<i>KIR2DL1</i>) - em CWB	Frequência em homozigotos + hemizigotos (n=29)	Frequência na amostra total (n=49)
1 cópia	0,31	0,18
2 cópias	0,66	0,80
3 cópias	0,03	0,02
Total	1	1

TABELA 11 – *KIR2DL1*002* E *KIR2DL1*003* FORAM OS ALELOS MAIS FREQUENTES NA AMOSTRA POPULACIONAL DE CURITIBA (EM FREQUÊNCIA ALÉLICA).

População	CWB
n	90
<i>KIR2DL1*001</i>	0,03
<i>KIR2DL1*002</i>	0,31
<i>KIR2DL1*003</i>	0,44
<i>KIR2DL1*004</i>	0,10
<i>KIR2DL1*006</i>	0,03
<i>KIR2DL1*007</i>	0,01
<i>KIR2DL1*010</i>	0,02
<i>KIR2DL1*011</i>	0,01
<i>KIR2DL1*012</i>	0,01
<i>KIR2DL1*020</i>	0,02

Em negrito estão destacados os alelos mais frequentes. n: número de indivíduos analisados em cada população. CWB: eurodescendentes de Curitiba.

Na árvore filogenética dos alelos encontrados, pode-se observar a formação de dois clados principais, distantes evolutivamente e com frequência alta de aparecimento nas repetições (100%). No clado superior, é interessante observar que os dois alelos mais frequentes **003* e **002* apresentaram considerável distância evolutiva.

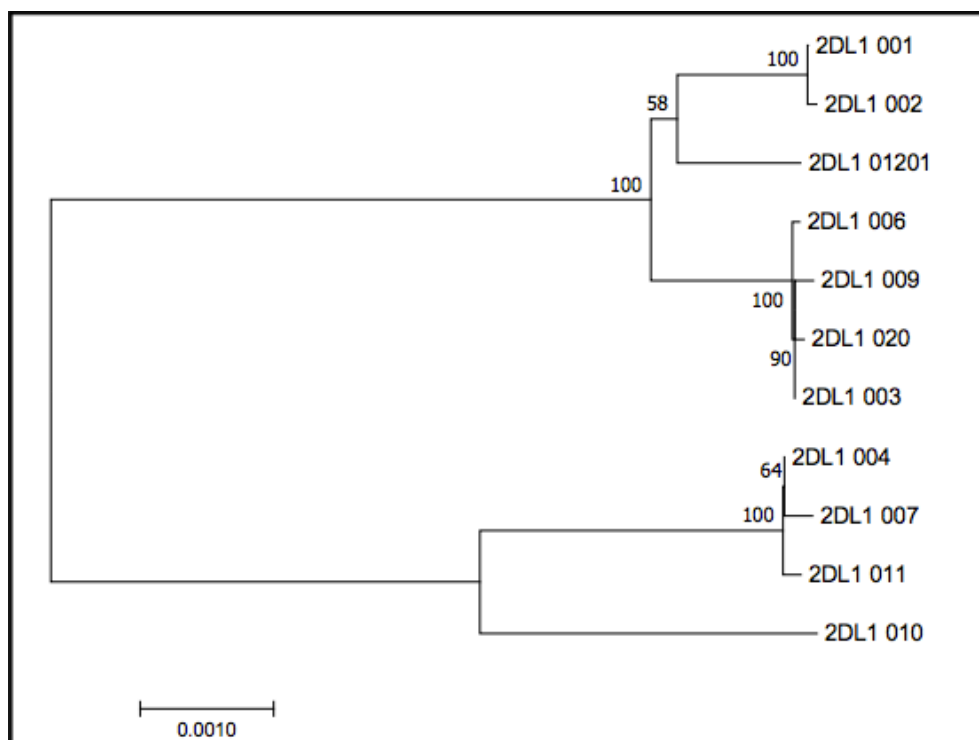


FIGURA 7 - RELAÇÕES EVOLUTIVAS ENTRE ALELOS DO GENE *KIR2DL1*.

O valor ao lado dos ramos representa a porcentagem de vezes em que um ramo foi agrupado nas árvores replicadas por *bootstrap*. A escala no lado inferior esquerdo corresponde à distância evolutiva (número de substituições de base por sítio).

O desequilíbrio de ligação nas populações GRC e KIV não pôde ser calculado devido a baixa diversidade alélica dentro das populações (ver TABELA 9). Nas populações CWB, GKW e OR, que são populações com maior número de alelos, pode se observar associação entre SNPs dos éxons 5 e 7 (D' e LOD máximos e valores de $r^2 > 0,6$). Nas populações GKW e GND observa-se também associação entre SNPs dos éxons 1 e 4 ($D' = 1$ e $r^2 > 0,8$).

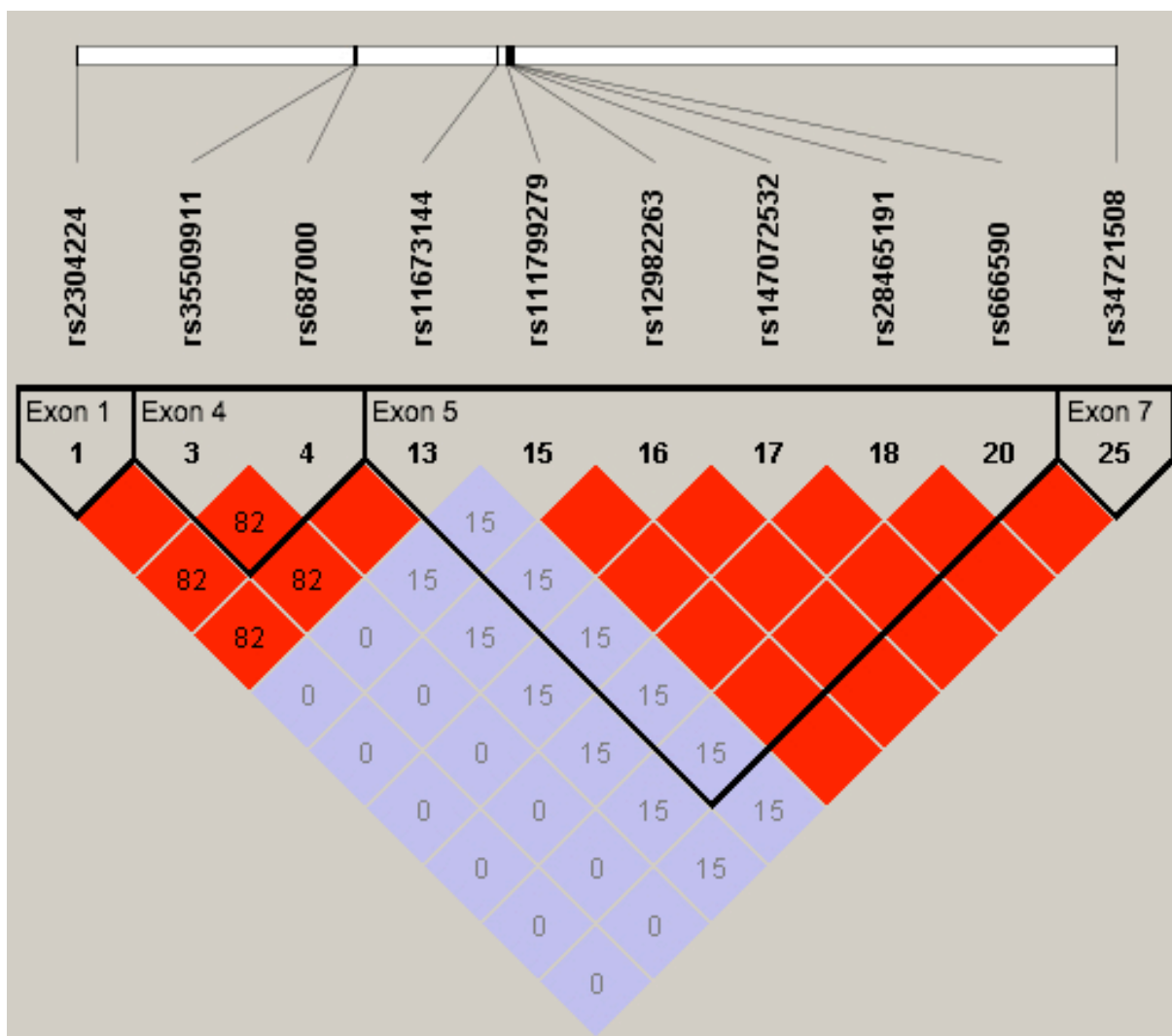


FIGURA 8 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE *KIR2DL1* NA POPULAÇÃO DE AMERÍNDIOS GUARANI KAIOWÁ (GKW).

Nesse modelo, cada losango representa a análise de desequilíbrio entre os dois SNPs correspondentes às faces superiores esquerda e direita. Em losangos vermelhos, estão representados os pares de SNPs que apresentaram valores máximos de D' ($D' = 1$) e $\text{LOD} \geq 2$ (desequilíbrio absoluto), em azul os que apresentaram valores de $D' = 1$ e $\text{LOD} < 2$, e em branco os que apresentaram valores de $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$. Os números dentro de cada losango são referentes ao valor de r^2 ($\times 100$). Os losangos vazios representam desequilíbrio absoluto (r^2 igual a 100). Os blocos em preto destacam SNPs do mesmo éxon. Os números dentro dos blocos representam as posições variáveis observadas nas sequências em ordem numérica.

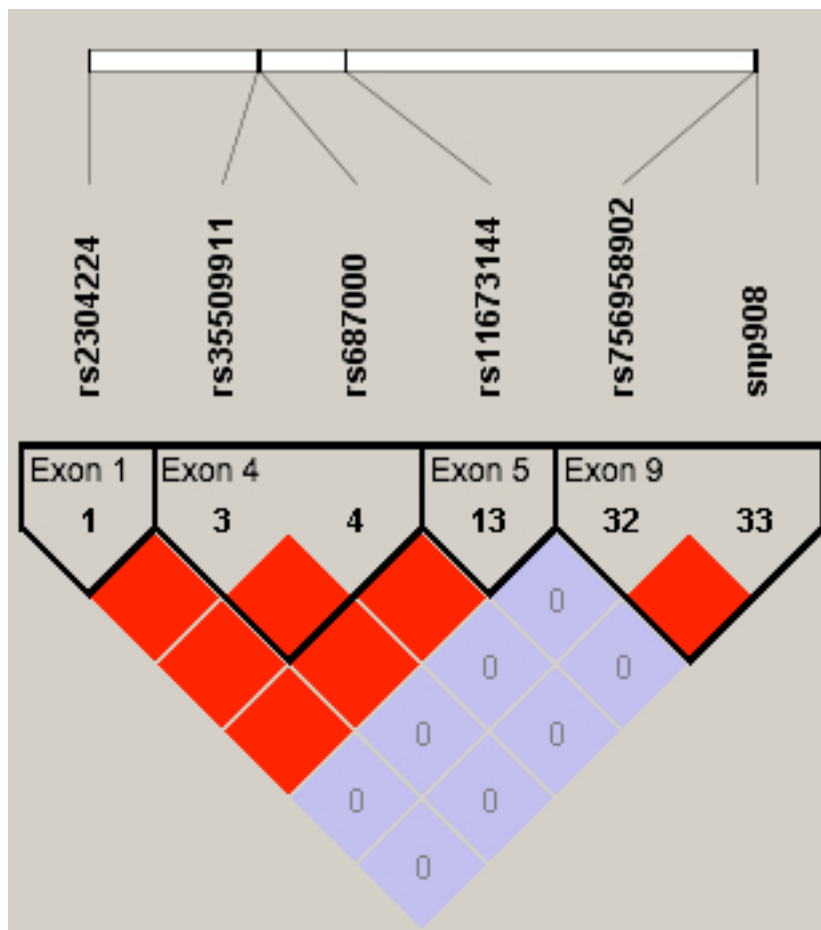


FIGURA 9 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE *KIR2DL1* NA POPULAÇÃO DE GUARANI NÁNDEVA (GND).

