

CLEUSA SCHAFHAUSER

**DIVERSIDADE ALÉLICA E HAPLOTÍPICA DE GENES HLA
NÃO-CLÁSSICOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO
DESTES COM OUTROS ONZE GENES DO MHC,
EM POPULAÇÕES INDÍGENAS E
CAUCASÓIDES DO PARANÁ.**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Genética, Setor de Ciências Bio-
lógicas, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

1998

CLEUSA SCHAFFHAUSER

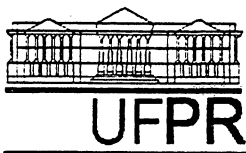
**DIVERSIDADE ALÉLICA E HAPLOTÍPICA DE GENES HLA
NÃO-CLÁSSICOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO
DESTES COM OUTROS ONZE GENES DO MHC,
EM POPULAÇÕES INDÍGENAS E
CAUCASÓIDES DO PARANÁ.**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Genética, Setor de Ciências Bio-
lógicas, Universidade Federal do Paraná.

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

CURITIBA

1998



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA (CPGG)

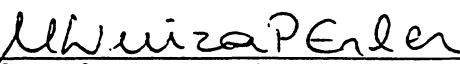
P A R E C E R

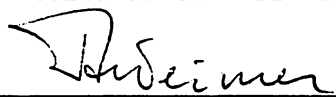
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese a Nível de Mestrado, a que se submeteu **CLEUSA SCHAFHAUSER**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito " A ".

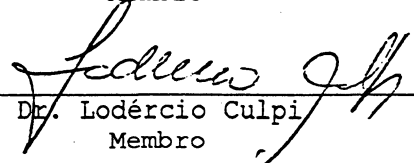
Secretaria da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 21 de julho de 1998.

Banca Examinadora:


Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Petzl-Erler
Orientadora e Presidente


Prof^a. Dr^a. Tania de Azevedo Weimer
Membro


Prof. Dr. Lodércio Culp
Membro

Visto:


Prof^a. Dr^a. Marta Margarete Cestari
Vice-coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Genética

Arq. Parecer1, pg.4.DOC

*À minha família, e em especial
minha mãe Laura.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Luiza Petzl-Erler pelos anos de paciência e orientação que tem me dedicado, desde a Iniciação Científica.

À amiga Eni P. Bompeixe por incentivar o meu ingresso ao curso de Mestrado.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Genética pelos bons anos de convívio.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Molecular Humana, pela amizade, apoio, compreensão e pelas divertidas “saídas”.

Ao Christian, pela sua paciência e ajuda na análise estatística deste trabalho, e principalmente pela sua amizade.

Aos índios Kaingang e Guarani, e componentes do Painei do Laboratório de Genética Molecular Humana pelo concessão do material desse estudo.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	1
1.1.1. HISTÓRICO.....	1
1.2. LOCALIZAÇÃO, ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DOS GENES E PRODUTOS GÊNICOS DO MHC HUMANO.....	3
1.2.1. REGIÃO DE CLASSE I.....	3
1.2.2. REGIÃO DE CLASSE II.....	7
1.2.3. REGIÃO DE CLASSE III.....	9
1.3. POLIMORFISMO DO HLA.....	10
1.4. GENES HLA DE CLASSE I NÃO-CLÁSSICOS.....	13
1.4.1. HLA-E.....	14
1.4.1.1. Polialelismo e Polimorfismo de HLA-E.....	17
1.4.2. HLA-G.....	18
1.4.2.1. Polialelismo e Polimorfismo de HLA-G.....	21
1.5. GENES HLA DE CLASSE II NÃO-CLÁSSICOS.....	24
1.5.1. HLA-DM.....	24
1.5.1.1. Polialelismo e Polimorfismo de HLA-DMA e HLA-DMB.....	30
1.6. O POLIMORFISMO DE GENES DO MHC EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS.....	32
1.6.1. AS TRIBOS KAINGANG E GUARANI.....	38
1.6.1.1. Guarani.....	38
1.6.1.2. Kaingang.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
3. JUSTIFICATIVA.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. AMOSTRAS POPULACIONAIS.....	43
4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	44

4.3. ELETROFORESE PARA CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO	46
4.4. PREPARO DE “SPOT BLOTS”	47
4.5. MARCAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA SEQUÊNCIA-ESPECÍFICOS (SSO) COM BIOTINA	47
4.6. DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA ATRAVÉS DA HIBRIDAÇÃO COM SSO.....	48
4.6.1. PRÉ-HIBRIDAÇÃO	48
4.6.2. HIBRIDAÇÃO.....	48
4.6.3. LAVAGEM DE BAIXA ESTRINGÊNCIA.....	50
4.6.4. LAVAGEM DE ALTA ESTRINGÊNCIA.....	50
4.6.5. REVELAÇÃO	50
4.7. REGISTRO DOS RESULTADOS.....	51
4.8. DESCOLORAÇÃO E DESIBRIDAÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO-SONDA	52
4.9. SOLUÇÕES.....	52
4.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS	55
5. RESULTADOS	58
5.1. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	58
5.1.1. ALELOS HLA-E	58
5.1.2. ALELOS E GENÓTIPOS DE HLA-G.....	60
5.1.3. ALELOS E GENÓTIPOS DE HLA-DMA	60
5.1.4. ALELOS E GENÓTIPOS DE HLA-DMB.....	60
5.2. ANÁLISES DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	63
5.3. TESTE DE NEUTRALIDADE	64
5.4. TESTES DE HOMOGENEIDADE	64
5.5. HAPLÓTIPOS ESTENDIDOS DAS POPULAÇÕES INDÍGENAS	65
5.6. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA PARES DE LOCOS.	66
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÃO.....	102
8. ANEXOS.....	104
8.1. ALELOS HLA-E	104
8.2. ALELOS HLA-G.....	107
8.3. ALELOS HLA-DMA	109
8.4. ALELOS HLA-DMB	111
8.5. FENÓTIPOS DE TODOS OS INDIVÍDUOS.....	114
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das populações indígenas do estado do Paraná.	40
Tabela 2. Condições utilizadas na PCR.	45
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores.	46
Tabela 4. Oligonucleotídeos-sonda utilizados, mostrando sequência, especificidade, temperatura de hibridação (Th) e temperatura de lavagem de alta estringência (Tm).	49
Tabela 5. Frequências alélicas (%) de HLA-E, HLA-G, HLA-DMA e HLA-DMB.	59
Tabela 6. Frequências genotípicas (%) de HLA-G.	61
Tabela 7. Frequências genotípicas (%) de HLA-DMA e HLA-DMB.	62
Tabela 8. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.	63
Tabela 9. Valores de p obtidos pelo teste de Ewens-Watterson de neutralidade.	64
Tabela 10. Haplótipos estendidos mais comuns em Kaingangues e Guaranis.	66
Tabela 11. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-G e HLA-A.	71
Tabela 12. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-G e HLA-B-C.	72
Tabela 13. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DMB.	74
Tabela 14. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e TAP1.	74
Tabela 15. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e TAP2.	75
Tabela 16. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e LMP2.	76
Tabela 17. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e LMP7.	76
Tabela 18. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DRA.	77
Tabela 19. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DR.	77
Tabela 20. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DP.	78
Tabela 21. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e TAP1.	79
Tabela 22. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e TAP2.	80
Tabela 23. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e LMP2.	81
Tabela 24. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e LMP7.	81
Tabela 25. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e HLA-DRA.	82
Tabela 26. Frequências haplotípicas e desequilíbrios de ligação entre HLA-DMB e HLA-DR.	82

Tabela 27. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e HLA-DP.	83
Tabela 28. Frequências alélicas (%) de HLA-E em diversas populações.	91
Tabela 29. Frequências alélicas (%) de HLA-G em diversas populações.	92
Tabela 30. Frequências alélicas (%) de HLA-DMA em diversas populações.	94
Tabela 31. Frequências alélicas (%) de HLA-DMB em diversas populações.	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do MHC humano.....	4
Figura 2. Diagrama esquemático das molécula HLA de classe I.	6
Figura 3. Diagrama esquemático da molécula HLA de classe II.....	8
Figura 4. Via de apresentação de antígenos pelas moléculas de classe II, mostrando a molécula HLA-DM no compartimento endocítico.	29

RESUMO

Genes HLA clássicos e não-clássicos diferem em muitos aspectos, como distribuição tecidual, função e polimorfismo. O principal objetivo deste trabalho é caracterizar o polimorfismo de genes não-clássicos de classe I, HLA-E e HLA-G, e de classe II, HLA-DMA e HLA-DMB em duas tribos indígenas, Kaingang e Guaraní, e também uma amostra de caucasóides do Paraná, através de PCR-SSO. Para o loco HLA-DMA, dos quatro alelos descritos (*0101, *0102, *0103 e *0104), identificamos apenas dois (*0101 e *0102) nas duas tribos indígenas e, em caucasóides, observamos todos os quatro alelos, sendo que DMA*0101 foi sempre o mais comum. Para HLA-DMB, dos seis alelos descritos (*0101, *0102, *0103, *0104, *0105 e *NEW), observamos três alelos nas populações indígenas (*0101, *0103 e *0104) e cinco em caucasóides (*0101, *0102, *0103, *0105 e *NEW). O alelo *0103 foi o mais comum em Kaingangues e Guaranis, e em caucasóides, *0101 apresentou maior frequência. Para o loco HLA-E, foram identificados os seguintes alelos *0101, *01031, *01032 e *blank, sendo *0101 o mais comum nas populações indígenas e *blank em caucasóides. Para o loco HLA-G, observamos nas populações indígenas cinco alelos (*01011, *01012, *01013, *0103 e *0104) dos sete descritos, sendo que *01013 só ocorre em Kaingangues. Constatamos uma alta frequência do alelo *0103 em Kaingangues. Em Guaranis, os alelos G*01012 e *01011 foram os mais comuns. em caucasóides, foram encontrados os cinco alelos citados acima, sendo G*01011 o mais frequente. Os alelos representados em *itálico* (DMB*0104 e G*01013) provavelmente foram introduzidos nessas populações por fluxo gênico de populações não-indígenas. Esses resultados indicam uma variabilidade menor dos genes analisados, principalmente para HLA-DMA e HLA-DMB nas populações indígenas quando comparadas com a amostra de caucasóides deste trabalho e também com outras populações estudadas. É interessante que os alelos ausentes nas populações indígenas apresentam baixas frequências em caucasóides. Constatamos que a heterozigosidade é semelhante para indígenas e caucasóides e que não há evidências de seleção balanceadora. Com base em dados sorológicos e moleculares de estudos anteriores, e na análise de segregação em famílias das populações indígenas, foram construídos haplótipos estendidos, contendo os seguintes genes do MHC: HLA-G, -A, C, -B, -DRA, -DR, -DQ, TAP2, LMP7, TAP1, LMP2, -DMB e -DMA. Realizamos análises de desequilíbrio de ligação entre HLA-G com os genes de classe I clássicos; para classe II, analisamos possíveis desequilíbrios entre alelos de HLA-DMA e HLA-DMB e destes com HLA-DR, DRA, DPA1, DPB1, LMP2, LMP7, TAP1 e TAP2. Os resultados indicam que ocorre desequilíbrio de ligação nas populações indígenas mas não em caucasóides, para a maioria dos locos. O desequilíbrio de ligação observado difere entre Guaranis e Kaingangues. As diferenças de desequilíbrio de ligação entre as populações ameríndias e caucasóides, e especialmente entre as duas populações indígenas, evidenciam a atuação de mecanismos evolutivos estocásticos, principalmente deriva genética atuando sobre os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano.

ABSTRACT

Classical and non-classical HLA genes differ at tissue distribution, function and polymorphism. The purpose of this study was therefore to describe the polymorphism of non-classical class I genes, HLA-E and HLA-G, and non-classical class II genes, HLA-DMA and HLA-DMB, in two Brazilian Indian tribes, Kaingang and Guarani, and one Caucasoid population from State of Paraná, by the polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSO) typing method. The HLA-DMA locus has shown only 2 alleles (*0101 and *0102) in the two Indian samples, whereas all of the 4 alleles already described were identified in Caucasoids (*0101, *0102, *0103 and *0104), with DMA*0101 as the most common. Six alleles of HLA-DMB have been described (*0101, *0102, *0103, *0104, *0105 and *NEW) and we found three of them among the Indian populations (*0101, *0103 and *0104) and five in Caucasoids (*0101, *0102, *0103, *0105 and *NEW). Kaingang and Guarani showed the *0103 allele as the most common, while in Caucasoids *0101 allele presented higher frequency. The alleles *0101, *01031, *01032 and *blank were identified for the HLA-E locus, with the *0101 allele being the most common in Indian populations and *blank in Caucasoids. Five alleles of the HLA-G locus were observed in Indians (*01011, *01012, *01013, *0103 and *0104) among seven described, with *01013 being detected only in Kaingang. We have found a high frequency of *0103 in Kaingang. Among Guarani the most common alleles were G*01012 and *01011. Caucasoids showed all of five alleles, with G*01011 as the most frequent. DMB*0104 and G*01013 alleles were probably introduced in these populations by gene flow coming from non-Indian populations. These findings demonstrate a smaller variability on analysed genes, mainly in HLA-DMA and HLA-DMB within indians compared to the Caucasoid sample and to other populations. Interestingly, absent alleles among indians present low frequencies among Caucasoids. We verified a similarity of heterozygosity in Indians and Caucasoids and no evidence of balance selection. Serological and molecular data previously reported and segregation analysis in Indian families were the basis to build extended haplotypes with the following MHC genes: HLA-G, -A, -C, -B, -DRA, -DR, -DQ, TAP2, LMP7, TAP1, LMP2, -DMB and -DMA. We performed linkage disequilibrium analysis between HLA-G with classical class I genes; possible disequilibrium for class II was analysed between HLA-DMA and HLA-DMB alleles, and these with HLA-DR, DRA, DPA1, DPB1, LMP2, LMP7, TAP1 and TAP2. Our findings indicate that the majority of locus are in linkage disequilibrium among Indian populations, but not in Caucasoids. Linkage disequilibrium observed is not the same in Guarani and Kaingang tribes. Differences of linkage disequilibrium among Amerindian populations and Caucasoids, and specially between the two tribes, make evident the action of stochastic evolutionary mechanisms, mainly genetic drift upon the human major histocompatibility complex genes.

1.INTRODUÇÃO

1.1. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

1.1.1. HISTÓRICO

As moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) foram originalmente identificadas por pesquisadores trabalhando com transplantes de tecidos em camundongos de linhagens diferentes. Nos anos 30, George D. Snell e Peter A. Gorer descreveram um loco no cromossomo 17 do camundongo, designado H-2, que determinava a rejeição/aceitação de tecidos transplantados de uma linhagem de camundongo para outra (de acordo com ENGELHARD, 1994). Posteriormente demonstrou-se que H-2 é formado por agrupamentos de genes, denominados classes I, II e III. Na região de classe I, encontram-se os locos K, D, L, Qa e Tla. Os locos K e D codificam os antígenos principais de histocompatibilidade. A região de classe II contém os locos I-A e I-E. O loco S, localizado na região de classe III, codifica proteínas do complemento (ALBERT e GÖTZE, 1977).