Nesse modelo, cada losango representa a análise de desequilíbrio entre os dois SNPs correspondentes às faces superiores esquerda e direita. Em losangos vermelhos, estão representados os pares de SNPs que apresentaram valores máximos de D' ($D' = 1$) e $LOD \geq 2$ (desequilíbrio absoluto), em azul os que apresentaram valores de $D' = 1$ e $LOD < 2$, e em branco os que apresentaram valores de $D' < 1$ e $LOD < 2$. Os números dentro de cada losango são referentes ao valor de r^2 ($\times 100$). Os losangos vazios representam desequilíbrio absoluto (r^2 igual a 100). Os blocos em preto destacam SNPs do mesmo éxon. Os números dentro dos blocos representam as posições variáveis observadas nas sequências em ordem numérica.

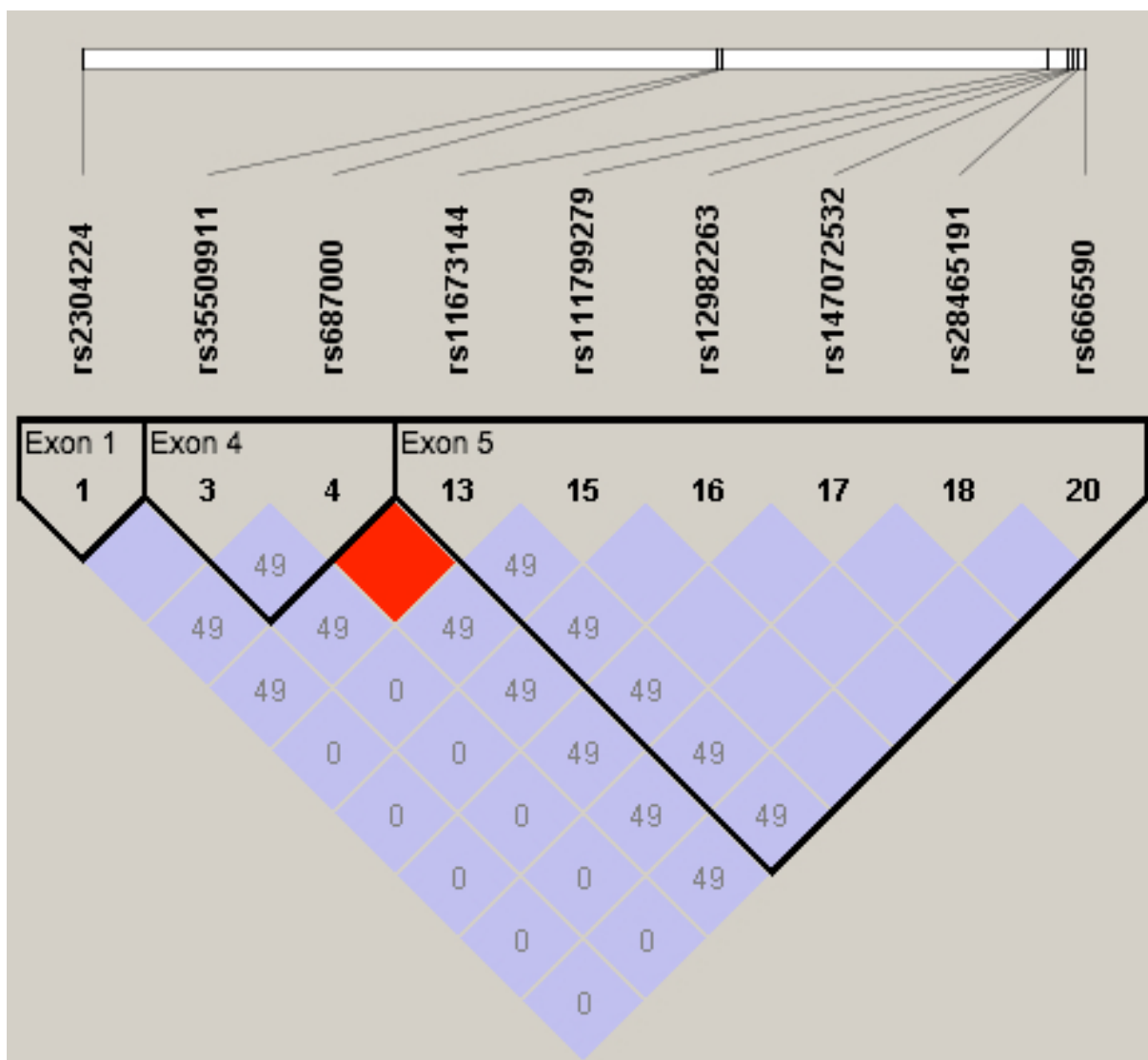


FIGURA 10 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE *KIR2DL1* NA POPULAÇÃO DE KAINGANG DE RIO DAS COBRAS (KRC).

Nesse modelo, cada losango representa a análise de desequilíbrio entre os dois SNPs correspondentes às faces superiores esquerda e direita. Em losangos vermelhos, estão representados os pares de SNPs que apresentaram valores máximos de D' ($D' = 1$) e $\text{LOD} \geq 2$ (desequilíbrio absoluto), em azul os que apresentaram valores de $D' = 1$ e $\text{LOD} < 2$, e em branco os que apresentaram valores de $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$. Os números dentro de cada losango são referentes ao valor de r^2 ($\times 100$). Os losangos vazios representam desequilíbrio absoluto (r^2 igual a 100). Os blocos em preto destacam SNPs do mesmo éxon. Os números dentro dos blocos representam as posições variáveis observadas nas sequências em ordem numérica.

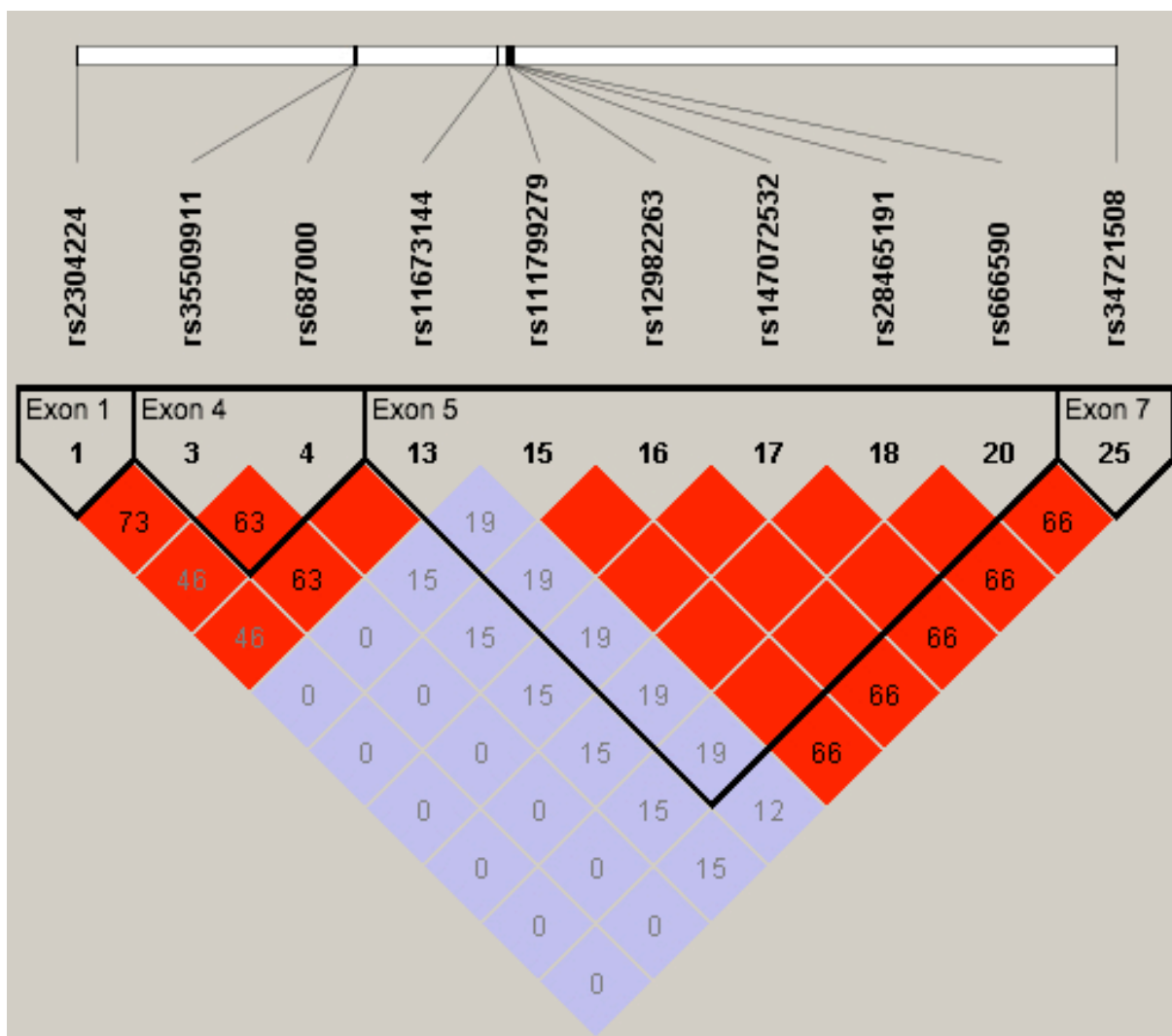


FIGURA 11 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE *KIR2DL1* NA POPULAÇÃO DE DESCENDENTES DE JAPONESES (OR).

Nesse modelo, cada losango representa a análise de desequilíbrio entre os dois SNPs correspondentes às faces superiores esquerda e direita. Em losangos vermelhos, estão representados os pares de SNPs que apresentaram valores máximos de D' ($D' = 1$) e $\text{LOD} \geq 2$ (desequilíbrio absoluto), em azul os que apresentaram valores de $D' = 1$ e $\text{LOD} < 2$, e em branco os que apresentaram valores de $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$. Os números dentro de cada losango são referentes ao valor de r^2 ($\times 100$). Os losangos vazios representam desequilíbrio absoluto (r^2 igual a 100). Os blocos em preto destacam SNPs do mesmo éxon. Os números dentro dos blocos representam as posições variáveis observadas nas sequências em ordem numérica.