O conhecimento sobre o MHC humano iniciou com Dausset, nos anos 50, o qual observou que soros de indivíduos politransfundidos podem ter anticorpos capazes de aglutinar os leucócitos de outros indivíduos, identificando assim o equivalente humano ao sistema H-2 murino: o sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). Esta foi a base de definição do primeiro antígeno HLA, descoberto na superfície de leucócitos, e denominado Mac (hoje

HLA-A2) (DAUSSET, 1958).

Observações independentes da presença de anticorpos anti-HLA no soro de mulheres grávidas foram feitas por van Rood e Payne. Posteriormente, VAN ROOD e VAN LEEUWEN (1963), estabeleceram os primeiros grupos antigênicos, 4a e 4b, que atualmente correspondem aos antígenos públicos Bw4 e Bw6. PAYNE *et al.* (1964) descreveram as especificidades LA1 e LA2, que mais tarde foram designadas HLA-A1 e A2, respectivamente.

Na década de 60 demonstrou-se que os antígenos leucocitários poderiam ser detectados em linfócitos por citotoxicidade mediada por anticorpos e complemento, o que levou ao desenvolvimento da técnica de microlinfocitotoxicidade (TERASAKI e McCLELLAND, 1964).

As funções fisiológicas das moléculas MHC tornaram-se evidentes somente a partir dos anos 60. Benacerraf, McDevitt e seus colaboradores mostraram que diferentes linhagens intercruzadas de camundongos produziam ou não anticorpos em resposta à imunização com antígenos polipeptídicos. Esta capacidade de resposta era um traço autossômico dominante determinado por um gene mapeado na região do MHC. Os genes que controlam a resposta imune foram chamados Genes de Resposta Imune (Ir) (de acordo com ABBAS *et al.*, 1997).

O conhecimento atual sobre o sistema HLA foi possível devido aos vários estudos realizados mundialmente, em uma série de workshops, sendo que o I Workshop Internacional de Histocompatibilidade foi realizado em 1964. No IV Workshop, em 1970, foi estabelecido que o sistema HLA, correspondia a pelo menos 3 locos polialélicos distintos (denominados HLA-A, HLA-B e HLA-Cw).

A partir da década de 80, a diversidade dos genes HLA tem sido investigada por inúmeras técnicas moleculares. Essas abordagens ampliaram o conhecimento sobre a variabilidade desses genes e permitiram a descoberta dos genes HLA chamados não-clássicos.

1.2. LOCALIZAÇÃO, ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DOS GENES E PRODUTOS GÊNICOS DO MHC HUMANO.

O MHC humano localiza-se no braço curto do cromossomo 6, na posição 6p21.3, e estende-se por aproximadamente 4000 kb (figura 1). Nesse segmento encontra-se um grande número de genes, em média um gene ou pseudogene a cada 20 kb (WEI *et al.*, 1993). Devido à proximidade desses genes, a combinação de alelos de diferentes locos de um único cromossomo costuma ser herdada em uma unidade, denominada haplótipo.

O MHC está dividido em três regiões:

- classe I
- classe II
- classe III

1.2.1. REGIÃO DE CLASSE I.

Situada na porção mais telomérica do MHC, ocupa cerca de 2000 kb e inclui mais de 20 genes, pseudogenes e fragmentos gênicos. Os genes mais estudados, HLA-A, HLA-B, HLA-C (chamados genes clássicos), codificam moléculas HLA de classe I. Esses locos são extremamente polialélicos e polimórficos, tendo sido descritos 83 alelos para o loco HLA-A, 186 para o loco -B e 42 para -C (BODMER *et al.*, 1997).

A clonagem e caracterização da região de classe I resultou na identificação de vários outros genes, HLA-E, HLA-F, HLA-G, (chamados não-clássicos), pseudogenes e fragmentos

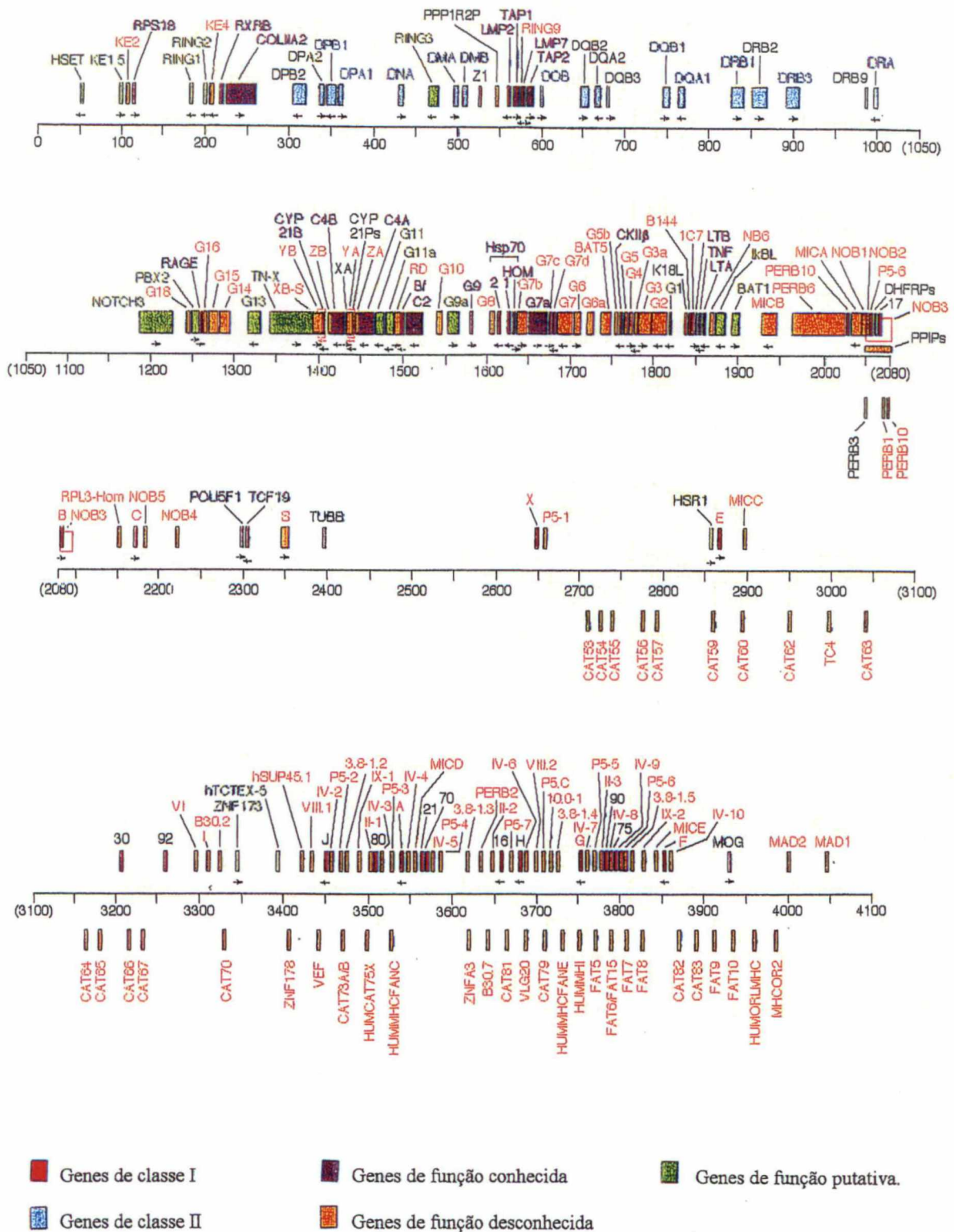


Figura 1. Mapa do MHC humano (CAMPBELL e TROWSDALE, 1997).

gênicos como HLA-H, HLA-J, HLA-7.5/9P (MORALES *et al.*, 1993). O polialelismo dos genes HLA não-clássicos é menos acentuado que o dos genes clássicos, tendo sido descritos até o momento 5 alelos para o loco HLA-E e 7 para o loco HLA-G.

Todas as moléculas HLA de classe I são formadas por duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia pesada ou cadeia α , de cerca de 44 kilodaltons (kDa), codificada pelo gene HLA no cromossomo 6, ligada não-covalentemente a um polipeptídeo não-polimórfico de 12 kDa, a β_2 -microglobulina (β_2 -m), codificada por um gene localizado no cromossomo 15 (figura 2).

A cadeia pesada das moléculas de classe I consiste de três domínios extracelulares, designados $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$; uma região transmembrana hidrofóbica e uma região intracelular hidrofílica.

Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ formam um sulco ou fenda que serve de sítio de ligação ao antígeno, onde se encaixa o peptídeo processado. A maior parte do polimorfismo das moléculas de classe I concentra-se nessa região, permitindo assim que o sítio de ligação ao antígeno varie de um produto alélico a outro (STITES E TERR, 1991). O domínio $\alpha 3$ é o mais conservado e liga-se não-covalentemente à β_2 -microglobulina.

A região transmembrana hidrofóbica ancora a molécula através da cadeia α . A região citoplasmática não é conservada entre diferentes isótipos de classe I, mas vários aspectos específicos relacionados à estrutura e função são altamente conservados (ABBAS *et al.*, 1997).

As moléculas de classe I clássicas, HLA-A, -B, -C, expressam-se na superfície de quase todas as células nucleadas (STITES E TERR, 1991), e têm a função de apresentar às células T os antígenos protéicos processados. As moléculas de classe I ligam, no retículo endoplasmático, peptídeos, derivados de proteínas sintetizadas na própria célula. Esse complexo peptídeo + molécula HLA é reconhecido por células T citotóxicas ou supressoras, as

quais apresentam CD8 na membrana. (Para maior detalhamento consultar BJORKMAN e PARHAM, 1990; STITES E TERR, 1991; BUC, 1993; NEEFJES e MOMBURG, 1993; ENGELHARD, 1994; ABBAS, *et al.*, 1997).

Quanto aos genes não-clássicos, sua expressão e função serão tratados adiante.

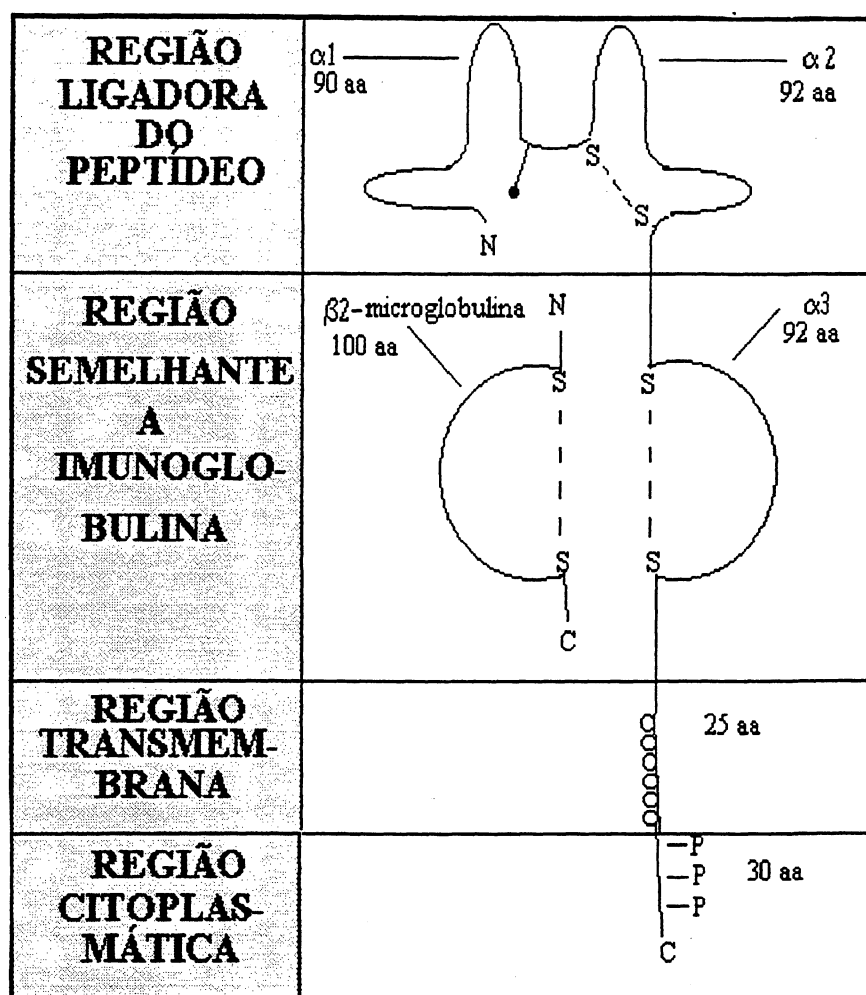


Figura 2. Diagrama esquemático da molécula HLA de classe I. N e C representam a porção amino e carboxi terminais da cadeia, respectivamente; S--S a ligação dissulfídica intracadeia (Modificado de ABBAS *et al.*, 1997).

1.2.2. REGIÃO DE CLASSE II.

Essa região ocupa cerca de 850 kb. É a região mais centromérica do MHC e contém mais de 30 genes, entre os quais estão os que codificam as moléculas HLA de classe II, que são heterodímeros constituídos de duas cadeias glicoprotéicas: uma cadeia α , com 34 kDa e uma cadeia β , com 29 kDa, associadas não-covalentemente (figura 3).

As cadeias α e β são codificadas por genes separados, denominados A e B. O símbolo que identifica esses genes é sempre HLA-D, seguido da letra que designa a sub-região (P, N, M, O, Q, R, do centrômero para o telômero), e pelas letras A ou B, indicando cadeia α ou β e também números, quando existe mais de um gene ou pseudogene A ou B.

Existem 4 genes que codificam as cadeias α das moléculas HLA de classe II: HLA-DPA1, -DMA, -DQA1 e -DRA e sete genes que codificam as cadeias β : HLA-DPB1, -DMB, -DQB1, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5. Foram também mapeados nessa região os genes LMP2, LMP7, TAP1 e TAP2 e também genes de função desconhecida como HLA-DOA e HLA-DOB além dos pseudogenes HLA-DPB2, -DPA2, -DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8, -DRB9 (BODMER *et al.*, 1997). Muitos genes A e B são polialélicos e polimórficos, de modo que a maioria das moléculas HLA de classe II é o resultado da associação dos produtos de 2 genes polimórficos, como por exemplo: DPA1 e DPB1 formando a molécula HLA-DP e DQA1 e DQB1 formando HLA-DQ.

Até 1996, haviam sido reconhecidos 10 alelos HLA-DPA1, 4 HLA-DMA, 18 HLA-DQA1, 2 HLA-DRA, 77 HLA-DPB1, 5 HLA-DMB, 31 HLA-DQB1, e 184 HLA-DRB1 (BODMER *et al.*, 1997).

Cada cadeia formadora do heterodímero possui três regiões, de forma semelhante às moléculas HLA de classe I: uma porção extracelular, uma região transmembrana hidrofóbica e

uma região intracelular hidrofílica.

Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ mostram uma semelhança geral da sequência com os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da classe I, formando a fenda ou sulco para ligação do peptídeo. O polimorfismo estrutural das moléculas de classe II está concentrado na fenda, da mesma forma como para as moléculas de classe I (ABBAS *et al.*, 1997).

Os domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$ são pouco polimórficos e é no domínio $\beta 2$ que está o sítio de ligação para a molécula CD4. A região transmembrana hidrofóbica insere-se na membrana plasmática e ancora as cadeias à membrana celular.

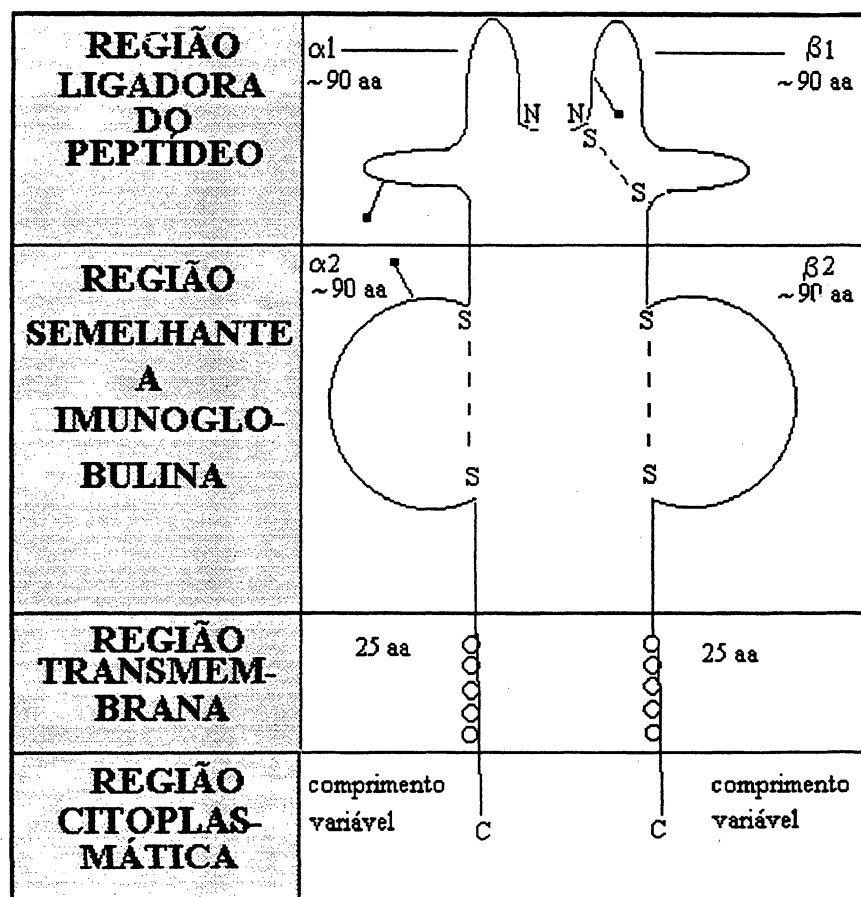


Figura 3. Diagrama esquemático da molécula HLA de classe II. N e C representam a porção amino e carboxi terminais da cadeia, respectivamente; S--S a ligação dissulfídica intracadeia (Modificado de ABBAS *et al.*, 1997).

As moléculas MHC de classe II expressam-se na superfície de linfócitos B, macrófagos, células T ativadas (STITES e TERR, 1991), células endoteliais e células de Langerhans (ROITT *et al.*, 1993). Têm a função de apresentar, às células T, peptídeos derivados de proteínas sintetizadas exogenamente, as quais são internalizadas por endocitose. O complexo peptídeo + molécula HLA é reconhecido por linfócitos T auxiliares, os quais possuem o co-receptor CD4 na membrana. (Para maior detalhamento consultar STITES e TERR, 1991; BUC, 1993; MONACO, 1993; NEEFJES e MOMBURG, 1993; ABBAS *et al.*, 1997; ENGELHARD, 1994).

As funções dos genes HLA-DMA e HLA-DMB, os quais enquadram-se entre os genes não-clássicos, serão discutidas detalhadamente mais adiante.

1.2.3. REGIÃO DE CLASSE III.

Ocupa um segmento de aproximadamente 1100 kb, entre as regiões de classe I e II. Contém um grupamento de mais de 20 genes. Não há nenhuma semelhança estrutural ou funcional entre os produtos gênicos de classe III e as moléculas HLA de classe I e II (ROITT *et al.*, 1993).

Nesta região estão incluídos os genes que codificam os componentes C2, C4A, C4B da via clássica do sistema complemento, e o fator B da via alternativa. (STITES e TERR, 1991). Também estão incluídos entre outros, os genes HSP70, o gene que codifica o fator α de necrose tumoral (TNF α), e o gene para a enzima 21-hidroxilase (BUC, 1993).

1.3. POLIMORFISMO DO HLA.

Uma característica importante do sistema HLA é o seu polimorfismo, sendo o sistema genético mais polimórfico e polialélico descrito até o momento. A diversidade dos locos HLA clássicos é conhecida com relativo detalhamento, para muitas populações. Quanto aos locos não-clássicos, até o momento sabe-se que exibem um polimorfismo restrito, quando comparado com o dos locos clássicos. Desta forma, são necessárias pesquisas para melhorar o conhecimento sobre o polimorfismo destes genes, para melhor compreendê-lo e para verificar se os mecanismos de geração de alelos e de manutenção da diversidade são ou não os mesmos atuantes para os genes clássicos.

Há vários aspectos interessantes relativos ao polimorfismo dos genes HLA clássicos, como:

- heterozigosidade alta, atingindo até 90% para os locos HLA-A e -B em muitas populações (NEI e HUGHES, 1992);
- o número de nucleotídeos que diferem entre 2 alelos do mesmo loco, pode ser extremamente alto, podendo ultrapassar uma centena de substituições (KLEIN *et al.*, 1993);
- os nucleotídeos que correspondem aos aminoácidos formadores do sítio de ligação ao peptídeo, apresentam uma taxa de substituições não-sinônimas maior do que a de substituições sinônimas (NEI e HUGHES, 1992);
- a maioria dos alelos polimorfos pertence a linhagens evolutivas que datam de milhões de anos, sendo que para algumas as estimativas ultrapassam 10 milhões de anos (NEI e HUGHES, 1992).
- a variabilidade alélica não é distribuída ao acaso na sequência de nucleotídeos, mas concentra-se em algumas regiões, as quais são ladeadas por regiões conservadas.

O polimorfismo apresentado por vários dos genes HLA tem estimulado pesquisadores a examinar os possíveis mecanismos para sua geração e manutenção, bem como seu significado funcional.

Os principais mecanismos de geração de alelos são a mutação de ponto e a conversão gênica. A mutação de ponto seria mais importante na geração de alelos dos genes HLA-A, -C, -DQA1 e -DQB1, e a conversão gênica mais importante para os genes HLA-B e -DRB1 (BELICH *et al.*, 1992; SOTOMAIOR, 1994; PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; PARHAM e OHTA, 1996).

Com relação à manutenção do polimorfismo, esta depende não apenas da existência dos alelos mas também da modulação das suas frequências. Várias hipóteses foram propostas para explicar o alto grau de polimorfismo deste sistema genético:

- trans-específica;
- seleção sobredominante (ou vantagem do heterozigoto);
- seleção dependente de frequência.

De acordo com a hipótese trans-específica (KLEIN, 1987), o polimorfismo observado em espécies contemporâneas derivou da diversidade alélica de espécies ancestrais, tendo sido as linhagens alélicas transferidas para as espécies atuais e mantidas, por milhões de anos, por seleção e deriva, com pequenas diversificações ocorrendo após a especiação. Esta hipótese é sustentada pelo acúmulo de dados obtidos através de estudos do MHC de primatas e de roedores. De acordo com esta hipótese, diversos alelos já existiam nos primatas, antes do surgimento do *Homo sapiens*. Quando os hominídeos estabeleceram a linha que levou ao homem moderno, eles não possuíam um único alelo em cada loco HLA funcional, mas diversas formas ancestrais de todos os alelos existentes hoje. Esses alelos continuaram divergindo por mutações originando novos alelos. Similarmente, o grande número de alelos H-2 do

camundongo sugere que essa espécie também foi fundada por uma população, portando formas ancestrais dos alelos atuais (KLEIN, 1987; KLEIN *et al.*, 1990).

A hipótese de seleção sobredominante tem grande aceitação como um dos mecanismos principais para a manutenção do polimorfismo (FLAHERTY, 1988; HUGHES e NEI, 1989; TAKAHATA *et al.*, 1992; PARHAM, 1992). Nesse caso, a tendência à heterozigosidade seria explicada pela vantagem do indivíduo possuir duas variantes da molécula, de forma a apresentar, às células T maior diversidade de antígenos. Espera-se portanto que indivíduos heterozigotos, tendo duas moléculas MHC diferentes para cada loco, sejam em média mais resistentes a doenças infecciosas que os homozigotos, que possuem um só tipo de molécula. Deste modo, o polimorfismo seria uma maneira de assegurar que o repertório de respostas fosse suficientemente amplo para que a espécie como um todo sobrevivesse aos muitos patógenos (NEI e HUGHES, 1992).

Quanto à hipótese de seleção dependente de frequência, considera-se que o valor adaptativo seria influenciado pela frequência alélica dentro da população. No caso de genes do MHC, um indivíduo com um alelo raro teria vantagem sobre indivíduos com alelos comuns, na resposta imune contra patógenos que ainda não estariam adaptados para escapar da apresentação de seus peptídeos pelo produto de um novo alelo. À medida que a frequência desse alelo aumenta, ele perde a vantagem sobre os alelos mais comuns e antigos (PARHAM, 1994).

Segundo autores como NEI e HUGHES (1992), as hipóteses de seleção sobredominante e seleção dependente de frequência muitas vezes não podem ser distinguidas pois ambas são compatíveis com a importância da diversidade para a apresentação de antígenos e a taxa mais elevada de substituições não-sinônimas que sinônimas nas porções do gene correspondentes ao sítio de apresentação do antígeno. Possivelmente todos os

mecanismos propostos atuam em conjunto, contribuindo assim para a manutenção do polimorfismo dos genes HLA clássicos.

1.4. GENES HLA DE CLASSE I NÃO-CLÁSSICOS.

São considerados não-clássicos, ou genes Ib, os genes HLA-E, -F, e -G. São de diversidade restrita e codificam uma cadeia pesada (cadeia- α) semelhante àquela dos genes clássicos, à qual associa-se a β_2 -microglobulina. Uma característica comum é o segmento citoplasmático mais curto do que o dos genes clássicos (STROYNOWSKI e LINDAHL, 1994). Outro aspecto importante que diferencia genes de classe I não-clássicos e clássicos é a limitada distribuição tecidual dos primeiros.

Embora suas funções não estejam claras sabe-se, por exemplo, que proteínas de classe Ib murinas são capazes de apresentar peptídeos às células T, particularmente ao grupo de células T $\gamma\delta$. Antígenos de classe Ib podem ter uma função especializada na apresentação de um grupo restrito de peptídeos (STROYNOWSKI e LINDAHL, 1994; HOULIHAM *et al.*, 1995) e de antígenos não-protéicos. Entretanto, somente o heterodímero HLA-G/ β_2 -microglobulina já foi detectado na superfície da célula. A molécula HLA-G tem uma estrutura tridimensional muito semelhante à de HLA-A, -B, -C; poderia assim ligar e apresentar antígenos de maneira similar às moléculas clássicas.

A relação evolutiva de genes clássicos e não-clássicos não está clara. Tentando elucidar essa questão, WATKINS *et al.* (1990) seqüenciaram genes do MHC de classe I de um primata

do Novo Mundo, *Saguinus oedipus* (sagüi), e mostraram que os genes de classe I dessa espécie estão mais relacionados com o não-clássico HLA-G, do que com os clássicos HLA-A, -B, -C (STROYNOWSKI e LINDAHL, 1994; KIRSZENBAUM *et al.*, 1997).

Em camundongos, os genes não-clássicos nomeados Qa e TL estão localizados na região Tla do complexo H-2. Em contraste com os genes clássicos K e D, Qa e Tla mostram um polimorfismo limitado. Genes não-clássicos também foram descritos em outros mamíferos, como o coelho e porquinhos da índia.

1.4.1. HLA-E

O gene HLA-E está localizado entre os locos HLA-A e HLA-C, sendo a distância entre HLA-C e HLA-E de cerca de 700 kb e entre HLA-A e HLA-E de aproximadamente 500 kb (BOUCRAUT *et al.*, 1993). Inicialmente foi denominado de HLA-6.2 (KOLLER *et al.*, 1988) devido ao fragmento de 6.2 kb produzido pela enzima de restrição HindIII. Esse fragmento foi sequenciado e alinhado com outras seqüências de genes de classe I, indicando grande similaridade de introns e exons. Em 1987 foi oficialmente denominado HLA-E pelo Comitê de Nomenclatura.

Esse gene possui várias características em comum com genes HLA classe I clássicos: a organização intron/exon é a mesma; a cadeia α associa-se não covalentemente com a β 2-microglobulina, ambos os pares de cisteína encontrados nos domínios α 2 e α 3 estão presentes nas mesmas posições.

Há entretanto vários aspectos que distinguem o HLA-E dos genes clássicos de classe I. Os promotores diferem em HLA-E: TATA box tem uma alteração A→C no segundo

nucleotídeo, modificando a sequência TATAAA para TCTAAA; sequências repetidas *Alu* estão presentes na porção 3', fornecendo um novo sítio para poliadenilação; deleção no exon 7 originando um segmento citoplasmático mais curto; baixo grau de polimorfismo (BOUCRAUT *et al.*, 1993); divergência no domínio $\alpha 2$ (codificado pelo exon 3), cuja sequência de aminoácidos tem somente 63% a 65% de similaridade com a região correspondente em HLA-A, -B, -C (KOLLER *et al.*, 1988).

HLA-E expressa-se em uma variedade de tecidos, com um alto nível de RNAm ocorrendo em linfócitos T estimulados (GERAGHTY *et al.*, 1992a). Podem ser encontrados transcritos na placenta e fígado fetal (HOULIHAN *et al.*, 1995; BOUCRAUT *et al.*, 1993) e em eosinófilos (GERAGHTY, 1993). Seu nível de expressão pode ser aumentado após estimulação com interferon gama (OHYA *et al.*, 1990; GUSTAFSON e GINDER, 1996).