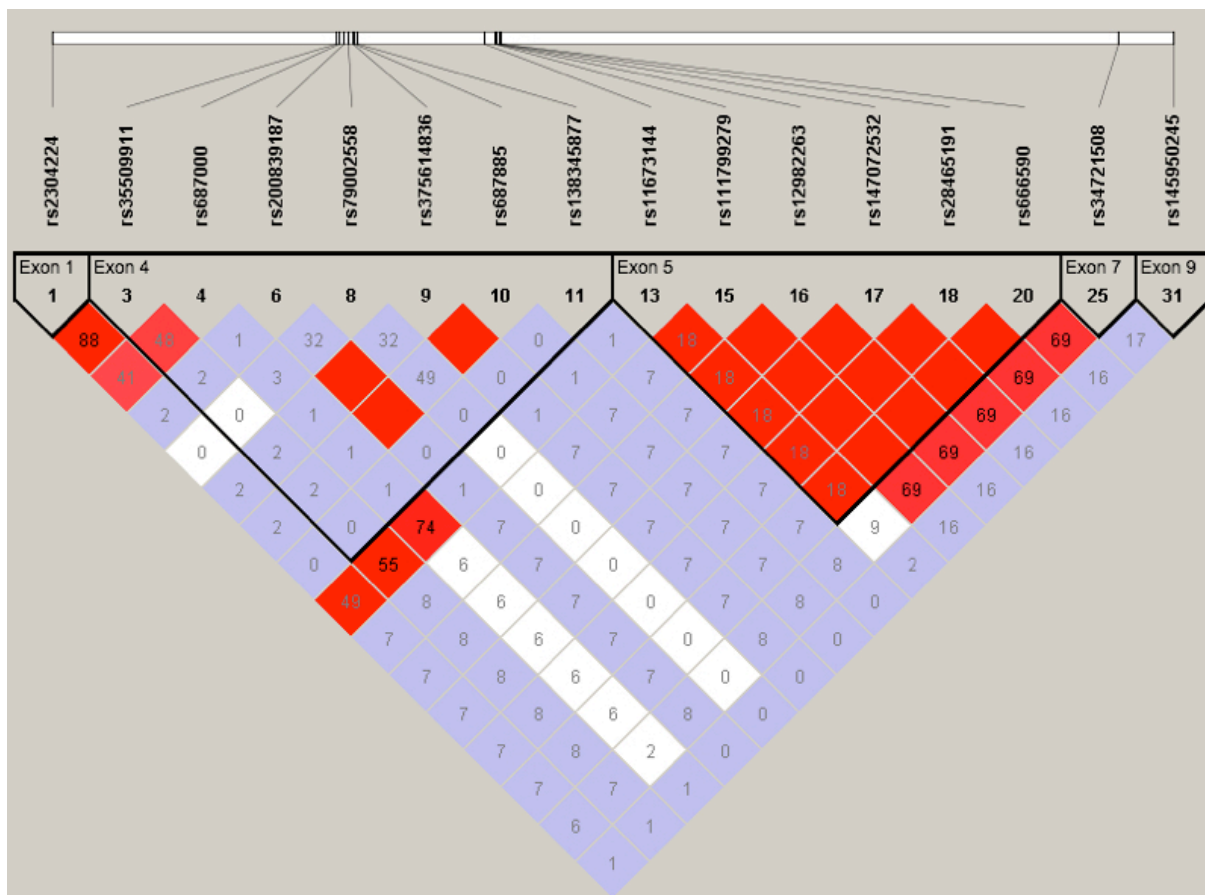


FIGURA 12 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DE *KIR2DL1* NA POPULAÇÃO DE EURODESCENDENTES DE CURITIBA (CWB).

Nesse modelo, cada losango representa a análise de desequilíbrio entre os dois SNPs correspondentes às faces superiores esquerda e direita. Em losangos vermelhos, estão representados os pares de SNPs que apresentaram valores máximos de D' ($D' = 1$) e $\text{LOD} \geq 2$ (desequilíbrio absoluto), em azul os que apresentaram valores de $D' = 1$ e $\text{LOD} < 2$, e em branco os que apresentaram valores de $D' < 1$ e $\text{LOD} < 2$. Os números dentro de cada losango são referentes ao valor de r^2 ($\times 100$). Os losangos vazios representam desequilíbrio absoluto (r^2 igual a 100). Os blocos em preto destacam SNPs do mesmo éxon. Os números dentro dos blocos representam as posições variáveis observadas nas sequências em ordem numérica.

Na TABELA 12 estão os valores de F_{ST} e do teste exato de diferenciação entre as frequências de portadores de cada alelo nas sete populações integrantes deste estudo. Em ambos os testes a população de eurodescendentes de Curitiba (CWB) foi significativamente diferente das populações ameríndias e oriental, com valores de F_{ST} indicando alta diferenciação genética ($F_{ST} > 0,15$) com relação aos ameríndios e média diferenciação genética ($0,05 < F_{ST} < 0,15$) com relação aos orientais. As comparações entre orientais e ameríndios resultaram em diferenciação não

significante ($p > 0.05$) no teste exato de diferenciação populacional, e em valores de F_{ST} de baixa diferenciação genética ($F_{ST} < 0,05$), com exceção as populações de Guarani M'byá (GRC) e Kaingang de Ívai (KIV). Além disso, entre os ameríndios, a população de Guarani Ñandeva (GND) também foi diferente em comparação com as populações Guarani M'byá (GRC) e Kaingang de Ívai (KIV), sendo a comparação com esta última a única entre ameríndios que resultou em diferenciação significativa no teste exato de diferenciação populacional ($p < 0,05$).

Na TABELA 13, estão os valores de diferenciação genética entre as frequências alélicas da população de eurodescendentes de Curitiba e de outras três populações com frequências alélicas descritas no banco de dados *Allele frequencies.net* (GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2015). As frequências alélicas entre essas populações analisadas foram estatisticamente diferentes, com valores de F_{ST} variando entre médio e alto.

Adicionalmente, foi feita uma comparação entre as frequências de portadores de alelos de *KIR2DL1* na população de eurodescendentes de Curitiba e de outras populações com essa informação disponível no mesmo banco de dados (TABELA 14). Nesse teste, as frequências de *KIR2DL1* em eurodescendentes de Curitiba foi similar à de outras populações eurodescendentes, com valores de F_{ST} baixos e indicando similaridade estatística, embora os valores do teste exato indiquem diferenciação. Em relação a populações não eurodescendentes, as frequências de *KIR2DL1* diferiram em ambos os testes na comparação entre eurodescendentes de Curitiba e populações de ameríndios, asiáticos e africanos. Porém, foram observados valores baixos de diferenciação quando em comparação os eurodescendentes de Curitiba e asiáticos e africanos (0,074 e 0,063, respectivamente).

TABELA 12 - OS EURODESCENDENTES TÊM FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DE *KIR2DL1* ESTATISTICAMENTE DIFERENTE DE INDÍGENAS E ORIENTAIS.

	GKW	GND	GRC	KIV	KRC	OR	CWB
GKW	-	ns	ns	ns	ns	ns	***
GND	0,00048ns	-	ns	*	ns	ns	***
GRC	0,03823ns	0,07335*	-	ns	ns	ns	***
KIV	0,0198ns	0,0595*	-0,00678ns	-	ns	ns	***
KRC	-0,02242ns	0,00239ns	0,03302ns	0,00478ns	-	ns	***
OR	0,0048ns	-0,00837ns	0,08697*	0,07164***	0,00862ns	-	***
CWB	0,22001***	0,17144***	0,29552***	0,29083***	0,21969***	0,14621***	-

Os valores inferiores se referem aos valores de F_{ST} encontrados, e sobrescritos estão os valores de significância estatística do teste. Os valores superiores são relativos à significância estatística do teste exato de diferenciação populacional. GKW: Ameríndios Guarani Kaiowá. GND: Guarani Ñandeva. GRC: Guarani M'byá. KIV: Kaingang de Ivaí. KRC: Kaingang de Rio das Cobras. OR: descendentes de japoneses de Curitiba. CWB: eurodescendentes de Curitiba. ns $p > 0,05$; * $p < 0,01-0,05$; ** $p < 0,001-0,01$; *** $p < 0,001$. Escala de F_{ST} de Wright (1978): baixa (0 a 0,05), média (0,05 a 0,15) e alta ($> 0,15$) diferenciação genética.

TABELA 13 - A FREQUÊNCIA ALÉLICA DE *KIR2DL1* NA POPULAÇÃO DE EURODESCENDENTES DE CURITIBA DIFERE DA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE OUTRAS POPULAÇÕES PREVIAMENTE DESCRITAS.

	CWB	CHI	GHA	JAP
CWB	-	***	***	***
CHI	0,20732***	-	***	***
GHA	0,06195***	0,10507***	-	***
JAP	0,32609***	0,09955***	0,18215***	-

Os valores inferiores se referem aos valores de F_{ST} encontrados, e sobrescritos estão os valores de significância estatística do teste. Os valores superiores são relativos à significância estatística do teste exato de diferenciação populacional. CWB: eurodescendentes de Curitiba. CHI: chineses Zhejiang. GHA: africanos Gana Ga-Adangbe. JAP: japoneses. ns $p > 0,05$; * $p < 0,01-0,05$; ** $p < 0,001-0,01$; *** $p < 0,001$. Escala de F_{ST} de Wright (1978): baixa (0 a 0,05), média (0,05 a 0,15) e alta ($> 0,15$) diferenciação genética.

TABELA 14 - A FREQUÊNCIA DE PORTADORES DE *KIR2DL1* NA POPULAÇÃO DE EURODESCENDENTES DE CURITIBA É SIMILAR A OUTROS EURODESCENDENTES, MAS DIFERENTE DE AMERÍNDIOS, ASIÁTICOS E AFRICANOS.

	CWB	USA	IRE	IND	MEX	GHA
CWB	-	*	***	***	***	***
USA	0,003ns	-	ns	***	***	***
IRE	0,002ns	0,004ns	-	***	***	***
IND	0,074***	0,079***	0,079***	-	***	***
MEX	0,277***	0,238***	0,206***	0,215***	-	***
GHA	0,063***	0,071***	0,061***	0,075***	0,137***	-

Os valores inferiores se referem aos valores de F_{ST} encontrados, e sobrescritos estão os valores de significância estatística do teste. Os valores superiores são relativos à significância estatística do teste exato de diferenciação populacional. CWB: eurodescendentes de Curitiba. USA: caucasianos dos Estados Unidos. IRE: europeus do norte da Irlanda. IND: asiáticos Hindus do norte da Índia. MEX: ameríndios Huichol do México. GHA: africanos Ga-Adangbe de Gana. ns $p > 0,05$; * $p < 0,01-0,05$; ** $p < 0,001-0,01$; *** $p < 0,001$. Escala de F_{ST} de Wright (1978): baixa (0 a 0,05), média (0,05 a 0,15) e alta ($> 0,15$) diferenciação genética.

Na análise de componentes principais, segundo o critério de Kaiser, foram encontrados apenas dois componentes. Os dois componentes principais explicam respectivamente 73,9% e 16,4% da variação. Quando levados em consideração juntos, o acumulado desses componentes explica 90,4% da variação entre as frequências de portadores encontradas. No gráfico de distribuição entre os componentes, as populações oriental, ameríndios Kaingang, Guarani M'byá e Guarani Kaiowá se encontraram agrupadas. Já a população de eurodescendentes de Curitiba e Guarani Ñandeva se encontraram distantes das outras mencionadas e distantes entre si.

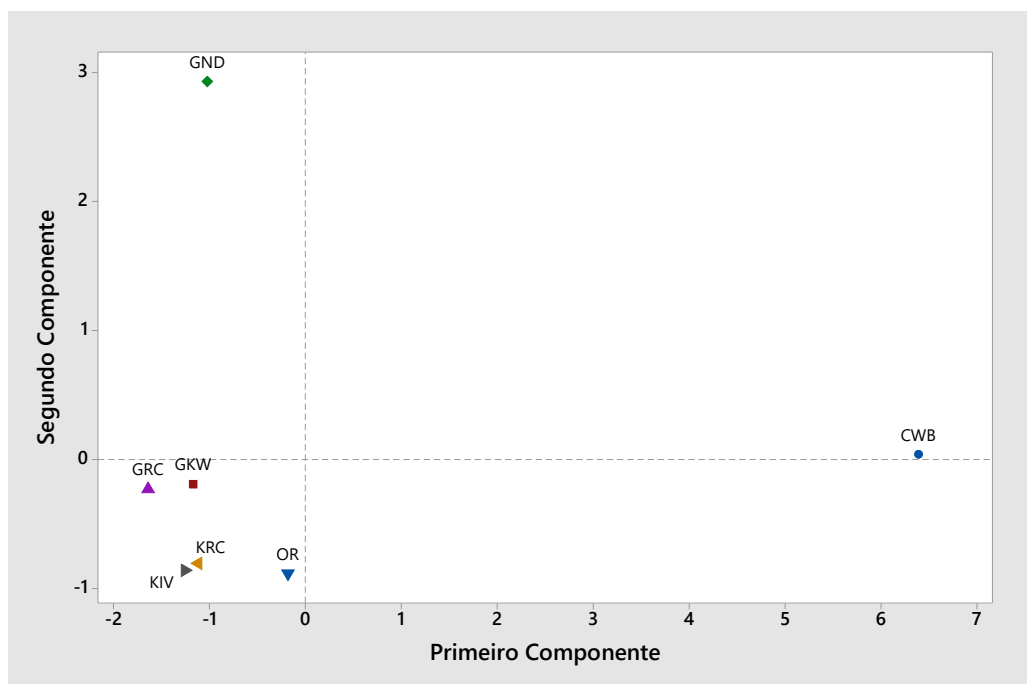


FIGURA 13 – GUARANI ÑANDEVA NÃO SE AGRUPOU COM OUTROS GUARANIS NA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.

GKW: Ameríndios Guarani Kaiowá. GND: Guarani Nandeva. GRC: Guarani M'byá. KIV: Kaingang de Ivaí. KRC: Kaingang de Rio das Cobras. OR: descendentes de japoneses de Curitiba. CWB: eurodescendentes de Curitiba.

Os resultados dos testes de evolução neutra encontram-se na TABELA 15. Foram encontrados resultados não significantes estatisticamente para os testes de D^* e F^* de F_u e L_i nas populações ameríndias, oriental e eurodescendente. De forma similar, os valores do F de F_u também não foram significantes para nenhuma das populações. O teste de Tajima não foi estatisticamente significativo para as populações de eurodescendentes de Curitiba (CWB) e Guarani Nandeva (GND), não permitindo rejeitar a hipótese de neutralidade seletiva. Porém, apresentou valores negativos e significância nas outras populações ameríndias GKW, KIV, e KRC e na população oriental, o que indica seleção purificadora nessas populações. Não foi possível testar a neutralidade na população de Guarani M'byá (GRC), pois essa possui somente um alelo.

TABELA 15 - TESTES DE NEUTRALIDADE SELETIVA PARA *KIR2DL1* NAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.

Teste	GKW	GND	GRC	KIV	KRC	OR	CWB
n	40	53	29	36	31	52	49
D de Tajima	-2,6167 p<0,001	-	*	-2,8955 p<0,001	-2,6777 p<0,001	-1,8057 p<0,05	-
D* de Fu e Li	-	-	*	-	-	-	-
F* de Fu e Li	-	-	*	-	-	-	-
F de Fu	-	-	*	-	-	-	-

GKW: Ameríndios Guarani Kaiowá. GND: Guarani Nandeva. GRC: Guarani M'byá. KIV: Kaingang de Ivaí. KRC: Kaingang de Rio das Cobras. OR: descendentes de japoneses de Curitiba. CWB: eurodescendentes de Curitiba. *não calculado. - valores não significantes.

A partir do ensaio de citometria, foi observado que os diferentes alelos de *KIR2DL1* encontrados apresentam níveis de expressão gênica diferencial ($p < 0,0001$). Dos alelos encontrados, *KIR2DL1*002* é o mais expresso, com o dobro dos níveis de expressão dos alelos menos expressos *KIR2DL1*006* ($p = 0,001$) e *KIR2DL1*004* ($p < 0,0001$) (FIGURA 14).

Os dados de expressão foram analisados também de acordo com o número de cópias do gene (FIGURA 15) e de acordo com uma variante previamente descrita na literatura que altera a função das células NK (FIGURA 16). Devido ao número amostral de hemizigotos ser reduzido, essas análises só puderam ser realizadas com os alelos mais frequentes (*KIR2DL1*002*, **003* e **004*). Não foi observada expressão alélica diferencial entre indivíduos hemizigotos. Foi observado que indivíduos homozigotos e hemizigotos portadores do mesmo alelo *KIR2DL1*002* apresentam diferentes níveis de expressão de *KIR2DL1* ($p = 0,03$), mas isso não ocorre entre homozigotos e hemizigotos para o alelo *KIR2DL1*003* ($p > 0,05$) (FIGURA 15). A análise entre homozigotos e hemizigotos portadores de *KIR2DL1*004* não pode ser realizada, pois só foi encontrado um indivíduo homozigoto para esse alelo. As análises entre o número de cópias do gene e a porcentagem de células NK *KIR2DL1* positivas não foram significantes

estatisticamente em nenhum dos grupos testados para os valores de MFI, e portanto, não foram apresentadas.

Ainda, foi observado que o genótipo de *HLA-C* está associado tanto com a expressão de *KIR2DL1* ($p=0,02$) quanto com a porcentagem de células NK que expressam *KIR2DL1* ($p=0,06$). A comparação entre indivíduos com o alótipo C1 e C2 foi significativa nas duas análises, sendo C2 associado com menor expressão de *KIR2DL1* e maior porcentagem de células NK expressando esse receptor. Foi significativa também a comparação entre indivíduos homocigotos C2 e portadores de C1, onde os homocigotos C2 novamente apresentaram menor expressão de *KIR2DL1* e uma maior porcentagem de células *KIR2DL1* positivas. Finalmente, a comparação entre indivíduos portadores do alótipo C2 e indivíduos que não possuem o ligante foi não significativa nos dois parâmetros (FIGURAS 17 e 18).

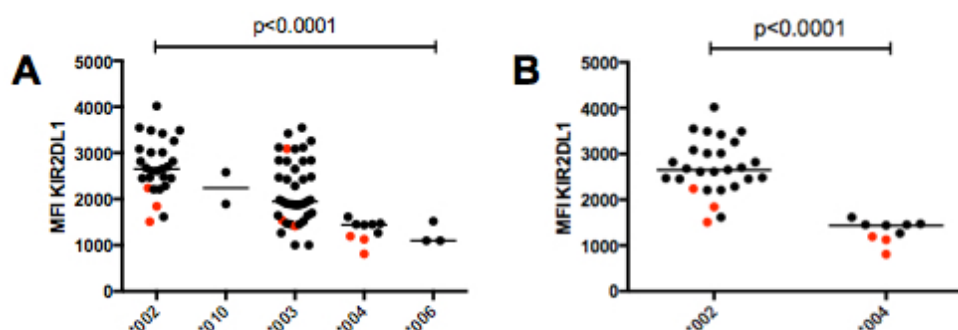


FIGURA 14 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE *KIR2DL1* DE ACORDO COM DIFERENTES ALELOS.

A - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE DIFERENTES ALELOS DE *KIR2DL1* ($P<0,0001$).

B - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE OS ALELOS *KIR2DL1**002 E *004 ($P<0,0001$).

Pontos em vermelho representam indivíduos hemizigotos. MFI: *median fluorescence intensity*.

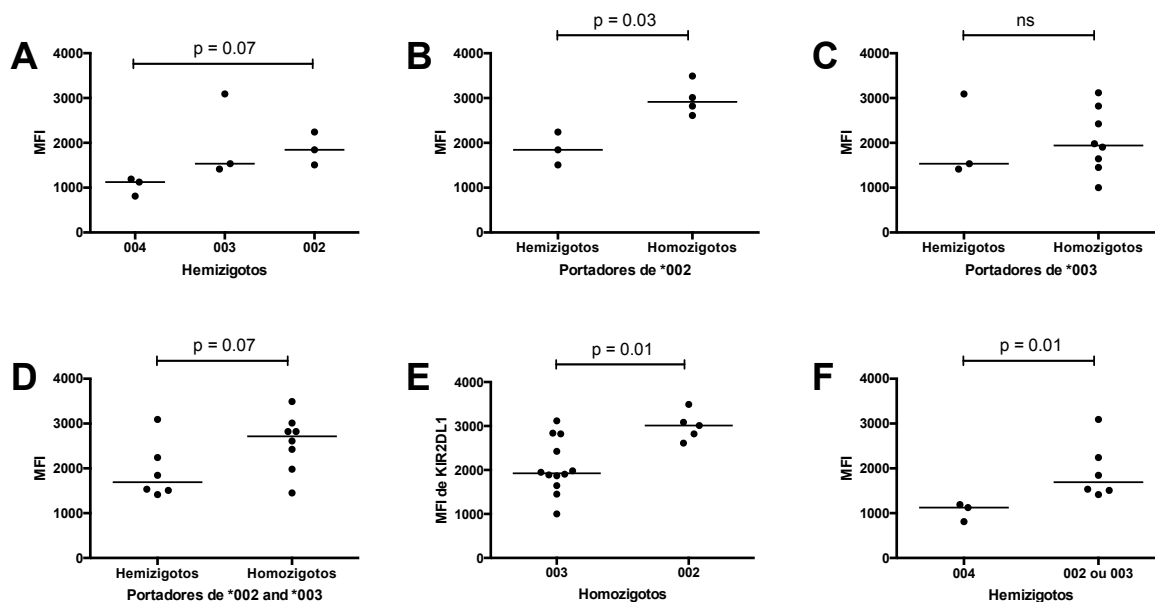


FIGURA 15 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE KIR2DL1 EM HEMIZIGOTOS E HOMOZIGOTOS.

A - EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE HEMIZIGOTOS PARA OS ALELOS *KIR2DL1**002, *003 E *004 ($p=0,07$). B - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE HEMIZIGOTOS E HOMOZIGOTOS PORTADORES DO ALELO *KIR2DL1**002 ($p=0,03$). C - EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE HEMIZIGOTOS E HOMOZIGOTOS PORTADORES DO ALELO *KIR2DL1**003 (ns). D - EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE HEMIZIGOTOS E HOMOZIGOTOS PORTADORES DOS ALELOS *KIR2DL1**002 E *003 ($p=0,07$). E - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE HOMOZIGOTOS PARA OS ALELOS *002 E *003 ($p=0,01$). F - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE HEMIZIGOTOS PARA O ALELO *KIR2DL1**004 E HEMIZIGOTOS PARA OS ALELOS *KIR2DL1**002 OU *003 ($p=0,01$).

MFI: *median fluorescence intensity*. ns: valores não significantes com $p>0,1$.

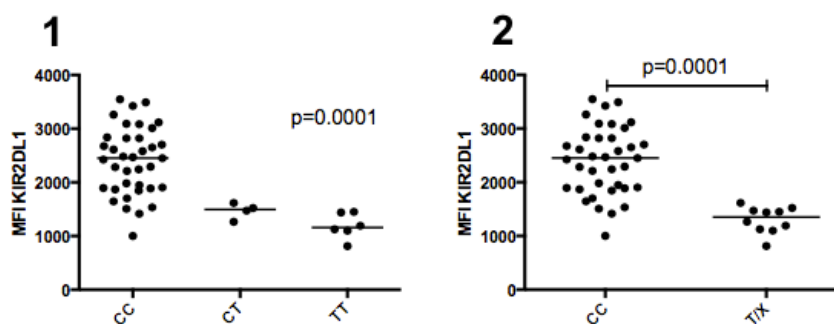


FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE KIR2DL1 DE ACORDO COM O SNP rs34721508 (C>T), QUE CAUSA SUBSTITUIÇÃO NÃO-SINÔNIMA DE CISTEÍNA POR ARGININA NA POSIÇÃO 245.