Visto que HLA-E forma uma molécula semelhante às moléculas clássicas, e também pelo fato da seleção ter preservado alelos HLA-E, tem-se especulado quanto à função do produto desse gene (GERAGHTY *et al.*, 1992b). Como HLA-E foi detectado em células do âmnion, sugere-se que possa ter um papel durante a gestação. Esta observação é importante, pois em murinos produtos de classe Ib estão implicados na apresentação de um grupo restrito de peptídeos (LE BOUTELLER, 1997). A localização do produto de HLA-E pode indicar que esta molécula tem um papel em eventos que ocorrem no retículo endoplasmático, e poderia ligar peptídeos com a ajuda dos complexos TAP (BRAUD *et al.*, 1997).

Homólogos ao HLA-E foram descritos em *Pongo pygmaeus* (orangotango), *Macaca mulatta* (macaco Rhesus) e *M. fascicularis* (macaco caranguejeiro ou macaco de Java) (ALVAREZ *et al.*, 1997). A comparação das sequências de nucleotídeos desses diferentes primatas e do homem podem fornecer dados sobre a evolução do gene MHC-E. Foram encontrados 13 alelos MHC-E nos primatas, os quais possuem sequências dos exons 2 e 3

semelhantes às das moléculas clássicas, com conformação típica de molécula apresentadora de antígeno. Deste modo, um gene homólogo ao HLA-E, em todas as espécies testadas, do homem até o macaco, pode codificar uma proteína de classe I com a estrutura e conformação necessárias para apresentação de antígenos. Comparando-se a taxa de substituições sinônimas com as não-sinônimas do suposto sítio de ligação ao peptídeo, observa-se uma fração maior de substituições sinônimas do que não-sinônimas. Esses resultados contrastam com os encontrados nas moléculas clássicas, A, B e C, onde as substituições não-sinônimas são comuns no sítio de ligação ao peptídeo (ALVAREZ *et al.*, 1997).

A provável existência de pressão seletiva sobre moléculas MHC-E mantendo a invariabilidade no sítio de ligação ao peptídeo, nos últimos 36 milhões de anos (tempo de divergência entre os ancestrais de *Macaca* e *Pongidae*) sugere que a molécula MHC-E poderia funcionar como uma apresentadora de um grupo restrito de peptídeos (BOYSON *et al.*, 1995; ALVAREZ *et al.*, 1997).

STOCKSCHLEADER *et al.* (1992) e GERAGHTY *et al.* (1992a) sugerem que HLA-E é um gene muito antigo; analisaram indivíduos de diversos grupos étnicos e encontraram dois alelos, ER107 e EG107, cujas frequências são muito semelhantes. Ao contrário do que é verificado para a maioria dos genes HLA, ambos os alelos de HLA-E ocorrem em combinações com praticamente todos os alelos HLA-A e -B. Apenas o haplótipo A1-B8 ocorreu em combinação com apenas um alelo HLA-E, o que, segundo os autores reforça a idéia deste ser um haplótipo ancestral conservado por seleção, e do alelo ER107 ser o mais antigo. A possível explicação para essa associação aleatória é que os alelos HLA-E já existiam na população antes da geração do polimorfismo de HLA-A e -B. Ambos alelos HLA-E provavelmente já estavam presentes quando um ou poucos alelos HLA-A e -B existiam. Enquanto uma forte seleção diversificadora foi atuando sobre os locos A e B, originando um

alto grau de polimorfismo, a diversidade do loco HLA-E permaneceu praticamente inalterada.

1.4.1.1. Polialelismo e Polimorfismo de HLA-E.

HLA-E possui 4938 pb (KOLLER *et al.*, 1988) e é formado por 8 exons e 7 introns. A deleção de 5 nucleotídeos no exon 7 provoca um códon de término, tornando a cadeia α menor quando comparada com as cadeias de HLA-A e -B. Seu polimorfismo é muito restrito se comparado ao dos genes HLA clássicos. Diversos métodos têm sido usados para caracterização desse polimorfismo: sequenciamento, RFLP e PCR-SSO. Com o resultado dessas investigações podemos dizer que os exons 2 e 3, que codificam os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, são os mais divergentes.

Até o presente foram descritos 5 alelos: HLA-E*0101, *0102, *01031, *01032 e *0104. Foram definidas 3 posições variáveis no exon 2: no códon 2 (C ou T), no códon 77 (C ou T) e no códon 83 (G ou C), sendo que a única substituição não-sinônima ocorre no último códon citado, resultando o aminoácido glicina ou arginina. No exon 3, foram encontrados 2 pontos de variabilidade: códon 107 (A ou G) e códon 157 (A ou G), sendo que ambas resultam na substituição de arginina por glicina.

O último alelo descrito, E*01031 (GOMEZ-CASADO *et al.*, 1997) possui no códon 77 a alteração AAT→AAC em comparação com E*01032. Este novo alelo provavelmente formou-se por mutação de ponto do códon 77 do alelo *01032 ou por combinação das sequências do exon 2 de E*0101 e exon 3 de E*01032.

Até o presente, poucas populações foram estudadas com relação ao polimorfismo deste gene. AIRNAIZ-VILLENA *et al.* (1997a) analisaram amostras de caucasóides (espanhóis,

italianos, húngaros, dinamarqueses e franceses), orientais, negróides e indianos. Em todas essas populações o alelo E*0101 foi o mais comum, seguido por *0103, *0104 em caucasóides, indianos e negróides. Em orientais, *0104 é o segundo mais freqüente, seguido por *0103 e *0102. Em indianos e negróides, E*0102 não foi encontrado.

GOMEZ-CASADO *et al.* (1997) analisaram uma amostra da população espanhola e encontraram o alelo E*0101 com maior freqüência, seguido por *01032, *01031 e *0102. O alelo *0104 não foi encontrado.

Podemos então dizer que HLA-E mostra assim polimorfismo limitado nos exons 2 e 3 (GERAGHTY *et al.*, 1992a; OHYA *et al.*, 1990; GOMEZ-CASADO *et al.*, 1997) e que nos exons 1 e 4 até 8 não foi encontrada variabilidade (STOCKSCHLEADER *et al.*, 1992).

1.4.2. HLA-G

O gene HLA-G está localizado entre HLA-A e HLA-F, sendo a distância entre HLA-A e -G de cerca 220 kb (SCHMIDT *et al.*, 1991). Primeiramente foi chamado de HLA-6.0 (KOLLER *et al.*, 1988).

Previamente, acreditava-se que a expressão de HLA-G fosse limitada aos citotrofoblastos e sugeriu-se um papel exclusivo no desenvolvimento embrionário e/ou interações imunes materno-fetais (KOVATS *et al.*, 1990; WEI e ORR, 1990; MORALES, 1993; CAROSELLA *et al.*, 1996). Entretanto, HLA-G também expressa-se no feto, em tecidos de órgãos fetais como olho, fígado, pulmão, timo, coração e rim, e células sanguíneas do cordão umbilical (ULBRECHT *et al.*, 1994; BOYSON *et al.*, 1995; ALIZADEH *et al.*, 1993; HUMPHREY *et al.*, 1995; SHUKLA *et al.*, 1990; TAMAKI *et al.*, 1993). Em tecidos

adultos, RNAm de HLA-G foram encontrados em alta concentração na porção anterior do olho, pele, pulmão, células mononucleares de sangue periférico (subpopulações de células T e B) (ISHITANI e GERAGHTY, 1992; KIRSZENBAUM *et al.*, 1994; ULBRECHT *et al.*, 1994; HUMPHREY *et al.*, 1995); em baixas concentrações foram encontrados em espermatozoides, ovário, rim, e intestino (CAROSELLA *et al.*, 1996).

A estrutura e a sequência de HLA-G são altamente homólogas às dos genes clássicos, com 8 exons, 7 introns e uma região 3' não-traduzida. A homologia entre a sequência protéica de HLA-G e a dos produtos dos genes HLA clássicos de classe I é de 86%. Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de HLA-G apresentam respectivamente, 81% e 85% de homologia com os dos genes clássicos. O domínio $\alpha 3$ contém um sítio de ligação para CD8 e outro para ligação com a β_2 -m, apresentando 91% de homologia com o mesmo domínio das moléculas de classe I clássicas (LE BOUTELLER e LENFANT, 1996).

A região 5' contém a mesma variante de TATA box, TCTAAA, encontrada também em HLA-E (GERAGHTY *et al.*, 1987). Possui um códon de término no exon 6, portanto, o gene HLA-G codifica uma proteína com um segmento citoplasmático menor do que os clássicos (KIRSZENBAUM *et al.*, 1994; TAMAKI *et al.*, 1993; CAROSSELLA *et al.*, 1996; LE BOUTELLER, 1997).

O transcrito primário do gene HLA-G sofre processamentos alternativos no trofoblasto e nos tecidos fetais e adultos, sendo observadas diferentes formas de RNAm: HLA-G1, na qual falta o exon 7; HLA-G2, sem os exons 3 e 7; HLA-G3, sem os exons 3, 4 e 7; HLA-G4, que não possui os exons 4 e 7; HLA-G5s, que possui o intron 4. A presença de um códon de término no intron 4 deleta o domínio transmembrana (codificado pelo exon 5), resultando a tradução do RNAm G5s em um antígeno solúvel. Assim, a presença de diferentes RNAm sugere a possível expressão de 5 isoformas de moléculas HLA-G. Foram detectadas 4

isoformas em linfócitos de sangue periférico: G1, G2, G3 e G4. Em sangue de cordão umbilical foram encontradas as mesmas isoformas, com exceção de G4. A presença dessas isoformas, tanto em tecidos adultos quanto em tecidos fetais, sustenta a possibilidade de que o gene HLA-G é sempre expresso sob a forma de proteínas que sofreram processamentos alternativos de seus transcritos primários (KIRSZENBAUM *et al.*, 1995).

A função de HLA-G não está totalmente esclarecida. Existem várias hipóteses que levam em conta a expressão de HLA-G nas células da placenta. Uma dessas hipóteses propõe que HLA-G possa atuar como molécula reguladora, protegendo o trofoblasto da lise por grandes linfócitos granulares (LGL), de uma maneira análoga ao postulado para as moléculas de classe I clássicas que atuam na inibição de células NK (CHUMBLEY, 1994). Foi demonstrado que HLA-G é capaz de inibir a atividade NK de grandes linfócitos granulares contra o trofoblasto no primeiro trimestre de gestação. Visto que o polimorfismo de HLA-G é baixo, é possível que HLA-G atue como um ligante público para o receptor da célula NK, e assim proteja o trofoblasto fetal da ação de NK, conferindo tolerância imunológica ao tecido fetal (KIRSZENBAUM *et al.*, 1995; CAROSELLA *et al.*, 1996; VERMA *et al.*, 1997; LE BOUTELLER, 1997).

Durante a gestação, a sobrevivência do feto alogênico e evasão de reconhecimento imune materno é dependente da habilidade do trofoblasto formar uma barreira imunológica na interface materno-fetal. É relevante, entretanto, que no trofoblasto não haja expressão de moléculas MHC de classe I clássicas. Apesar da ausência de MHC de classe I, no citotrofoblasto, uma subpopulação de células do trofoblasto, que está em contato direto com células maternas, expressa apenas HLA-G, acompanhada por expressão de TAP (GOBIN *et al.*, 1997).

As moléculas HLA-G tem uma fenda de ligação para peptídeo e um domínio de ligação

para CD8 que são homólogos aos das moléculas clássicas. Com base na similaridade estrutural com moléculas clássicas, tem sido proposto que moléculas HLA-G poderiam apresentar peptídeos às células T (DIEHL *et al.*, 1996). Estudos recentes com células linfóides transfectadas com HLA-G têm mostrado que HLA-G interage fisicamente com o complexo TAP e leva peptídeo na sua fenda. Estas características indicam que trofoblasto expressando moléculas não-clássicas é potencialmente capaz de apresentar peptídeos antigênicos (GOBIN *et al.*, 1997).

Análogos de HLA-G foram descritos em *Saguinus oedipus* (sagüi), *Pan troglodytes* (chimpanzé), *Pongo pymaeus* (orangotango), *Gorilla gorilla* (gorila), *Macaca mulatta* (macaco rhesus) e *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano).

1.4.2.1. Polialelismo e Polimorfismo de HLA-G.

O gene HLA-G é formado por 4396 pb (GERAGHTY *et al.*, 1987). Embora possuindo 8 exons e 7 introns, semelhante aos genes clássicos de classe I, possui um códon de término no exon 6, produzindo um segmento citoplasmático mais curto (KIRSZENBAUM *et al.*, 1997). Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (os quais formam a fenda de ligação ao peptídeo) codificados pelos exons 2 e 3, possuem 270 pb e 276 pb, respectivamente (CAROSELLA *et al.*, 1996).

Até o presente, foram descritos 7 alelos HLA-G: *01011, *01012, *01013, *0102, *0103, *0104, e *0105N (BODMER *et al.*, 1997). Os seis primeiros foram definidos por duas posições variáveis no exon 2 e duas no exon 3. No exon 2, códon 31 (A ou T), produziu a substituição do aminoácido treonina por serina; códon 57 (G ou A), é uma alteração sinônima. No exon 3, códon 107 (A ou T), sendo uma alteração sinônima e códon 110 (C ou A),

substituindo o aminoácido leucina por isoleucina.

O alelo *0102 apresenta uma alteração no códon 54 (G ou A), ocorrendo a substituição de glutamina por arginina. A sequência desse alelo foi obtida através do GENBANK, sob o número de acesso S69897. Uma publicação recente sugere que a sequência G*0102 não existe, e que seria um erro de seqüenciamento de um alelo G*01011 (ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 1997b).

Em 1997 foi descrito o alelo *0105N, o qual possui uma deleção no códon 130, no exon 3. Este alelo é o primeiro descrito em HLA-G, com uma deleção que altera o quadro de leitura e provavelmente causa um códon de término no início do exon 4 (SUÁREZ *et al.*, 1997).