MFI: *median fluorescence intensity*. X: C ou T.

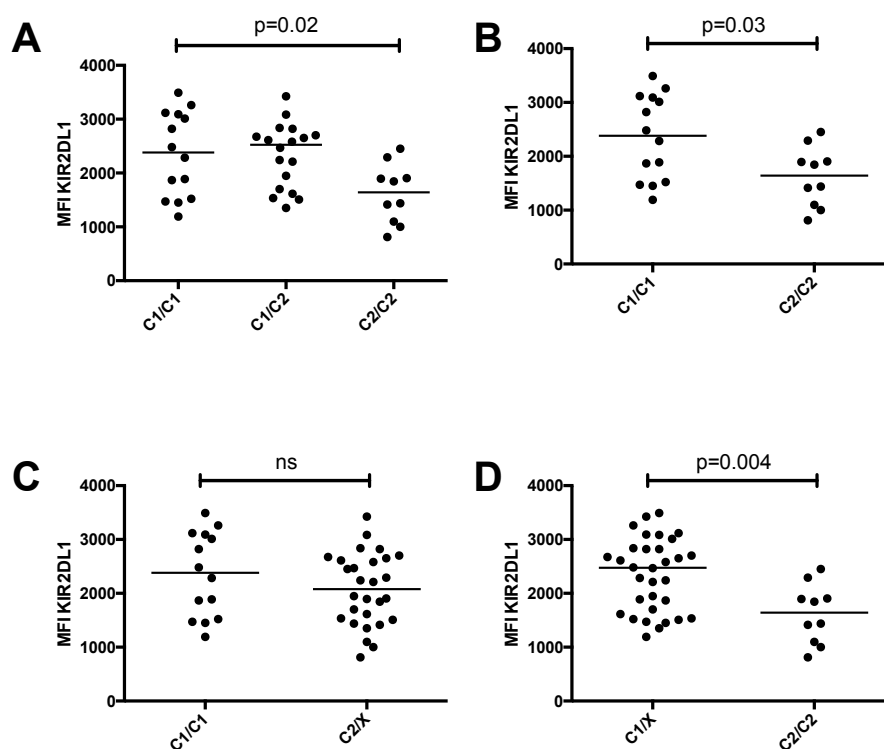


FIGURA 17 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE KIR2DL1 DE ACORDO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE *HLA-C*.

A - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE DIFERENTES GENÓTIPOS DE *HLA-C* ($P=0,02$).

B - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE OS GENÓTIPOS *C1/C1* E *C1/C2* ($P=0,03$).

C - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS PARA O ALÓTIPO *HLA-C1* E PORTADORES DO ALÓTIPO *HLA-C2* (ns).

D - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL ENTRE INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS PARA O ALÓTIPO *HLA-C2* E PORTADORES DO ALÓTIPO *HLA-C1* ($p=0,004$).

MFI: *median fluorescence intensity*. X: C1 ou C2. ns: resultados não significantes com $p>0,1$.

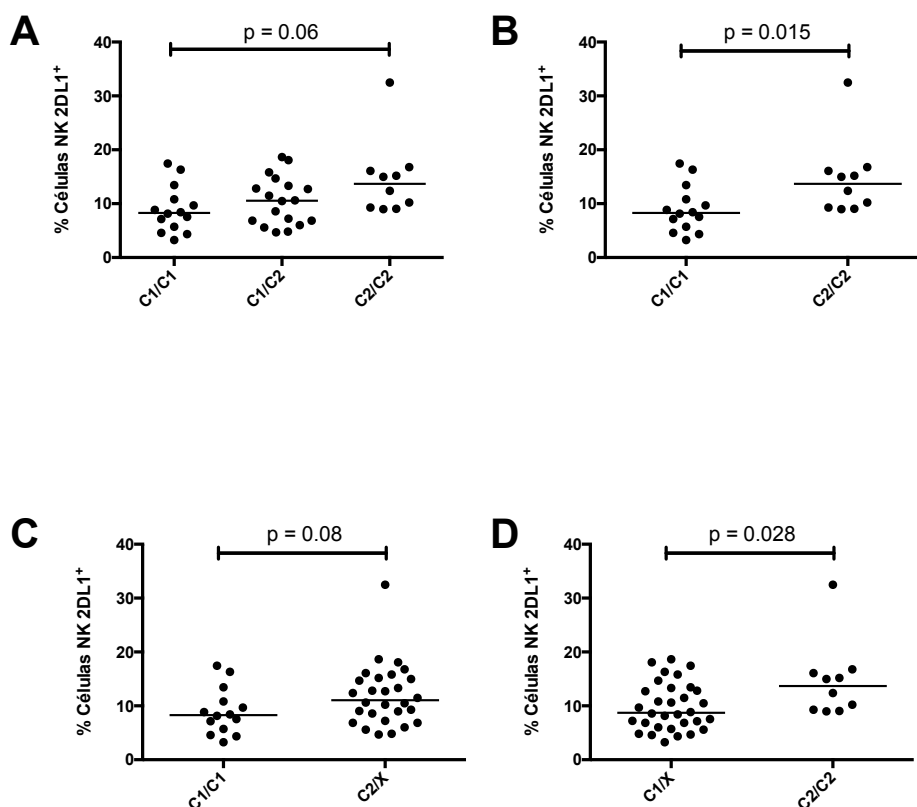


FIGURA 18 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EXPRESSANDO KIR2DL1 DE ACORDO COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE *HLA-C*.

A - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EXPRESSANDO KIR2DL1 ENTRE DIFERENTES GENÓTIPOS DE *HLA-C* ($p=0,06$). B - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EXPRESSANDO KIR2DL1 ENTRE OS GENÓTIPOS *C1/C1* E *C1/C2* ($p=0,015$). C - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EXPRESSANDO KIR2DL1 ENTRE INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS PARA O ALÓTIPO *HLA-C1* E PORTADORES DO ALÓTIPO *HLA-C2* ($p=0,08$). D - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EXPRESSANDO KIR2DL1 ENTRE INDIVÍDUOS HOMOZIGOTOS PARA O ALÓTIPO *HLA-C2* E PORTADORES DO ALÓTIPO *HLA-C1* ($p=0,028$).

MFI: *median fluorescence intensity*. X: C1 ou C2. ns: resultados não significantes com $p>0,1$.

Cada um dos SNPs genotipados nesse estudo (ver TABELA 2) foi individualmente analisado para verificar sua associação com a expressão de KIR2DL1 (TABELA 16). Foram encontrados 8 SNPs associados com a expressão diferencial de KIR2DL1 ($p<0,001$). Os SNPs encontrados foram pesquisados em diversos bancos de dados para predição de seus possíveis efeitos na regulação do gene.

TABELA 16 - EFEITOS REGULATÓRIOS PREDITOS DE SNPS DE *KIR2DL1* ASSOCIADOS COM EXPRESSÃO PROTEICA (P<0,001).

pos (GRCh37.p 13)	rs	Haploreg3					Regulome DB			Proteína codificada			miRNA	
		Marcadores de promotores de histona	Marcadores de enhancers de histona	DNAse	Motivos alterados	Anotação funcional dbSNP	Valor de DB	Motivo alterado	Marcadores de histona	D de Grantham	SIFT	PolyPhen-2	microSNiper	
Exon 1														
chr19:55281315	rs2304224		BLD	BLD,SKIN	THAP1	missense				50	Tolerado	Provavelmente prejudicial	T bloqueia miR-4728-3p, miR-335-5p, miR-329, miR-362-3p, miR-4670-5p e miR-3691-3p	
Exon 4														
chr19:55284824	rs35509911	BRN		BLD	CTCF, NRSF	missense				103	Tolerado	Benigno	C bloqueia miR-5096, miR-3144-5p, miR-3649, miR-4652-5p, miR-4535, miR-492, miR-5096 e miR-3661	G bloqueia miR-1911-3p, miR-3937, miR-4762-3p, miR-1911-3p e miR-4733-3p
Exon 5														
chr19:55286769	rs111799279				9 motivos alterados	missense	6 - ligação mínima	Esrrb, HNF4, COUP-TF, PPAR, NR2F, NR1H2, Tcfap2c, ESRRRA, Dax1, RXRA, RXRB e RXRG	Repressor fraco do PolyComb em células mononucleadas primárias do sangue periférico e células NK primárias do sangue periférico	38	Tolerado	-	C bloqueia miR-3189-3p, miR-1291, miR-635, miR-6724-5p, miR-874 e miR-3200-3p	A bloqueia miR-1296
chr19:55286795	rs12982263					missense							T bloqueia miR-4715-5p, miR-3153, miR-6075, miR-495-5p, miR-1306-3p, miR-4701-5p, miR-4259, miR-3187-3p e miR-6724-5p	C bloqueia miR-4685-5p, miR-5088, miR-520a-5p, miR-525-5p, miR-1254, miR-3127-5p, miR-3153, miR-6075, miR-4751, miR-488-5p, miR-1295b-5p, miR-6724-5p e miR-596 e miR-3176
chr19:55286796	rs147072532				NF-AT	missense				23	Tolerado	-	G bloqueia miR-4670-3p, miR-4715-5p, miR-3153, miR-6075, miR-1306-3p, miR-4701-5p, miR-4259, miR-3187-3p e miR-6724-5p	A bloqueia miR-5088, miR-525-5p, miR-6075, miR-4751, miR-488-5p, miR-1295b-5p, miR-6724-5p e miR-3176
chr19:55286822	rs28465191				CTCF, Egr-1	missense							C bloqueia miR-3677-3p, miR-4506, miR-1183, miR-4701-3p, miR-1470 e miR-3115	T bloqueia miR-1183, miR-3605-3p, miR-1470 e miR-132-5p
chr19:55286854	rs666590				NRSF, Pax-2	missense				29	Tolerado	-	A bloqueia miR-3149, miR-3688-3p, miR-3978, miR-3149, miR-3688-3p, miR-3978, miR-620 e miR-4704-3p	G bloqueia miR-4636, miR-2681-3p, miR-620 e miR-5739
Exon 7														
chr19:55294454	rs34721508					missense				180	Tolerado	Benigno	C bloqueia miR-6717-5p, miR-3663-3p, miR-3908, miR-4703-5p, miR-4738-5p, miR-4530, miR-767-5p, miR-3120-3p e miR-6515-5p	T bloqueia miR-4738-5p, miR-767-5p, miR-450a-5p e miR-182-5p

Estão representados os SNPs associados (p<0,05), sua posição genômica e seu efeito predito em elementos regulatórios do DNA. Os dados foram obtidos utilizando os banco de dados HaploReg3 (WARD & KELLIS, 2012), RegulomeDB (BOYLE et al., 2012), SIFT (KUMAR et al., 2009), PolyPhen-2 (ADZHUBEI et al., 2010) e microSNIPER (BARENBOIM et al. 2010).