Em um estudo realizado com 45 mulheres saudáveis afro-americanas, VAN DER VEN e OBER (1994) apresentaram evidências de um polimorfismo mais acentuado deste gene. Descreveram 2 substituições não-sinônimas de aminoácidos no exon 2 (correspondentes aos códons 16 e 31) e 24 no exon 3 (códon 92, 98, 101, 103, 107, 110, 120, 126, 127, 132, 138, 164, 167, 176, 178), sendo que nos códons 92, 101, 107, 120, e 178 ocorre mais de uma substituição. Também foram encontrados pontos de variabilidade no exon 2 (códon 57), e exon 3 (códon 93, 94, 108, 116, 127, 158, 170, 179), os quais são substituições sinônimas. O alelo G*0104, o qual codifica isoleucina no códon 110, ao invés de leucina, como nos demais alelos, foi detectado nessa amostra com uma frequência de 39%. A alta frequência nessa amostra reflete diferenças entre as populações humanas, visto que este alelo foi detectado em baixas frequências em outros estudos. Este trabalho indica que HLA-G apresenta um polimorfismo maior do que se imaginava, e que podem haver muitos fatores para pesquisadores considerarem este gene pouco polimórfico, como o tamanho das amostras analisadas, métodos menos sensíveis para detectar uma única alteração de nucleotídeo, e

também diferenças existentes entre os vários grupos étnicos (VAN DER VEN e OBER, 1994).

O exon 3 constitui parte da fenda de ligação com o peptídeo e parece ser o mais polimórfico exon de HLA-G, em comparação com os clássicos para os quais os exons 2 e 3 apresentam variabilidade (LE BOUTEILLER e LENFANT, 1996).

Algumas populações foram analisadas quanto ao polimorfismo de HLA-G; ARNAIZ-VILLENA *et al.* (1997b) estudaram, no 12º Workshop Internacional de Histocompatibilidade, 4 diferentes grupos étnicos: caucasóides, orientais, negróides e indianos. Observaram que *01011 e *01012 são mais freqüentes em caucasóides e negróides. Em orientais e indianos, *01012 é o mais freqüente. O alelo *0103 foi encontrado somente em caucasóides, apresentando baixa freqüência (cerca de 1%).

MORALES *et al.* (1993) e SUÁREZ *et al.* (1997) observaram na população espanhola, e KARHUKORPI *et al.* (1996) observaram na população finlandesa, os alelos G*01011, *01012, *01013. O alelo *0103 não foi observado nos três estudos.

Além da investigação do polimorfismo, estão sendo realizados estudos de desequilíbrio de ligação com genes HLA clássicos, como por exemplo, HLA-A. Foram encontradas associações entre HLA-G*01011 com HLA-A2, A3, A29, A31; G*01012 com A1, A24, A25, A26, A28 e G*01013 com A11 em populações caucasóides (ALIZADEH *et al.*, 1993; MORALES *et al.*, 1993; ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 1997b). A forte associação entre alelos desses dois locos indica que não há pontos quentes de recombinação entre HLA-A e HLA-G.

Pode-se portanto dizer que o loco HLA-G é polimórfico, mas essa variabilidade é mais limitada que a dos genes clássicos, e as variações de nucleotídeos conhecidas, na sua maioria, são substituições silenciosas.

1.5. GENES HLA DE CLASSE II NÃO-CLÁSSICOS.

Neste grupo estão incluídos os genes HLA-DMA, -DMB, -DOA e -DOB. Os genes HLA-DR, -DQ e -DP são considerados clássicos. Os genes DMA e DMB foram os primeiros identificados como genes MHC não-clássicos, na região de classe II (KELLY *et al.*, 1991)

1.5.1. HLA-DM

Os genes HLA-DMA e -DMB localizam-se respectivamente a 50 kb de HLA-DOA e 80 kb de HLA-DOB; sendo inicialmente designados RING6 e RING7 (KELLY *et al.*, 1991). Estão separados por 7,5 kb; HLA-DMA codifica um polipeptídeo de 261 aminoácidos e HLA-DMB, um polipeptídeo de 263 aminoácidos, cujos domínios apresentam configurações similares aos de outras moléculas MHC de classe II (RADLEY *et al.*, 1994).

As moléculas HLA-DM apresentam algumas diferenças com relação às outras moléculas de classe II, como no sítio de ligação ao peptídeo: DMA possui 2 resíduos de cisteína e DMB possui 5 no domínio $\beta 1$, ao passo que as clássicas apresentam somente 2 resíduos no domínio $\beta 1$ (SANDERSON e TROWSDALE, 1995). Supõe-se que a presença da cisteína possibilita a formação de ligações dissulfeto, tornando a estrutura mais rígida e restringindo a capacidade de ligação de peptídeos (KELLY *et al.*, 1991).

A molécula HLA-DM não se expressa na superfície da célula. Sua expressão é restrita a células apresentadoras de antígenos, mas pode ser induzida em fibroblastos e células HeLa por interferon- γ (WESTERHEIDE *et al.*, 1997).

Ambos os genes apresentam as sequências X, Y, J e boxes CCAAT na região

reguladora a 5', consistente com típicos promotores de classe II (KELLY *et al.*, 1991; WESTERHEIDE *et al.*, 1997). O conhecimento sobre os mecanismos de regulação dos genes de classe II, e de HLA-DM e de alguns de seus fatores de regulação aumentou com os estudos de uma doença rara, a Síndrome do Linfócito Despido (*BLS: Bare Lymphocyte Syndrome*), uma doença autossômica recessiva caracterizada por imunodeficiência grave, causada pela ausência de expressão de genes MHC de classe II, inclusive DM (KERN *et al.*, 1995).

A expressão coordenada de DMA e DMB e dos outros genes de classe II é regulada por dois fatores, CIITA e RFX5; mutações em um desses fatores suprimem a expressão de DM: RFX5 é um fator de transcrição que se liga ao box X, enquanto CIITA é necessário para a transcrição, embora não se ligue ao promotor. Quando linhagens celulares de pacientes com BLS foram transfectadas com DNAc de CIITA e RFX5, a expressão de DM e dos outros genes de classe II era restaurada (KERN *et al.*, 1995).

A maioria dos genes de classe I e II é altamente polimórfica, sendo que as variações ocorrem principalmente na fenda de ligação ao peptídeo. Os genes HLA-DM são menos polimórficos que os genes clássicos. Observou-se que as diferenças entre alelos ocorriam nos exons 3 de ambos os genes, HLA-DMA e HLA-DMB, os quais codificam respectivamente os domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$. As diferenças com relação aos genes clássicos levaram os autores a sugerir que HLA-DM seria uma molécula com um novo papel na resposta imune (CARRINGTON *et al.*, 1993).

As moléculas MHC de classe II clássicas apresentam peptídeos antigênicos a linfócitos T CD4⁺. As cadeias α e β são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE). Após a biossíntese, agrupam-se em nonâmeros com uma cadeia chamada cadeia invariável (Ii). A cadeia invariável é uma glicoproteína de membrana do tipo II, que é geneticamente monomórfica, embora uma considerável variação seja produzida por processamento alternativo

do pré-RNA_m. Essas variações resultam na formação de 4 tipos de cadeia invariável, referidas como p31, p33, p41 e p43 (a nomenclatura reflete o peso molecular) (HARDING, 1996).

A função da cadeia invariável parece ser a de impedir a ligação de peptídeos endógenos (DENZIN e CRESSWELL, 1995; ROCHE, 1995) às moléculas de classe II clássicas, servindo como "chaperone", mantendo a conformação e dirigindo as moléculas de classe II pelos compartimentos endocíticos até a superfície celular (MONACO, 1995; SANDERSON e TROWSDALE, 1995; BUSCH e MELLINS, 1996).

Os nonâmeros $(\alpha\beta)_3I_i$ são transportados do RE através do complexo de Golgi e levam várias horas para alcançar os compartimentos endocíticos. Nesses, a I_i é degradada por proteases como a catepsina B e D. Análises *in vitro* da proteólise dos complexos classe II- I_i mostram um fragmento da cadeia I_i , denominado CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*), possuindo os resíduos 81-104 de I_i , que permanece ligado à fenda, de maneira similar aos peptídeos antigênicos, evitando assim a ligação dos mesmos (BUSCH e MELLINS, 1996; HITZEL e KOCH, 1996; PIETERS, 1997).

O papel de HLA-DM tornou-se mais claro quando se observou que linhagens celulares mutantes eram incapazes de apresentar antígenos, havendo um acúmulo de moléculas de classe II-CLIP. Foi visto que essas linhagens apresentaram deleções na região de classe II, entre DP e DQ. Os complexos classe II-CLIP, *in vitro*, podem ser eficientemente carregados com peptídeos antigênicos quando expostos a pH baixo, o qual induz a dissociação de CLIP. A introdução de DM nessas células ocasiona, de maneira similar, a dissociação de CLIP e conseqüentemente a ligação e apresentação dos peptídeos antigênicos (MONJI, *et al.*, 1994; MORRIS *et al.*, 1994; DENZIN e CRESSWELL, 1995; SHAMAN, *et al.*, 1995; ROCHE, 1995; WESTERHEIDE *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 1998; VOGT *et al.*, 1997). Esses estudos levaram os autores a sugerirem que HLA-DM execute uma função acessória na

apresentação de antígenos.

Várias hipóteses surgiram para explicar o mecanismo de atuação das moléculas HLA-DM (figura 4). Um modelo considera que DM atua diretamente nos complexos CLIP-classe II, ligando-se ao complexo e removendo CLIP da molécula, deixando-a livre para ligar peptídeos antigênicos (DENZIN e CRESSWELL, 1995; SANDERSON e TROWSDALE, 1995). Não se sabe se DM alteraria a conformação das moléculas de classe II (MONJI, 1994; ROCHE, 1995; SHERMAN *et al.*, 1995), ou se DM retiraria CLIP, ligando-o na sua fenda. Até o presente, não há evidências que DM ligue peptídeos, pois em condições em que seria capaz de remover CLIP dos complexos, nenhum DM com CLIP foi detectado (SANDERSON e TROWSDALE, 1995; BUSCH e MELLINS, 1996). Outra forma de atuação seria que moléculas DM teriam atividade de peptidases, clivando a Ii. Sugeriu-se ainda que DM atuaria como um catalisador: em um pH baixo (4,5 a 5,5) promoveria o aumento da taxa de dissociação de CLIP dos complexos classe II-CLIP, facilitando a ligação de peptídeos (MONJI, *et al.*, 1994; SANDERSON e TROWSDALE, 1995; GRUNEGERG *et al.*, 1997; KROPSHOFER *et al.*, 1997a). Alternativamente, HLA-DM poderia funcionar como um transportador de moléculas de classe II para compartimentos onde peptídeos seriam ligados. Neste modelo, na ausência de HLA-DM, complexos classe II-Ii não teriam acesso aos peptídeos antigênicos. (SANDERSON e TROWSDALE, 1995; GREEN *et al.*, 1995). Por outro lado, foi proposto que DM é uma estrutura para ligação do peptídeo, atuando no transporte de peptídeos gerados no compartimento endossomal para um compartimento onde estariam as moléculas de classe II clássicas (SANDERSON *et al.*, 1994b). HLA-DM poderia também atuar como um "editor" de peptídeos antigênicos, escolhendo os que melhor se encaixassem na fenda e estabilizassem a estrutura (KROPSHOFER *et al.*, 1997b, GRUNEBERG *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 1998; VOGT, *et al.*, 1997).

Vemos que várias hipóteses são apresentadas para tentar elucidar a forma de atuação da molécula HLA-DM, e até o momento não podemos excluir nenhuma delas.

Os antígenos apresentados pelas moléculas MHC de classe II são internalizados na via endocítica, a qual consiste de uma variedade de compartimentos. Ainda não está claro em qual compartimento ocorre a ligação dos peptídeos às moléculas MHC. Estudos recentes mostram que esta poderia ocorrer em múltiplos compartimentos, dependendo do tipo de célula ou de antígeno (PIETERS, 1997). O isolamento de compartimentos MHC de classe II de vários tipos celulares mostrou a existência de compartimentos especializados, chamados MIIC (compartimentos MHC de classe II) e CIIV (vesículas de classe II), implicados na ligação do peptídeo. Há sugestões de que a dissociação de CLIP ocorre no MIIC, onde também existem os peptídeos exógenos (ROBBINS *et al.*, 1996). Além disso, devido às diferenças morfológicas aparentes, os MIIC isolados de vários tipos celulares, podem não representar o mesmo compartimento, (PIERRE, *et al.*, 1996; FERNANDEZ-BORJA *et al.*, 1996) ou podem representar vários estágios de desenvolvimento do MIIC (ROBBINS, *et al.*, 1996).

O mecanismo molecular de troca de CLIP por peptídeos não está claro, o substrato preciso de DM não é conhecido e também não se conhece o mecanismo pelo qual DM diferencia os complexos classe II-CLIP dos de classe II-peptídeo antigênico. Um potencial regulador de ligação de peptídeos dependente de HLA-DM é outra molécula de classe II, HLA-DO. Esta associa-se fortemente com DM e colocaliza-se em compartimentos tendo características de MIIC, sendo candidata para a participação na ligação de peptídeos HLA-DM-dependentes (PIETERS, 1997; DENZIN *et al.*, 1997). Uma vez ligada com peptídeos antigênicos, moléculas de classe II são transportadas para a superfície celular.