6 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que analisou sistematicamente a diversidade alélica do gene *KIR2DL1* em populações brasileiras. Além disso, devido a dificuldade na distinção entre homozigose e hemizigose, é um dos únicos estudos a descrever frequências alélicas de *KIR2DL1*, além da frequência de portadores. Até o momento do presente trabalho, só foram encontradas outras três populações com essa informação no banco de dados *Allele frequencies.net* (GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2015), sendo essas chineses da província Han (TAO et al., 2014), africanos de Gana (NORMAN et al., 2013) e Japoneses (YAWATA et al., 2006). Adicionalmente foram descritas frequências alélicas também em populações ameríndias do México (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2006), embora este não tenha resolução necessária para distinguir os principais grupos alélicos (*KIR2DL1*002* e **006*; e *KIR2DL1*004* e **005*).

Em todas as populações estudadas nesse trabalho e em outras descritas no banco de dados *Allele frequencies.net*, o alelo *KIR2DL1*003* é o mais frequente. A frequência mais baixa já descrita para esse alelo é na população de eurodescendentes de Curitiba, descrita nesse trabalho, com frequência alélica de 0,44 e frequência de portadores de 57,0%. Ainda nessa população, foi observada uma frequência de hemizigose de 18,0%, e a ocorrência de duplicação do gene (3 cópias) em 1 indivíduo (2,0%). Em outra população de Tailandeses descrita por Chaisri e colegas (2017), foi analisada a variação no número de cópias do gene *KIR2DL1* e foi observada a ocorrência de duplicação (três cópias do gene) em 1,4% dos indivíduos, o que mostra que essa variação é observada em diferentes populações.

Os diferentes alelos encontrados nas populações desse estudo foram comparados para avaliar suas relações evolutivas. A árvore gerada pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987), mostra a formação de dois clados principais, com grande distância evolutiva entre eles. Analisando os alelos mais frequentes, é possível observar que os alelos *KIR2DL1*001* e **002* se encontram mais próximos filogeneticamente do alelo mais frequente *KIR2DL1*003*, indicando possível origem comum, e indicando origem paralela em relação ao alelo *KIR2DL1*004*, que se encontra mais distante. É interessante observar que os alelos *KIR2DL1*002* e **003* são os alelos de maior expressão, enquanto o alelo *KIR2DL1*004* apresenta expressão mais baixa

(comparação entre os alelos *002 e *004 na FIGURA 14(B), $p < 0,0001$; e alelos *002/*003 e *004 na FIGURA 15(B), $p = 0,01$).

Foi analisado o desequilíbrio de ligação entre os SNPs que definem os alelos de *KIR2DL1* nas diferentes populações estudadas. De forma geral, foi observado um diferente padrão de desequilíbrio de ligação nas populações. Em KRC, apesar de terem sido descritos poucos alelos, foi encontrado baixo desequilíbrio de ligação, provavelmente devido ao fato que os alelos encontrados (*002, *003 e *010) são filogeneticamente distantes. Nas populações CWB, OR e GWK, que são as populações com maior número de alelos, o padrão do desequilíbrio de ligação é similar. Foi observado nessas populações associação entre o SNP do éxon 1 e as posições *rs3550991* e *rs687000* (do éxon 4). Ainda, nessas populações pode se observar associação entre SNPs dos éxons 5 e 7, onde foram observados valores de D' máximos, e valores de r^2 variáveis, sendo r^2 igual a 1 em GWK, indicando desequilíbrio absoluto, e de cerca de 0,6 tanto em CWB quanto OR. Este resultado mostra que apesar de esses SNPs terem frequências similares dentro das populações, não são encontrados juntos em todos os casos. Essa observação em CWB e OR pode ser consequência do fato de ambas populações serem urbanas e com maior diversidade do que populações isoladas.. Ambos os éxons codificam regiões que têm grande importância na função efetora da proteína formada. O éxon 5 codifica o domínio D2 (porção extracelular) e o éxon 7 codifica o domínio transmembrana. Esses domínios estão intrinsecamente relacionados, e, de forma geral, podem explicar o frequente padrão de desequilíbrio de ligação encontrado.

Com base nessas diferenças, as frequências de portadores de alelos de *KIR2DL1* foram comparadas nas sete populações estudadas. As análises de diferenciação populacional mostraram que a população de eurodescendentes de Curitiba apresentou frequências de *KIR2DL1* significativamente diferentes das populações ameríndias e oriental, com valores de F_{ST} indicando alta diferenciação genética com relação aos ameríndios e média diferenciação genética com relação aos orientais. As frequências alélicas da população de eurodescendentes de Curitiba foram comparadas ainda com outras três populações descritas no banco de dados *Allele frequencies, net* (GONZÁLEZ-GALARZA et al., 2015), duas orientais e uma de africanos. Foi encontrada diferenciação genética significativa em todas as comparações, com média diferenciação em relação aos africanos, e valores de alta diferenciação em relação as duas populações orientais.

Além disso, com o objetivo de comparar a população eurodescendente de Curitiba com outras populações de ascendência europeia, comparamos as frequências de portadores dos alelos de *KIR2DL1* entre os eurodescendentes de Curitiba e outras cinco populações com esta informação disponível no *Allele frequencies.net*, sendo duas delas europeias. Observamos valores bastante significantes, com $p < 0,001$, em comparação com os Irlandeses, asiáticos, ameríndios e africanos. A comparação com a população de eurodescendentes dos Estados Unidos, por sua vez, também foi considerada significativamente diferente, mas com valor de p elevado, entre 0,01 e 0,05. Já o teste de F_{ST} não revelou diferença significativa entre as populações eurodescendentes ($p > 0,05$), com valores de F_{ST} de baixa diferenciação genética. Interessantemente, a comparação das frequências de portadores de *KIR2DL1* entre eurodescendentes de Curitiba e asiáticos da Índia e africanos de Gana gerou valores de média diferenciação genética, e de alta diferenciação genética quando essa população foi comparada com ameríndios Huichol do México. Essa diferenciação em comparação a outras populações europeias poderia ser resultado de maior fluxo gênico de outras populações não europeias, como africanos, que migraram numerosamente ao Brasil principalmente pelo tráfico de escravos durante o período colonial, e populações orientais, com a grande onda de migração japonesa no século XX. O que indica que apesar do forte histórico de migração de populações europeias para o Brasil, as populações brasileiras apresentam diversas origens e são miscigenadas.

A comparação entre os orientais e ameríndios englobados nesse estudo resultou em valores não significantes e F_{ST} de baixa diferenciação genética. Com exceção as populações de Guarani M'byá (GRC) e Kaingang de Ívai (KIV), que apresentaram valores de média diferenciação genética em relação a população oriental (OR). Além disso, entre os ameríndios, a frequência de portadores de alelos de *KIR2DL1* na população de Guarani Ñandeva (GND) também se mostrou diferente em comparação com as populações Guarani M'byá (GRC) e Kaingang de Ívai (KIV), sendo a comparação com esta última a única entre ameríndios que resultou em um valor significativo no teste exato de diferenciação populacional ($p < 0,05$). Apesar dessa diferenciação, as duas populações GRC e KIV não apresentaram frequências de *KIR2DL1* significativamente diferentes de KRC e GKW.

Apesar disto, o teste exato de diferenciação populacional demonstrou similaridade nas frequências de *KIR2DL1* entre os japoneses de Curitiba e ameríndios. Esse

resultado é esperado de acordo com a possível origem dos Ameríndios a partir de uma população ancestral proveniente da Ásia. Já foi descrito que uma elevada proporção dos alelos encontrados em populações ameríndias são compartilhados entre ameríndios e asiáticos (TSUNETO et al., 2003). O alelo menos comum *KIR2DL1*009*, porém, foi observado em alta frequência somente na população Guarani Ñandeva. Este alelo foi descrito por Hou *et al.* (2006) como pertencente a um indivíduo de etnia desconhecida, mas provavelmente eurodescendente. O alelo não foi posteriormente encontrado em outros estudos populacionais depositados no banco de dados *Allele frequencies.net*. TSUNETO e colegas (2003) estimaram, utilizando as frequências alélicas de genes *HLA*, que a população de Guarani Ñandeva possui maior fluxo gênico dentre as populações ameríndias analisadas naquele estudo. Isso poderia explicar por que a população de Guarani Ñandeva é a única população ameríndia que apresenta o alelo, que contribui para os resultados significantes no teste de diferenciação populacional com relação a outros ameríndios e japoneses e para o isolamento na análise de componente principal (PCA). Isso também explicaria o maior número de alelos encontrado nessa população em comparação com outros Ameríndios, inclusive a presença do alelo *KIR2DL1*001*. Esse último alelo não foi encontrado em Japoneses, tendo sido apenas encontrado em eurodescendentes de Curitiba e Guarani Ñandeva, com alta frequência em ambas ($F = 6,0\%$).

Essa última observação é corroborada na análise de componente principal (PCA), no qual é observado um padrão de agrupamento entre as frequências de *KIR2DL1* em quatro populações de ameríndios (GKW, GRC, KIV e KRC), do qual se distancia a população GND. Nesse agrupamento está incluída ainda a população de descendentes de japoneses. De acordo com o esperado, nessa análise a população de eurodescendentes apresentou grande distanciamento das outras populações analisadas. Como pode ser observado a população de Guarani Ñandeva não se agrupou com nenhuma outra população, nem mesmo com as demais Guarani, que possuem origem comum, o que mais uma vez, aponta para fluxo gênico com outras populações não ameríndias. A análise do PCA gerou apenas dois componentes, segundo os critérios de Kaiser, indicando que a maior parte da variação é explicada por poucos componentes (90,4%), o que é esperado para populações com baixa variabilidade. É importante ressaltar que essas análises representam um retrato das

diferenças nas frequências de portadores de cada alelo de *KIR2DL1* nas populações estudadas, e não um estudo de relação genética entre essas populações.

Os testes de Fu e Li mostraram que as variantes de *KIR2DL1* observadas nessas populações estão de acordo com o modelo de neutralidade seletiva. Já os valores negativos significantes observados no teste de Tajima nas populações GKW, KIV, KRC e OR podem ser consequência de um efeito de seleção purificadora, que resulta em um excesso de alelos com frequências baixas. Alternativamente, poderia ser resultado de expansão populacional recente (TAJIMA, 1989). Essa última hipótese é corroborada com os eventos demográficos observados em populações indígenas brasileiras após a época colonial, e ainda, poderia ser indicativo de efeito fundador no processo de migração dos descendentes de japoneses para o Brasil.

Os resultados do presente estudo ainda confirmaram estudos anteriores em que alelos de *KIR2DL1* apresentam níveis diferenciais de expressão gênica. O alelo *KIR2DL1*002* foi associado a maiores níveis de expressão, com o dobro dos níveis de expressão observados para os alelos menos expressos *KIR2DL1*006* ($p=0,001$) e *KIR2DL1*004* ($p<0,0001$).

Os dados de expressão foram analisados também de acordo com o número de cópias do gene. A hipótese inicial era de indivíduos com duas cópias do alelo poderiam apresentar o dobro da expressão proteica em comparação com aqueles com apenas uma cópia. No entanto, foi observado que indivíduos homozigotos *KIR2DL1*002* apresentam um maior nível de expressão que os hemizigotos ($p=0,03$), mas essa expressão é apenas 0,5 vez maior. Ainda, não houve diferença dos níveis de expressão entre indivíduos que apresentaram uma ou duas cópias do alelo *KIR2DL1*003*. Isso poderia ser devido a existência de um mecanismo de regulação diferencial entre esses dois alelos, mas nossa abordagem não nos permite mais do que especular. Em indivíduos homozigotos, encontramos que a expressão desses dois alelos é significativamente diferente, sendo o alelo **002* cerca de 0,3 vezes mais expresso que o alelo **003*. Quando se juntam os grupos de **002* e **003* em um único grupo, não há diferença significativa na expressão de *KIR2DL1* em indivíduos com uma ou duas cópias do gene.

Em hemizigotos, o alelo *KIR2DL1*004* apresentou menor nível de expressão que os demais. No entanto, o tamanho amostral reduzido não permite uma estratificação muito grande da amostra.

BARI e colegas (2009) demonstraram que a substituição de cisteína por arginina na posição 245 de KIR2DL1 marca níveis diferenciais de expressão, provavelmente por afetar tanto eficiência da sinalização quanto a estabilidade da expressão na membrana em células estimuladas. A variante responsável por essa variação não sinônima (*rs34721508*) foi também analisada no contexto desse trabalho. Nossos resultados demonstram que esse SNP está fortemente associado com menores níveis de expressão de KIR2DL1 nas células NK ($p=0,0001$), o que pode ser responsável por modular as respostas celulares de NK observadas por BARI et al. (2009) e corroboram o trabalho anterior.

Além da associação com o SNP mencionado anteriormente, fizemos uma varredura de outros SNPs genotipados nesse trabalho no contexto da expressão de KIR2DL1. Dos 37 SNPs analisados, 8 SNPs foram associados a expressão diferencial de KIR2DL1 ($p<0,001$). Não foram encontrados dados de desequilíbrio de ligação dos SNPs analisados com outros sítios que poderiam ter um efeito regulatório sobre esse gene. Para os SNPs encontrados, foram explorados possíveis efeitos regulatórios com base em diferentes ferramentas de predição *in silico* (TABELA 15).

O SNP *rs2304224*, éxon 1, foi o único em que o efeito da substituição de aminoácidos foi predito como provavelmente prejudicial pela ferramenta PolyPhen-2, apesar de apresentar baixa distância físico-química de acordo com a escala de Grantham e tolerância pela predição de SIFT. Esse SNP também foi o único analisado em que somente o alelo principal possui sítios preditos de ligação de microRNAs, sendo que o alelo alternativo causaria bloqueio de todos os sítios existentes.

É interessante observar também os efeitos preditos para o SNP *rs111799279*, no éxon 5, que foi o único a apresentar possíveis efeitos regulatórios de acordo com o banco de dados RegulomeDB (BOYLE et al., 2012). Em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) e em células NK primárias, este SNP está associado a modificações de histonas, com repressão do *PolyComb*, uma família proteica responsável pela remodelação da cromatina, que promove silenciamento epigenético. Portanto, essa modificação poderia estar promovendo a transcrição da região nesses subtipos celulares. Além disso, o alelo alternativo desse SNP gera novos motivos de ligação a diversos fatores de transcrição, que regulam a transcrição gênica. Interessantemente, ambos os SNPs do éxon 1 e 5 (*rs2304224* e *rs111799279*, respectivamente) não são compartilhados entre os alelos *KIR2DL1*002* e **003*, que

apresentaram indícios de regulação diferencial nesse estudo. De maneira geral, as informações encontradas para o *loci* de *KIR2DL1* ainda são limitadas.

Com base nos dados apresentados, foi analisado se havia alguma associação entre os níveis de expressão de *KIR2DL1* e o genótipo do seu ligante HLA-C2. A hipótese inicial era que a presença de alelos do grupo C2 influenciariam negativamente a expressão e distribuição de *KIR2DL1* nas células NK. Os resultados demonstraram que o genótipo de *HLA-C* está associado tanto com a expressão quanto com a distribuição de *KIR2DL1* nas células NK. Porém, somente a presença do ligante C2 não se encontrou associada com os parâmetros testados, e sim a homozigose para alelos do grupo C2. Encontramos que indivíduos homozigotos para os alelos C2 apresentaram níveis significativamente menores de expressão de *KIR2DL1* ($p=0,004$), de cerca de 30%. Uma possível interpretação, apesar de especulativa, seria que essa diminuição poderia equilibrar os efeitos inibidores gerados pela maior disponibilidade do ligante. Em contrapartida, a homozigose para C2 foi associada com um maior número de células NK expressando *KIR2DL1*, o que pode ser um mecanismo para compensar a menor expressão do ligante por célula. Os resultados geram evidência de que os ligantes HLA tem um importante papel na regulação e educação das células NK e impactam nos níveis de expressão do receptor. Além disso, essa associação de ligantes HLA-C2 com alelos de maior expressão de *KIR2DL1* pode sugerir novos mecanismos de coevolução entre as famílias gênicas *KIR* e *HLA*.

7 CONCLUSÕES

- Foram encontrados onze alelos de *KIR2DL1* nas populações estudadas, sendo o alelo *KIR2DL1*003* o mais frequente em todas elas.
- De forma geral, a variabilidade do gene *KIR2DL1* na população de eurodescendentes de Curitiba foi diferente daquela observada em descendentes de japoneses e ameríndios.
- Entre as populações ameríndias, a variabilidade de *KIR2DL1* foi mais elevada na população de Guarani Nãndeva.
- Diferentes alelos do gene *KIR2DL1* apresentam diferentes níveis de expressão na superfície das células NK, sendo que o alelo **002* apresenta níveis cerca de duas vezes maiores que **004* e **006*.
- Apresentar duas cópias do gene não representa o dobro de expressão do receptor na superfície celular, apesar de termos encontrado diferença significativa para o alelo **002*. O fato de que o alelo **003* não muda seu nível de expressão em hemizigotos e homozigotos, diferentemente de **002*, sugere um possível mecanismo diferencial de regulação entre esses alelos.
- A homozigose para o grupo HLA-C2, e não somente a presença do alótipo C2, está associada com menores níveis de expressão de *KIR2DL1* e maior porcentagem de células que expressam *KIR2DL1*, uma possível consequência de regulação compartilhada e/ou coevolução dessas duas famílias gênicas.

REFERÊNCIAS

APPS, R. et al. Relative Expression Levels of the HLA Class-I Proteins in Normal and HIV-Infected Cells. **The Journal Of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3594-3600. 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1403234

AUGUSTO, D. et al. Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. **Immunogenetics**, v. 64, n. 2, p. 143-152. 2011. doi: 10.1007/s00251-011-0565-1

AUGUSTO, D. et al. KIR Gene Content in Amerindians Indicates Influence of Demographic Factors. **Plos ONE**, v. 8, n. 2. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0056755

AUGUSTO, D.; PETZL-ERLER, M. KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. **Human Genetics**, v. 134, n. 9, p. 929-940. 2015. doi: 10.1007/s00439-015-1579-9

AUGUSTO, D. et al. Pemphigus is associated with KIR3DL2 expression levels and provides evidence that KIR3DL2 may bind HLA-A3 and A11 in vivo. **European Journal Of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 2052-2060. 2015. doi: 10.1002/eji.201445324

BARRETT, J. C. et al. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265. 2005. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457

BHAT, R.; & WATZL, C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells – enhancement by therapeutic antibodies. **Plos ONE**, v. 2, n. 3, p. 326. 2007. doi: 10.1371/journal.pone.0000326

BIRON, C. A. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 24-34, 1997. doi: 10.1016/s0952-7915(97)80155-0

BOYLE, A. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790-1797. 2012. doi: 10.1101/gr.137323.112

CARRINGTON, M. et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1069-1075. 2005. doi: 10.1084/jem.20042158

CHAISRI, S. et al. Novel KIR genotypes and gene copy number variations in northeastern Thais. **Immunology**. 2017.

COOLEY, S. et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. **Blood**, v. 116, n. 14, p. 2411-2419. 2010. doi: 10.1182/blood-2010-05-283051

DUNPHY, S. et al. 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. **Genes And Immunity**, v. 16, n. 5, p. 301-310, 2015. doi: 10.1038/gene.2015.15.

EXCOFFIER, L., e LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to

perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567. 2010. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

FAURE, M.; LONG, E. O. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6208–6214, 2002. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6208

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791. 1985. doi: 10.2307/2408678

FENG, J. et al. Convergence on a distinctive assembly mechanism by unrelated families of activating immune receptors. *immunity*, v. 22, n. 4, 427–438. 2005. doi: 10.1016/j.immuni.2005.02.005

FU, Y. X., e LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 693–709. 1993.

GEDIL, M., STEINER, N. & HURLEY, C. KIR3DL2: diversity in a hematopoietic stem cell transplant population. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 3, p. 228–232. 2007. doi: 10.1111/j.1399-0039.2007.00880.x

GONZÁLEZ-GALARZA, F. F. et al. Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D784–D788. 2015. doi: 10.1093/nar/gku1166

GUINAN, K. et al. Receptor systems controlling natural killer cell function are genetically stratified in Europe. **Genes And Immunity**, v. 11, n. 1, p. 67-78. 2010. doi: 10.1038/gene.2009.60

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M. E. et al. KIR Gene in Ethnic and Mestizo Populations from Mexico. **Human Immunology**, v. 67, n. 1–2, p. 85–93. 2006. doi: 10.1016/j.humimm.2005.11.007

HIBY, S. et al. Combinations of Maternal KIR and Fetal HLA-C Genes Influence the Risk of Preeclampsia and Reproductive Success. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 200, n. 8, p. 957-965. 2004. doi: 10.1084/jem.20041214

HONG, H. A., LOUBSER, A. S., DE ASSIS ROSA, D., NARANBHAI, V., CARR, W., PAXIMADIS, M., LEWIS, D. A., TIEMESSEN, C. T., GRAY, C. M. Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping and HLA killer-cell immunoglobulin-like receptor-ligand identification by real-time polymerase chain reaction. **Human Immunology**, v. 78, n. 3, p. 185–194, 2011. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01749.x.

HSU, K. et al. Killer Ig-Like Receptor Haplotype Analysis by Gene Content: Evidence for Genomic Diversity with a Minimum of Six Basic Framework Haplotypes, Each with Multiple Subsets. **The Journal Of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5118-5129, 2002. doi: 10.4049/jimmunol.169.9.5118

IKEDA, H. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial hla loss by ctl expressing an nk inhibitory receptor. **Immunity**, v. 6, n. 2, p. 199-208. 1997. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80426-4

IVARSSON, M., MICHAËLSSON, J., & FAURIAT, C. Activating Killer Cell Ig-Like Receptors in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00184

KÄRRE, K. et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 675-678. 1986. doi: 10.1038/319675a0

KHAKOO, S. et al. HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. **Science**, v. 305, n. 5685, p. 872-874. 2004. doi: 10.1126/science.1097670

KIM, S. et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 709-713. 2005. doi: 10.1038/nature03847

KUMAR, S., STECHER, G. e TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874. 2016. doi: 10.1093/molbev/msw054

LANIER, L. L. et al. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 6, p. 2233–8. 1989. doi: 2189344

LANIER, L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 495-502. 2008. doi: 10.1038/ni1581

MACE, E. et al. Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. **Immunology And Cell Biology**, v. 92, n. 3, p. 245-255. 2014. doi: 10.1038/icb.2013.96

MARTIN, M. et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nature Genetics**, v. 31, p. 429-434. 2002. doi: 10.1038/ng934

MARTIN, M. et al. Cutting Edge: Expansion of the KIR Locus by Unequal Crossing Over. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 5, p. 2192-2195. 2003. doi: 10.4049/jimmunol.171.5.2192

Minitab 17 Statistical Software (2010). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)