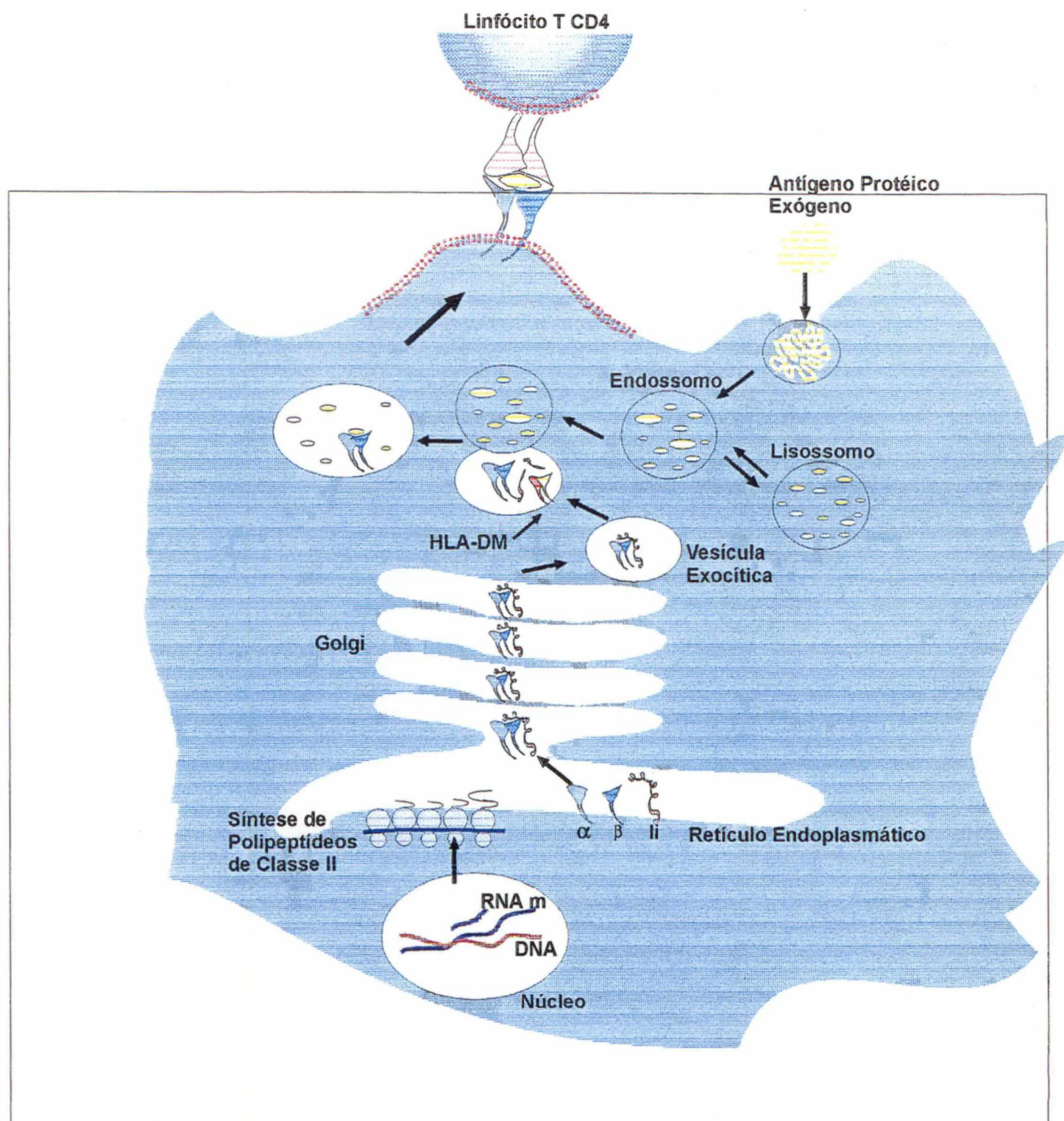


Figura 4. Via de apresentação de antígenos pelas moléculas de classe II, mostrando a molécula HLA-DM no compartimento endocítico (Modificado de PIETERS, 1997)

1.5.1.1. Polialelismo e Polimorfismo de HLA-DMA e HLA-DMB

O gene HLA-DMA tem 5 kb de comprimento e é formado por 5 exons. Quatro alelos foram descritos: HLA-DMA*0101, *0102, *0103 e *0104. Os alelos DMA foram definidos por 3 posições variáveis no exon 3: códon 140 (G ou A), códon 155 (G ou C) e códon 184 (G, A ou T). As substituições resultam em alterações não-sinônimas de aminoácidos. É possível que *0102 e *0103 tenham derivado diretamente de *0101 por mutações de ponto únicas ou duplas; e que *0104 tenha derivado do alelo *0102, por uma única mutação de ponto (CARRINGTON E HARDING, 1994).

As análises da variabilidade do loco HLA-DMA em caucasóides, realizadas por CARRINGTON e HARDING (1994), DJILALI-SAIAH *et al.* (1996a), DJILALI-SAIAH *et al.* (1996b), TEISSERENC *et al.*, (1997) e BRUENNLER e ALBERT (1997), mostraram que os alelos *0101 e *0102 são os mais freqüentes, seguidos por *0103 e *0104.

Estudos realizados em populações orientais por ISHIHARA *et al.*, (1996) e KUWATA *et al.*, (1996) mostraram a presença de apenas 2 alelos: *0101 e *0102.

HLA-DMB tem 6,5 kb e 6 exons (RADLEY *et al.*, 1994). Possui 5 alelos descritos oficialmente: HLA-DMB*0101, *0102, *0103, *0104 e *0105, os quais foram definidos por 2 posições variáveis no exon 3: códon 144 (C, A ou T) e códon 179 (T ou C).

O exon 2 de HLA-DMB não mostrou variabilidade entre 60 indivíduos de vários grupos étnicos, com uma exceção: uma alteração no códon 31 (A ou T), resultando na substituição de ácido aspártico por valina. Essa variante foi denominada V7 (CARRINGTON, 1993). DJILALI-SAIAH *et al.* (1996a) também identificaram essa variante em uma amostra de 162 caucasóides, com freqüência alélica de 4%, denominando-a DMB*NEW.

Supõe-se que os alelos DMB*0103 e DMB*0102 tenham derivado de DMB*0101, por

mutações de ponto e DMB*0104 derivado de DMB*0103, por uma única mutação de ponto (CARRINGTON *et al.*, 1993).

O variabilidade do loco HLA-DMB foi investigada em várias populações caucasóides por CARRINGTON *et al.* (1993), DJILALI-SAIAH *et al.* (1996a), DJILALI-SAIAH *et al.* (1996b), TEISSERENC *et al.* (1997) e BRUENNLER e ALBERT (1997), mostrando sempre que os alelos *0101 e *0103 são os mais comuns.

Análises de HLA-DMB em orientais realizadas por NARUSE *et al.* (1996) e KUWATA *et al.* (1996) revelaram que o alelo *0101 é o mais freqüente, seguido por *0102. ISHIHARA *et al.* (1996) e KIM *et al.* (1996) observaram os alelos *0101, *0103 e *0102 em ordem decrescente de freqüência.

Em um estudo de associação com doenças autoimunes em pacientes coreanos foram encontradas 3 variantes: DMB01kv1, que codifica o aminoácido valina no códon 144, sendo similar a *0104 nessa posição e o aminoácido isoleucina no códon 179, sendo aqui similar a *0101 e *0102. Portanto, essa variante pode ter surgido por recombinação entre *0101 e *0104, ou entre *0102 e *0104. As duas outras variantes, DMB01kv2 e DMB01kv3, compartilham com DMB*0103 o códon 144 (que codifica alanina) e 179 (treonina). Entretanto, kv2 possui uma transição T→C no códon 138, originando alanina no lugar de asparagina, e kv3 mostra uma substituição A→T no códon 139, originando leucina no lugar de metionina, quando comparados com *0103. DMBKv2 e Kv3 podem ter se originado de *0103 cada qual por uma única mutação de ponto. Essas variantes não foram encontrados na amostra controle daquele estudo (KIM *et al.*, 1996).

O grau baixo de polimorfismo, particularmente do segundo exon desses dois genes, os distingue de DRB1, DQB1 e DPB1, indicando que DM seria uma molécula com um novo papel na resposta imune. A idéia de conservação de um papel funcional para DM é sustentado

por um alto nível de similaridade (73%) na sequência de aminoácidos das moléculas DM humanas e murinas.

Haplótipos conservados têm sido documentados em populações caucasóides, abrangendo o segmento compreendido entre HLA-A e DR/DQ, e em alguns casos até DP. Novos marcadores, incluindo TAP, LMP e HLA-DM, tem ajudado a definir melhor os haplótipos estendidos. Várias doenças autoimunes tem sido associadas com certos alelos HLA de classe II, mas devido ao forte desequilíbrio de ligação, é difícil identificar qual alelo (ou combinação de alelos) é responsável pela predisposição ou proteção à doença.

Devido à sua localização dentro da região de classe II e seu envolvimento com a apresentação de antígenos, LMP, TAP e HLA-DM podem ser considerados candidatos a genes de susceptibilidade a doenças, possivelmente atuando sinergisticamente com os genes clássicos (DJILALI-SAIAH *et al.*, 1996b).

1.6. O POLIMORFISMO DE GENES DO MHC EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS.

Muitos genes HLA possuem um elevado grau de polimorfismo, o qual é variável quando comparamos diferentes populações ou grupos étnicos. As informações obtidas em estudos comparativos contribuem para aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de geração e manutenção desse polimorfismo. Além disso, estudos de populações ameríndias podem fornecer informações pertinentes ao povoamento das Américas.

A maioria dos trabalhos revela um polimorfismo limitado em populações ameríndias

quando comparadas com caucasóides, negróides e orientais. Essa redução está de acordo com a hipótese de que pequenos grupos da Ásia migraram para o continente americano, através do Estreito de Bering, cerca de 10 mil a 40 mil anos atrás e sofreram o efeito “gargalo de garrafa” (TITUS-TRACHTENBERG *et al.*, 1994; CADAVID e WATKINS, 1997).

BRAUN (1996) fez um trabalho extensivo de revisão sobre estudos de polimorfismos HLA em indígenas das Américas, chegando, a partir de dados de sorologia HLA, às seguintes conclusões: todos os antígenos que apresentam os maiores valores de frequência média nas tribos da América do Sul são os mesmos que da América do Norte, sendo os seguintes os antígenos mais comuns nos dois sub-continentes: HLA-A2, HLA-B35, HLA-Cw3, HLA-DQ3, HLA-DR4. Comparações de frequências de antígenos entre as tribos indígenas das Américas do Norte e do Sul, mostram que as tribos Norte apresentam maior número de antígenos que as do Sul. Esta observação pode corroborar a teoria de que os indígenas do Norte teriam originado, por migrações, os indígenas da América Latina. A presença de antígenos característicos de indígenas da América do Norte, como HLA-B27 e HLA-B21, e sua ausência ou presença em baixos valores de frequência nas tribos da América do Sul são evidências que favorecem esta teoria. Quanto ao grau de miscigenação, as tribos norte-americanas apresentam maior frequência de antígenos de origem não indígena, fornecendo valores de miscigenação bem superiores aos indígenas da América do Sul. Considerando apenas os locos HLA-A e HLA-B, as tribos mais miscigenadas da América do Norte são Nahua e Chippewa, e da América do Sul, as tribos Mapuche e Uitoto.

Um aspecto intrigante do polimorfismo HLA são as diferenças entre ameríndios da América do Norte, Central e América do Sul. Entre estas, pode-se fazer referência ao fato de que os indígenas norte-americanos, descendentes dos Paleo-Índios, apresentam alelos HLA-B semelhantes àqueles presentes em Caucasóides e Orientais. Em contraste, ameríndios da

América Central e do Sul, descendentes dos mesmos Paleo-Índios, possuem alelos que não foram encontrados em outras populações, os quais derivaram de alelos pré-existentes por mutação de ponto ou conversão gênica. Essa diferença entre populações pode ser explicada pela presença de diferentes pressões seletivas atuando sobre o polimorfismo HLA, ocorrida durante a migração para o Sul, sendo expostos a novos patógenos, os quais favoreceram a manutenção de novos alelos nesses ameríndios em detrimento dos alelos ancestrais (BELICH *et al.*, 1992; WATKINS *et al.*, 1992; CADAVID e WATKINS, 1997; PARHAM *et al.*, 1997).

TITUS-TRACHTENBERG *et al.* (1994) estudaram índios Cayapa do Equador, e encontraram um novo alelo DRB1*08042, o qual provavelmente surgiu após a colonização da América do Sul (10 a 20 mil anos atrás), sustentando que uma taxa rápida de evolução para o loco DRB1 em comparação com outros genes de classe II. PETZL-ERLER e McDEVITT (1994) caracterizaram os alelos HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 das tribos Kaingang e Guarani, e revelaram a existência de um novo alelo presente na tribo Guarani, denominado DRB1*1413. Sugeriram que originou-se nos ameríndios por conversão gênica ou recombinação entre os alelos DRB1*1402 e *0411. Este foi o terceiro alelo DR6 encontrado em populações ameríndias, além de DRB*1402 e *1406 e até hoje foi encontrado apenas na população Guarani.

LAYRISSE *et al.* (1995) analisaram os índios Bari, os quais vivem entre a Venezuela e a Colômbia; essa tribo difere de outras tribos da Venezuela anteriormente estudadas (Warao, Yanomama, Yekuana) principalmente pela ausência dos antígenos A28, A31 e Cw4. Para classe II, foram descritos os seguintes alelos DRB1, *0802, *1402, *1602, *0407 e *0411, sendo que este último é encontrado em alta frequência nos Warao e outras tribos da América do Sul; associações DRB1-DQA1-DQB1 descritas são as mesmas encontradas no norte e sul do continente, como por exemplo, o haplótipo DRB1*1402 ou *1406 foi encontrado com

DQA1*0501-DQB1*0301. As distâncias genéticas baseadas nas frequências haplotípicas HLA A-C-B-DR mostra que Bari-Warao estão muito relacionados, quando comparadas com outras tribos do Brasil, como os Guaraní e Kaingang, o que era esperado devido às diferenças linguísticas e distância geográfica.

MACK e ERLICH (1998) analisaram os locos HLA-DRB1, -DQA1, DQB1 e -DPB1 da tribo Ticuna da América do Sul, a qual habita áreas entre Brasil, Peru e Colômbia. Um novo alelo foi descrito, DRB1*0807, o qual possivelmente surgiu por mutação de ponto do alelo DRB1*0802 que é alelo *08 mais comum na América. Outro fato interessante é a ausência do alelo DRB1*1402, presente em quase todas as populações ameríndias analisadas. A ausência deste alelo pode ser explicada pelo efeito gargalo de garrafa sofrido pela população ancestral dos Ticuna, ou que este alelo foi perdido devido ao efeito do fundador ou deriva genética. Análise de haplótipos demonstraram que todos os alelos DRB1*08 (*0802 e *0807) estavam associados com os mesmos alelos DQ (DQA1*0401-DQB1*0402), sugerindo que o alelo *0807 surgiu do haplótipo ancestral *0802, encontrado em outras populações ameríndias. Para o loco DPB1, o alelo mais comum foi *0402, como em outras populações.

No 12º Workshop Internacional de Histocompatibilidade, foram estudadas 15 populações da América Latina, sendo 12 ameríndias e 3 populações mestiças do México, Venezuela e Colômbia. Foram analisados os genes HLA-DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, QAP, QBP e HLA-A, -B, -C (sendo que algumas populações não foram analisadas para todos os genes mencionados). Os resultados mostraram que: as populações ameríndias apresentam uma diversidade limitada para HLA-DRB1, DQA1, DQB1 e DPA1. Para HLA-DPB1, foi observada uma diversidade intrapopulacional maior; e que o alelo DPB1*0402 está presente em todas as populações estudadas (PETZL-ERLER *et al.*, 1997).

Vários estudos foram realizados das populações indígenas Kaingang e Guaraní, do

estado do Paraná. GUERRA *et al.*(1992) e MESSIAS *et al.* (1993) descreveram o polimorfismo de genes MHC de classe III, BF e C3, componentes do sistema complemento, nas populações indígenas Kaingang e Guarani. Nas duas tribos, os alelos BF*S e C3*S foram os mais freqüentes (em Guarani C3 é monomórfico), assim como em outras populações ameríndias, esquimós e asiáticas. A presença do alelo BF*S05 em Kaingang, anteriormente encontrado apenas na população brasileira, sugere que este alelo tenha se originado nos ameríndios. WEG-REMERS *et al.* (1997) descreveram o polimorfismo dos locos C2, C4 e BF do sistema complemento nas tribos Kaingang e Guarani em nível de DNA. O alelo BF*S apresentou maior freqüência nas duas tribos; para o loco C2, somente o alelo C2*C foi encontrado nas duas tribos, apresentando uma única exceção, em um indivíduo da tribo Kaingang que apresentou o alelo C2*B03. Para os locos C4A e C4B, os alelos C4A*3 e C4B*1 foram os mais comuns.