MOESTA, A. et al. Synergistic Polymorphism at Two Positions Distal to the Ligand-Binding Site Makes KIR2DL2 a Stronger Receptor for HLA-C Than KIR2DL3. **The Journal Of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 3969-3979. 2008. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.3969

NELSON, G. et al. Cutting Edge: Heterozygote Advantage in Autoimmune Disease: Hierarchy of Protection/Susceptibility Conferred by HLA and Killer Ig-Like Receptor Combinations in Psoriatic Arthritis. **The Journal Of Immunology**, v. 173, n. 7, p. 4273-4276. 2004. doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4273

NORMAN, P. et al. Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. **Immunogenetics**, v. 52, n. 3-4, p. 195-205. 2001. doi: 10.1007/s002510000281

NORMAN, P.; PARHAM, P. Complex interactions: The immunogenetics of human leukocyte antigen and killer cell immunoglobulin-like receptors. **Seminars In Hematology**, v. 42, n. 2, p. 65-75. 2005. doi: 10.1053/j.seminhematol.2005.01.007

NORMAN, P. J. et al. Co-evolution of Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I Ligands with Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors (KIR) in a Genetically Diverse Population of Sub-Saharan Africans. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 10. 2013. doi: 10.1371/journal.pgen.1003938

OLDER AGUILAR, A. et al. Coevolution of Killer Cell Ig-Like Receptors with HLA-C To Become the Major Variable Regulators of Human NK Cells. **The Journal Of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 4238-4251. 2010. doi: 10.4049/jimmunol.1001494

ORR, M.; LANIER, L. Natural Killer Cell education and tolerance. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 847-856. 2010. doi: 10.1016/j.cell.2010.08.031

PARHAM, P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. **Immunology Letters**, v. 92, p. 11-13. 2004. doi: 10.1016/j.imlet.2003.11.016

PARHAM, P. The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. **Seminars In Immunology**, v. 20, n. 6, p. 311-316. 2008. doi: 10.1016/j.smim.2008.10.002

PEGRAM, H. et al. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. **Immunology And Cell Biology**, v. 89, p. 216–224, 2011. doi: 10.1038/icb.2010.78

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1025-1029, 2005. doi: 10.1084/jem.20050499

RAJALINGAM, R. et al. Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. **Immunogenetics**, v. 53, n. 12, p. 1009-1019. 2002. doi: 10.1007/s00251-001-0425-5

RAJALINGAM, R. Overview of the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor System. **Methods in Molecular Biology**, v. 882, p. 391-414. 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-842-9_23

REICH, D. et al. Reconstructing Native American population history. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 370-374. 2012. doi: 10.1038/nature11258

ROBINSON, J. et al. IPD-the Immuno Polymorphism Database. **Nucleic acids research**, v. 38, p. D863-9, 2010.

ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology Evolution XX**: (in press). 2017. doi: 10.1093/molbev/msx248

SAITOU, N., e NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425. 1987. doi: citeulike-article-id:93683

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

SKOGLUND, P. et al. Genetic evidence for two founding populations of the Americas. **Nature**. 2015. doi: 10.1038/nature14895

SMYTH, M. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4, p. 501-510. 2005. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.034

SUN, J.; BEILKE, J.; LANIER, L. Adaptive immune features of natural killer cells. **Nature**, v. 457, n. 7233, p. 1168-1168. 2009. doi: 10.1038/nature07833

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–95. 1989.

TAMURA, K., NEI, M. e KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11030–11035. 2004. doi: 10.1073/pnas.0404206101

TAO, S. D. et al. KIR3DL1 genetic diversity and phenotypic variation in the Chinese Han population. **Genes and Immunity**, v. 15, n. 1, p. 8–15. 2014. doi: 10.1038/gene.2013.55

TONEVA, M. et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 4, p. 358-362. 2001. doi: 10.1034/j.1399-0039.2001.057004358.x

TROWSDALE, J.; MOFFETT, A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. **Seminars In Immunology**, v. 20, n. 6, p. 317-320. 2008. doi: 10.1016/j.smim.2008.06.002

TSUNETO, L. T. et al. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. **Tissue Antigens**, v. 62, n. 6, p. 512–526. 2003. doi: 10.1046/j.1399-0039.2003.00139.x

UHRBERG, M. et al. The Repertoire of Killer Cell Ig-Like Receptor and CD94:NKG2A Receptors in T Cells: Clones Sharing Identical TCR Rearrangement Express Highly Diverse Killer Cell Ig-Like Receptor Patterns. **The Journal Of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 3923-3932. 2001. doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3923

UHRBERG, M. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4, p. 471-475. 2005. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.029

UHRBERG, M.; PARHAM, P.; WERNET, P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. **Immunogenetics**, v. 54, n. 4, p. 221-229, 2002. doi: 10.1007/s00251-002-0463-7

VALIANTE, N. et al. Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 739-751, 1997. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80393-3

VAN DER SLIK, A. et al. KIR in Type 1 Diabetes: Disparate Distribution of Activating and Inhibitory Natural Killer Cell Receptors in Patients Versus HLA-Matched Control Subjects. **Diabetes**, v. 52, n. 10, p. 2639-2642. 2003. doi: 10.2337/diabetes.52.10.2639

VILCHES, C.; PANDO, M.; PARHAM, P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. **Immunogenetics**, v. 51, n. 8-9, p. 639-646. 2000. doi: 10.1007/s002510000184

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. **Annual Review Of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 217-251, 2002. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942

WENDE, H. et al. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human Chromosome 19q13.4. **Mammalian Genome**, v. 10, n. 2, p. 154-160. 1999. doi: 10.1007/s003359900961

WILSON, M. et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 97, n. 9, p. 4778-4783, 2000. doi: 10.1073/pnas.080588597

WRIGHT. Evolution and the Genetics of Populations vol. 4. **The University of Chicago Press**, Chicago, v. IV, p. 157. 1978.

XIONG, S. et al. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4264-4272. 2013. doi: 10.1172/jci68991

XUE, T. et al. KIR2DL1-HLA Signaling Pathway: Notable Inhibition in the Cytotoxicity of Allo-NK Cell against KG1A Cell. **Clinical Laboratory**, v. 59, n. 05+06, p. 613-619. 2013. doi: 10.7754/clin.lab.2012.120607

YAWATA, M. et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 633-645. 2006. doi: 10.1084/jem.20051884

YAWATA, M., et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 633–645. 2006. doi: 10.1084/jem.20051884

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa **GENES E SUAS VARIAÇÕES: ANÁLISE MOLECULAR, EVOLUTIVA E FUNCIONAL, EM POPULAÇÕES E EM DOENÇAS**. Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

· OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo desse estudo é conhecer as variações normais de genes (formas alternativas de genes, denominadas *alelos*) e suas frequências, em populações humanas. Por exemplo, para grupos sanguíneos, há 3 variações (alelos) principais: A, B e O. As combinações dessas resultam no grupo sanguíneo do indivíduo (combinações A/A ou A/O = grupo A; B/B ou B/O = grupo B; A/B = grupo AB; O/O = grupo O). As frequências de A, B e O diferem, entre populações. Por exemplo, nas populações indígenas das Américas o grupo sanguíneo B praticamente inexistente (quase 100% das pessoas pertencem ao tipo O), enquanto na Europa 35% das pessoas são do tipo B e, na África, 20%. Enquanto a distribuição geográfica/étnica das variações do gene ABO são bem conhecidas, a diversidade populacional da maioria dos outros genes ainda é desconhecida. Nesse trabalho de pesquisa analisaremos vários outros genes, em grupos da população brasileira. O resultado será útil para conhecer as origens e as relações históricas das populações atuais e para compreender as causas da variabilidade humana normal. Por comparação das frequências em pessoas saudáveis e pessoas que sofrem da doença pênfigo, será possível identificar quais variações genéticas tornam as pessoas mais (ou menos) susceptíveis a essa doença.

· PROCEDIMENTOS

Se você participar deste estudo, será colhida uma amostra de seu sangue (50 ml, ou seja, correspondente ao volume de um copo de cafezinho) e você irá responder a algumas perguntas sobre a sua origem geográfica e a origem de seus ancestrais, assim como sobre a sua saúde. Você pode recusar-se a responder a qualquer das perguntas, se assim desejar.

· RISCOS

Os riscos envolvidos na execução do estudo são raros e transitórios. A coleta da amostra de sangue poderá causar desconforto e, raramente, sangramento, hematoma, infecção ou desmaio. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado para justificar a sua falta. Se houverem danos decorrentes da pesquisa, você será devidamente indenizado.

· BENEFÍCIOS

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

· PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A sua participação neste estudo é *voluntária*. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você.

· **ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO**

Caso você autorize, seu material biológico e informações associadas permanecerão armazenados em biorrepositório para utilização no projeto citado acima. Caso haja necessidade de utilizá-lo no futuro, você será contatado para consentir ou não sobre o novo uso de sua amostra. Nesse caso, seu consentimento será formalizado através de um novo TCLE específico. Quando isso não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será submetida à apreciação do CEP e sempre que couber também da CONEP, em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS nº 441/2011). Seu material biológico será armazenado por 05 anos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Luiza Petzl Erler, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética. Contudo, a qualquer momento você poderá solicitar que seu material biológico não seja mais utilizado, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você. Entretanto, o material biológico poderá ser descartado devido à inadequação por critérios de qualidade, seguindo normas definidas na legislação brasileira.

· **ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS**

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

· **IDENTIFICAÇÃO**

A sua identificação e todos seus dados pessoais, clínicos e de exames laboratoriais serão mantidos em sigilo. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

· **ACESSO AOS RESULTADOS**

Você deseja ser informada(o) sobre os resultados obtidos com esse material biológico?

() *Não quero ser informada(o) sobre os resultados.*

() *Quero ser informada(o) sobre os resultados.*

Estaremos à disposição para informar e explicar sobre todos os resultados obtidos com sua amostra biológica e sobre os estudos nos quais ela foi utilizada. Você poderá nos contatar no Departamento de Genética da UFPR e nos telefones que se encontram neste documento.

· **EQUIPE DE PESQUISADORES**

· Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler - Departamento de Genética, UFPR.

· Colaboradores: Dra. Angélica B. Winter Boldt (UFPR); Dra. Danielle Malheiros Ferreira (UFPR); Dr Danillo Gardenal Augusto; Dr. Eduardo R. Amazonas de Almeida (UFPR); Dra. Ana Maria Roselino; Dr. Alfredo Marquardt Filho; Dra. Noemi F. Pereira; Dra. Luiza T. Tsuneto (UEM).

Número de telefones: (+41) 3361-1746 e 3361-1724

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja, os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no

trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu material biológico sabendo que, se houver uma nova pesquisa, essa será avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e sempre que couber também pela CONEP e que serei contatado novamente, para consentir ou não o uso de meu material, através de um TCLE específico.

_____, ____ de _____ de _____
local data

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Nome do Voluntário
RG

Nome do Pesquisador
RG

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é assinado em duas vias, uma para você e outra que será arquivada pela pesquisadora responsável.

Este Termo de Consentimento foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR. Esse Comitê é responsável pela análise das pesquisas e defesa dos interesses dos seus sujeitos, em sua integridade e dignidade. Dessa forma, contribui para o desenvolvimento da pesquisa respeitando os princípios éticos preconizados pela Resolução CNS 466/12 e suas complementares.

Endereço: Bloco Central, Térreo, Hall da Direção, HC-UFPR, Curitiba, PR.

Horário de atendimento: das 08:00 h às 17:00 h. Fone/Fax: (+41) 3360-1041