PETZL-ERLER *et al.*(1993) analisaram o polimorfismo HLA das tribos Kaingang e Guarani através de técnicas sorológicas, caracterizando os antígenos HLA-A, -B, -Cw, -DR, -DQ. Encontraram novas combinações haplotípicas e padrões de reações incomuns, sugerindo a existência de antígenos e alelos novos. Estimativas de distância genética entre as tribos e outras populações indígenas da América do Sul, revelaram um alto grau de divergência entre Kaingang e Guarani, incomum para populações indígenas vivendo em áreas próximas.

BELICH *et al.*(1992) e PARHAM *et al.*(1997) descreveram novos alelos HLA-B nessas tribos, surgidos por recombinação ou conversão interalélica nos ancestrais dessas populações. Sugeriram que os alelos novos foram mantidos devido à seleção relacionada a fatores ambientais e patógenos aos quais estes grupos foram expostos durante sua migração pelo continente americano. Resultados semelhantes foram obtidos por WATKINS *et al.* (1992) e FERNÁNDEZ-VINÃ *et al.* (1997), analisando respectivamente a tribo Waorani do Equador

3 tribos da Argentina: Toba, Wichi e Pilaga. No loco HLA-B, FERNÁNDEZ-VINÃ *et al.* (1997), identificaram 22 alelos, sendo 5 alelos novos, supostamente surgidos por conversão gênica. IWANAGA *et al.* (1997) analisaram uma tribo da América Central, Kuna do Panamá, observando que essa tribo apresenta menor variabilidade para o loco HLA-B, quando comparada com tribos da América do Sul. Caracterizaram 2 novos alelos: B*3911 e B*5110, possivelmente originados por mutação de ponto e recombinação, respectivamente.

SOTOMAIOR (1994) e SOTOMAIOR *et al.* (1998) analisaram os genes HLA-DQA1 e -DQB1 das tribos Kaingang e Guarani. Encontrados os seguintes haplótipos nas duas tribos: DQA1*0401-DQB1*0402; DQA1*0501-DQB1*0301; DQA1*03011-DQB1*0302 e DQA1*03-DQB1*03032. Os genes HLA-DQB1 e -DQA1 mostram um grau de polimorfismo inferior aos dos genes HLA-B e -DR das mesmas populações. Além disso, nenhum dos alelos e haplótipos encontrados está restrito aos ameríndios. Os autores concluíram que a diversidade limitada de alelos e haplótipos visto nesses ameríndios, comparada com o observado em outras populações, é o resultado principalmente do efeito do fundador e deriva genética.

FAUCZ (1997) analisou os genes TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7, e verificou uma variabilidade menor desses nas tribos Kaingang e Guarani, em comparação com outras populações. Também foram constatadas diferenças entre as duas tribos: em Kaingang foram identificados os alelos TAP1*0101 e *0201; TAP2*0101, *0201, *D; LMP2*H, *R; LMP7*A, *B. Na tribo Guarani foram encontrados TAP1*0101 e *0201; TAP2*0101, *0102; LMP2*R; LMP7*A, *B. Existem diferenças significativas entre as frequências gênicas e genotípicas dessas tribos como, por exemplo, a alta frequência do alelo TAP2*0102 (30,2%) em Guarani, o qual não foi encontrado em Kaingang. Foram observadas também fortes associações de alguns alelos, como o alelo TAP2*D, 100% associado ao haplótipo LMP7*A-TAP1*0101-LMP2*H na população Kaingang. Em Guarani, o alelo TAP2*0102 está

associado ao haplótipo LMP7*B-TAP1*0201-LMP2*R.

PETZL-ERLER *et al.* (1998) analisaram os genes HLA-DPA1 E HLA-DPB1 em uma amostra que incluía principalmente caucasóides e ameríndios, para o 12º Workshop Internacional de Histocompatibilidade. Foi observado um forte desequilíbrio de ligação entre HLA-DPB1 e HLA-DPA1, como por exemplo: DPB1* 0401-DPA1*0103. Vários outros haplótipos encontrados em ameríndios também foram encontrados em caucasóides.

Outros genes do MHC e, em especial, os genes HLA-E, -G, -DMA e -DMB, objetos deste trabalho, não foram investigados em outras populações indígenas americanas.

1.6.1. AS TRIBOS KAINGANG E GUARANI

A população indígena do estado do Paraná conta com aproximadamente 8000 indivíduos, os quais pertencem, em sua maioria, às tribos Guarani e Kaingang, as quais são os dois principais grupos indígenas do sul do Brasil. Estão distribuídos em 17 reservas sob a jurisdição da FUNAI (Tabela 1).

1.6.1.1. Guarani

Os índios Guaranis pertencem ao tronco lingüístico Tupi-Guarani. Na época do descobrimento e durante o início da colonização ibérica do novo continente, os Guaranis habitavam as terras do litoral sul do Brasil, o estuário do Prata, às margens do Rio Paraná e o

atual território do Paraguai (ANAI/PR). A atividade econômica estava concentrada na agricultura de queimada, em campos preparados pelas famílias, de forma itinerante. Praticavam também a caça e a pesca. As antigas comunidades Guaraní eram formadas de famílias patrilineares. Os Guaranis tiveram os primeiros contatos com os colonizadores espanhóis e portugueses a partir da descoberta de metais preciosos na Bacia do Prata, no século XVI. Atualmente vivem do sudeste ao sul do Brasil, no Paraguai, norte da Argentina e Bolívia (ÍNDIOS DO PARANÁ, 1993).

1.6.1.2. Kaingang

Os índios Kaingangues pertencem ao tronco lingüístico Macro-Gê. Habitavam os estados de São Paulo, Santa Catarina e Paraná e o norte da Argentina. Tinham como principal atividade econômica a agricultura e portanto, apresentavam maior grau de sedentarismo que os Guaraní. Os Kaingangues encontram-se divididos em duas metades patrilineares exogâmicas (os membros de uma metade só podem se casar com pessoas de outra metade), que por sua vez se dividiam em sub-grupos. Com esta organização, pretendiam formar grupos numericamente proporcionais. Os primeiros contatos com portugueses e espanhóis ocorreram no século XVIII, quando começou a ocupação dos territórios ainda não colonizados (ANAI/PR).

Kaingangues e Guaranis, embora possuindo culturas e línguas diferenciadas, foram agrupados em espaços físicos contíguos em algumas reservas indígenas. Os Guaranis dedicam-se a pequenas roças de consumo familiar, fabricação e venda de artesanato e venda eventual de

mão-de-obra aos donos de fazendas. Os Kainganges estão integrados à economia de mercado regional como produtores de bens agrícolas, em cooperativas, ou como assalariados ou bóia-frias. Os postos indígenas de Ivaí, Faxinal, Rio das Cobras e Queimadas constituem os núcleos de maior preservação dos valores tradicionais: língua, festas, artesanatos, etc. A população da maioria dos postos, entretanto, apresenta um elevado índice de miscigenação étnica e descaracterização cultural (ANAI/PR).

Tabela 1. Distribuição das populações indígenas do estado do Paraná.

Posto Indígena	Etnia	Número de habitantes	Município
Apucarana	Kaingang	690	Londrina
Avá-Guarani	Guarani	215	São Miguel do Iguaçu
Barão de Antonina	Kaingang	460	São Gerônimo da Serra
Faxinal	Kaingang e Guarani	183	Cândido de Abreu
Ilha da Cotinga	Guarani	165	Paranaguá
Ivaí	Kaingang	707	Manoel Ribas
Laranjinha	Kaingang e Guarani	207	Santa Amélia
Mangueirinha	Kaingang e Guarani	1420	Mangueirinha
Marrecas	Kaingang	517	Guarapuava
Palmas	Kaingang	542	Palmas/Abelardo Luz(SC)
Pinhalzinho	Guarani	80	Tomazina
Queimadas	Kaingang	365	Ortigueira
Rio Areia	Guarani	72	Inácio Martins
Rio das Cobras	Kaingang e Guarani	1596	Laranjeiras do Sul
São Gerônimo da Serra	Kaingang	173	São Gerônimo da Serra
Tibagi	Kaingang	78	Ortigueira

Fonte: Povos Indígenas do Brasil: 1991-1995.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- a) Caracterizar os alelos HLA de classe I, HLA-E, e HLA-G e de classe II, HLA-DMA e HLA-DMB das tribos Kaingang e Guarani e de uma amostra de caucasóides através de PCR-SSO.
- b) Estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas.
- c) Identificar os haplótipos estendidos, incluindo os alelos dos genes: HLA-G, -A, C, -B, -DRA, -DR, -DQ, TAP2, LMP7, TAP1, LMP2, -DMB e -DMA, nas tribos Kaingang e Guarani e estimar as suas frequências haplotípicas.
- d) Estimar o desequilíbrio de ligação entre os alelos dos genes não-clássicos estudados e também destes com os genes MHC anteriormente estudados nas tribos Kaingang, Guarani e na amostra de caucasóides.
- e) Comparar os polimorfismos das três populações estudadas entre si e também ao de outras populações.

3. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, as populações Kaingang e Guarani das reservas de Ivaí e Rio das Cobras, do estado do Paraná, foram analisadas para vários genes do MHC: HLA-A, -B, -C, -DR, DQ através de métodos sorológicos; HLA-A, -B, -C, -DRA, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, C2, C4, BF através de técnicas moleculares, pelo grupo do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR (vide item 1.6.) e em colaboração com outros pesquisadores do Brasil e do exterior. Os resultados demonstraram a importância desses estudos para a compreensão da evolução do MHC.

A variabilidade dos genes analisados neste trabalho é pouco conhecida. Poucas amostras populacionais foram investigadas, entre as quais nenhuma população indígena americana.

A caracterização dos genes HLA-DMA, -DMB, -E, -G é importante para a verificação do seu grau de polimorfismo e também para fazer inferências, a partir dos dados obtidos, quanto aos mecanismos evolutivos que estão agindo sobre estes genes. Ao mesmo tempo, o conhecimento do perfil genético dessas populações contribuirá para o conhecimento de sua história biológica. Os dados obtidos neste trabalho, somados aos obtidos em estudos anteriores, vêm ampliar as informações a respeito do MHC em populações indígenas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS POPULACIONAIS

Foram selecionadas duas reservas indígenas do Estado do Paraná, Ivaí e Rio das Cobras. Ivaí, situada no município de Manoel Ribas, ocupa uma área de 7.306 hectares, com cerca de 800 indivíduos pertencentes à tribo Kaingang. Em Rio das Cobras, município de Laranjeiras do Sul, vivem aproximadamente 1800 Kaingangues e 400 Guaranis, numa área de 18.682 hectares. A amostra escolhida para este estudo é formada por 93 indivíduos da tribo Guarani da reserva de Rio das Cobras e 239 indivíduos da tribo Kaingang (131 de Ivaí e 108 de Rio das Cobras). Foi selecionada uma amostra de 63 indivíduos caucasoídes, residentes na cidade de Curitiba, PR.

As amostras indígenas foram obtidas em fevereiro de 1988, e já foram investigadas para vários polimorfismos do MHC (BELICH *et al.*, 1992; GUERRA *et al.*, 1992; PETZL-ERLER, LUZ e SOTOMAIOR, 1993; MESSIAS *et al.*, 1993; PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; SOTOMAIOR, 1994; SOTOMAIOR *et al.*, 1997; PETZL-ERLER *et al.*, 1997; PETZL-ERLER *et al.*, 1998; FAUCZ, 1997; WEG-REMERS *et al.*, 1997). Outros polimorfismos (da hemoglobina, butirilcolinesterase, fosfatase ácida, entre outros) foram estudados nessas tribos por ALCÂNTARA *et al.* (1995) e SALZANO *et al.* (1997).

Os procedimentos quanto à extração e purificação de DNA genômico, determinação de concentração foram feitos de acordo com o protocolo do XI WORKSHOP

INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE, adaptado de SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989).

A coleta e extração do DNA das amostras de caucasóides foi realizada em 1994 e foi adaptada da Técnica do Nonidet P-40 (JOHN *et al.*, 1990) modificada por LAHIRI e NURNBERGER JR.(1991).

4.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

A PCR baseia-se na amplificação *in-vitro* de regiões específicas do DNA (MULLINS e FALOONA, 1987) e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da fita dupla, anelamento com oligonucleotídeos iniciadores e extensão da cadeia de DNA mediante a ação da Taq polimerase (SAIKI *et al.*, 1988)

Esta técnica permite a amplificação de fragmentos de aproximadamente 50 pb a 3000 pb, é rápida, necessitando de poucas horas, e utiliza pequena quantidade de DNA.

A PCR para cada região a ser amplificada possui características próprias, quanto à concentração de oligonucleotídeos iniciadores e tamanho do fragmento resultante, entre outras. Para tanto deve-se otimizar as condições para cada fragmento. Na Tabela 2 estão resumidas as condições utilizadas para cada gene estudado neste trabalho. As concentrações mencionadas são as da solução final, no tubo de reação. Os oligonucleotídeos iniciadores e suas seqüências são mostrados na Tabela 3. As ciclagens foram efetuadas no termociclador PTC-100 (MJ Research).

Tabela 2. Condições utilizadas na PCR.

Condições	HLA-E exon 2	HLA-E exon 3	HLA-G exon 2 e 3	HLA-DMA exon 3	HLA-DMB exon 2	HLA-DMB exon 3
Quantidade de DNA	0,125 µg	0,1 µg	0,125 µg	0,125 µg	0,075 µg	0,125
Tampão para Taq Polimerase	1X [#]	1X*	1X*	1X*	1X*	1X*
dNTP	0,2 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Oligonucleotídeos iniciadores [*]	20 pmoles	12,5 pmoles	12,5 pmoles	10 pmoles	10 pmoles	12,5 pmoles
MgCl ₂	#	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	2 mM	2 mM
Taq polimerase Cenbiot	1U	1U	1U	1U	1U	1U
DMSO	10%	-	-	-	-	-
Água Milli-Q q.s.p.	30 µl	20 µl	30 µl	25 µl	15 µl	25 µl
Ciclagem.						
temperatura/Tempo						
Início	94°C - 3'	94°C - 3'	96°C - 3'	94°C - 3'	94°C - 3'	94°C - 3'
1. Desnaturação	94°C - 1'	94°C - 1'	96°C - 1'	94°C - 1'	94°C - 1'	94°C - 1'
2. Anelamento	57°C - 1'	62°C - 1'	55°C - 1'	50°C - 45"	58°C - 45"	60°C - 45"
3. Extensão	72°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 1'	72°C - 45"	72°C - 45"	72°C - 45"
Final	72°C - 10'	72°C - 10'	72°C - 10'	72°C - 5'	72°C - 10'	72°C - 5'
número de ciclos (passos 1, 2 e 3)	30	30	30	30	30	30
Fragmento amplificado	313 pb	320 pb	exon 2: 282 pb exon 3: 276 pb	279 pb	279 pb	272 pb

*Tampão Cenbiot 10X: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM KCl.

#Tampão M - Invitrogen 5X: 300 mM Tris-HCl; 75 mM (NH₄)₂SO₄; 7,5 mM MgCl₂ pH 10,0.

*Quantidade adicionada de cada oligonucleotídeo iniciador.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores.

Loco	Exon	Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência 5' → 3'	Fragmento amplificado
HLA-E	Exon 2	*Es25'	TCT Cag CCC CTC CTC gCC CCC A	313 pb
		*Es23'	Cgg TgA gTg ACC Ccg gCC Agg A	
	Exon 3	E35'	Cgg gAC TgA CTA Agg ggC	320 pb
		E33'	AgC CCT gTg gAC CCT CTT	
HLA-G	Exon 2	G-25'	TCC ATg Agg TAT TTC AgC gC	282 pb
		G-23'	CTg ggC Cgg AgT TAC TCA CT	
	Exon 3	G-35'	CAC ACC CTC CAg Tgg ATg AT	276 pb
		G-33'	ggT ACC CgC gCg CTg CAg CA	
HLA-DMA	Exon 3	DMA35	ggg TTT CCT ATC gCT gAA gTg	279 pb
		DMA33	CCA ATA ggC AAT TgC TgT gTA	
HLA-DMB	Exon 2	DMB25'	Tgg CTT CgT ggC CCA TgT ggA	279 pb
		DMB23'	gTC CTg TTg gTC AgT gAT C	
	Exon 3	DMB35'	Cgg CCA CCA TCT gTg CAA gT	272 pb
		DMB33'	CCA gTC CCg AAg gAT ggg CT	

Fonte: ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 1994; TEISSERENC, 1994

* oligonucleotídeos iniciadores projetados para o presente trabalho.

4.3. ELETROFORESE PARA CONTROLE DE AMPLIFICAÇÃO

A eficácia da amplificação foi analisada através da corrida em gel de agarose 1%. Uma alíquota de 5 µl do produto de amplificação de cada amostra foi misturada com tampão para aplicação em gel (0,25% de azul de bromofenol, 40% p/v de sucrose em água bidestilada). A coloração do fragmento amplificado foi feita com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e observado à luz ultravioleta.

4.4. PREPARO DE “SPOT BLOTS”

Membranas de nylon carregadas positivamente (Hybond N⁺ Amersham ou Boehringer) foram quadriculadas manualmente, cada quadrado (0,5cm²) correspondendo à posição de uma amostra. Depois foram hidratadas com SSPE 3X e secas em estufa a 37°C. Uma alíquota de 1,5µl de cada amostra foi aplicada nas respectivas posições das membranas.

Após a aplicação, as membranas foram secas a 40°C por 30 minutos. Em seguida, os produtos de PCR foram desnaturados, colocando-se as membranas, uma a uma, durante 5 minutos em uma solução de NaOH 0,4N. Após, as membranas foram neutralizadas em SSPE 3X por 10 minutos.

Para fixação do DNA, as membranas permaneceram a 120°C durante 30 minutos.

4.5. MARCAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA SEQUÊNCIA-ESPECÍFICOS (SSO) COM BIOTINA.

Cada reação de marcação foi realizada em um volume final de 25µl, contendo 1X Tampão para TdT, 0,05mM de Biotina 11-dUTP, 62,5 pmoles do oligonucleotídeo-sonda e 7U de TdT. Após a mistura dos reagentes, a solução foi incubada a 37°C, em banho-Maria, durante 3 horas, com agitação a cada hora. As sondas biotiniladas foram estocadas a -70°C.

As sequências dos oligonucleotídeos-sonda são mostradas na Tabela 4.

4.6. DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA ATRAVÉS DA HIBRIDAÇÃO COM SSO.

4.6.1. PRÉ-HIBRIDAÇÃO

As membranas foram colocadas em frascos próprios para o forno de hibridação Hybaid, para hidratação, com aproximadamente 10 ml de SSPE 4X e incubadas por 10 minutos na temperatura de hibridação (T_h) apropriada para cada oligonucleotídeo-sonda (Tabela 4). Após 10 minutos, foi retirada essa solução e foram adicionados 10 ml de uma solução contendo TMAC, pré-aquecida na mesma temperatura de hibridação da sonda utilizada, sendo os frascos colocados novamente no forno durante 30 minutos.

4.6.2. HIBRIDAÇÃO

Foram adicionados, à solução contendo TMAC do frasco, 4 μ l da sonda biotilada (concentração da solução estoque = 10 pmoles/ μ l). Os frascos foram recolocados no forno e deixados durante 60 minutos, no mínimo, na temperatura de hibridação apropriada para cada sonda (Tabela 4).

Tabela 4. Oligonucleotídeos-sonda utilizados, mostrando sequência, especificidade, temperatura de hibridação (Th) e temperatura de lavagem de alta estrigência (Tm).

Gene	Exon	Sonda	Sequência 5' → 3'	Especificidade	Th	Tm
HLA-E	2	E2011	ggC TCC CAC TCC TTg	0101, 0102, 01031, 01032	50	57
		E2012	ggC TCT CAC TCC TTg	0104	50	57
		E2021	CgA gTg AAC CTg Cgg	0101, 0102, 0104, 01031	50	57
		E2022	CgA gTg AAT CTg Cgg	01032	50	59
		E2031	CTg CgC ggC TAC TAC	0101, 01031, 01032, 0104	50	57
		E2032	CTg Cgg CgC TAC TAC	0102	42	48
HLA-E	3	E3011	CCC gAC Agg CgC TTC	0101, 0102	50	59
		E3012	CCC gAC ggg CgC TTC	01031, 01032, 0104	50	59
		E3021	CAC CAg AgA gCC TAC	0101, 0102, 01031, 01032	50	57
		E3022	CAC CAg ggA gCC TAC	0104	50	55
HLA-G	2	*G31.01	gAC gAC ACg CAg TTC	01011, 01012, 01013, 0102, 0104	50	54
		*G31.02	gAC gAC TCg CAg TTC	0103	50	54
		*G54.01	gTg gAg CAg gAg ggg	01011, 01012, 01013, 0103, 0104	50	54
		*G54.02	gTg gAg Cgg gAg ggg	0102	42	46
		*G57.01	ggg CCg gAg TAT Tgg	01011, 0102, 0103	50	54
		*G57.02	ggg CCA gAg TAT Tgg	01012, 01013, 0104	50	54
HLA-G	3	*G107.01	TCC gAC ggA CgC CTC	01011, 01012, 0102, 0103, 0104	50	54
		*G107.02	TCC gAC ggT CgC CTC	01013	50	54
		*G110.01	CgC CTC CTC CgC ggg	01011, 01012, 01013, 0102, 0103	50	54
		*G110.02	CgC CTC ATC CgC ggg	0104	50	54
HLA-DMA	3	S1	ATC ATT CCg TCC CTg Tgg	0101, 0103	50	59
		S2	ATC ATT CCA TCC CTg Tgg	0102, 0104	50	57
		S3	TgT CgA Tgg ACT CAg CTT	0101, 0102, 0104	50	59
		S4	TgT CgA TgC ACT CAg CTT	0103	50	59
		S5	AAT TgA CCg CTA CAC AgC	0101, 0102	50	59
		S6	AAT TgA CCA CTA CAC AgC	0103	50	59
		S7	AAT TgA CTg CTA CAC AgC	0104	50	59
HLA-DMB	2	V6	CAA CAA ggA TCT gCT gA	0101, 0102, 0103, 0104, 0105	50	57
		V7	CAA CAA ggT TCT gCT gA	NEW	57	57
HLA-DMB	3	V1	ACA gCA gTg CgC ACA AgA	0101, 0103, NEW	50	59
		V2	ACA gCA gTg AgC ACA AgA	0102	50	59
		V3	ACA gCA gTg TgC ACA AgA	0104, 0105	45	49
		V4	TAg AgC ACA TTg ggg CTC	0101, 0102, 0105, NEW	42	46
		V5	TAg AgC ACA CTg ggg CTC	0103, 0104	42	46

Fonte: ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 1994; TEISSERENC, 1994

* oligonucleotídeos-sonda projetados para o presente trabalho.

4.6.3. LAVAGEM DE BAIXA ESTRINGÊNCIA

Após retirar a solução de hibridação, a qual pode ser reutilizada, foram acrescentados ao frasco 10 a 15 ml de solução A, sendo esses em seguida recolocados no forno a 37°C, por 10 minutos. Após, a solução foi descartada e esse procedimento foi repetido mais uma vez.

4.6.4. LAVAGEM DE ALTA ESTRINGÊNCIA

Foram adicionados ao frasco, 10 ml de solução contendo TMAC, pré-aquecida na temperatura de lavagem (T_m) específica para cada oligonucleotideo-sonda (tabela 4). Os frascos foram colocados no forno, o qual estava ajustado para a mesma temperatura. O processo de abrir o forno e colocar o frasco faz com que a temperatura deste diminua. Portanto após recolocado o frasco, esperava-se que a temperatura de lavagem de alta estringência fosse novamente atingida e contavam-se 5 minutos. Após decorrido os 5 minutos, retirava-se a solução.

4.6.5. REVELAÇÃO

Foram acrescentados 10 ml de SSPE 3X+SDS 0,5% ao frasco, colocado este no forno a 37°C por 10 minutos. Após descartada a solução foram acrescentados 8 ml de solução SSPE 3X+SDS 0,5% contendo o conjugado de HRP-SA (concentração final = 0,5 µg/ml). Os frascos foram deixados no forno durante 30 minutos. Após retirada a solução acima, foram

realizadas lavagens com 15 ml de SSPE 1X+SDS 0,1%, e os frascos deixados no forno durante 10 minutos. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Após, as membranas foram acidificadas com 10 ml de tampão citrato, os frascos foram recolocados no forno por 5 minutos.

Para a reação colorimétrica foi preparada a seguinte solução: 3 ml de tampão citrato + 3µl de H_2O_2 (concentração 3%) + 150 µl de TMB (2 mg/ml, diluído em água). Essa solução foi adicionada ao frasco, o qual ficava no forno por mais 10 minutos. A frente do forno foi coberta, pois essa reação deve processar-se no escuro.

Após 10 minutos, a solução foi desprezada; a interrupção da reação foi realizada acrescentando-se ao frasco 10 a 15 ml de H_2O . Os frascos foram recolocados no forno por 10 minutos ou mais.

As membranas foram retiradas dos frascos e colocadas em um recipiente com H_2O e guardadas em geladeira, quando a leitura não se realizava imediatamente.

4.7. REGISTRO DOS RESULTADOS

Os sinais obtidos eram classificados conforme sua intensidade, de acordo com os seguintes escores:

- 1 - negativo
- 2 - negativo duvidoso
- 4 - positivo duvidoso
- 6 - positivo
- 8 - positivo forte

Todas as membranas foram fotocopiadas para eventuais consultas posteriores.

4.8. DESCOLORAÇÃO E DESIBRIDAÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO-SONDA.

As membranas foram mergulhadas em um recipiente contendo etanol 80% durante 10 a 15 minutos, ou até a completa descoloração.

Após descoloridas, foi acrescentado ao recipiente NaOH 0,4N + 0,1% SDS, para desibridação da sonda. As membranas eram deixadas nessa solução durante 10 minutos a 70°C.

Essa solução foi desprezada e a solução de desibridação II foi adicionada ao recipiente. As membranas foram deixados por mais 10 minutos a 70°C. Por último, foram enxaguadas com H₂Odd e guardadas na geladeira em sacos plásticos selados, para posterior reutilização.

4.9. SOLUÇÕES

1. Soluções estoque:

- Tris-HCl 2 M pH 8,0
- Tris-HCl 2 M pH 7,5
- EDTA dissódico 0,4M pH 8,0
- SDS 10%
- NaCl 3M
- NaOH 0,4N
- SSPE 20 X: NaCl 3M, NaH₂PO₄ 200mM e EDTA dissódico 20mM.

2. Soluções de uso

- Solução TMAC (Cloreto de amônio tetrametilado)

Reagente/Solução Estoque	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 2M pH 8,0	38,02 ml	50 mM
SDS 10 %	15,21ml	0,1 %
EDTA 0,4M pH 8,0	7,60 ml	2 mM
TMAC	500g	3 M
H ₂ Odd q.s.p.	1520,68 ml.	

- Solução A

Reagente/Solução Estoque	Quantidade	Concentração final
SSPE 20 X	100 ml	2X
SDS 10%	10 ml	0,1%
H ₂ Odd q.s.p.	1000 ml	

- SSPE 3X+SDS 0,5%

Reagente/Solução Estoque	Quantidade	Concentração final
SSPE 20 X	150 ml	3X
SDS 10%	50 ml	0,5%
H ₂ Odd q.s.p.	1000 ml.	

- SSPE 1X+SDS 0,1%

Reagente/ Solução Estoque	Quantidade	Concentração final
SSPE 20 X	50 ml	1X
SDS 10%	10 ml	0,1%
H ₂ Odd q.s.p. 1000 ml.		

- Tampão Citrato

Reagente/ Solução Estoque	Quantidade	Concentração final
Citrato Trissódico	18,4g	0,1 M

Ajustar pH para 5,0 com ácido cítrico monihidratado e H₂Odd q.s.p. 1000 ml.

- NaOH 0,4N+0,1% SDS

Reagente/ Solução Estoque	Quantidade	Concentração final
NaOH	16g	0,4N
SDS 10%	10 ml	0,1%
H ₂ Odd q.s.p. 1000 ml.		

- Solução de desibridação II

Reagente/ Solução Estoque	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 2M pH 7,5	100ml	0,2M
SDS 10%	50ml	0,5%
SSPE 20X	5 ml	0,1X
H ₂ Odd q.s.p. 1000 ml.		

4.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A caracterização dos alelos nas populações estudadas foi baseada na comparação do padrão obtido de reação das sondas, com o esperado para as seqüências alélicas publicadas.

As freqüências alélicas foram obtidas através da fórmula:

$$x = \frac{n}{2N}$$

sendo:

x = freqüência relativa do alelo em questão

n = freqüência absoluta do alelo em questão

N = número total de indivíduos.

As freqüências genotípicas foram obtidas por contagem direta. As freqüências genotípicas observadas foram comparadas com as esperadas segundo o Teorema de Hardy-Weinberg, utilizando o método de Guo e Thompson (GUO e THOMPSON, 1992), através do programa ARLEQUIN 1.1. (SCHNEIDER *et al.*, 1997).

Para o loco HLA-E, foi considerada a existência de “blank”, ou seja, alelos que não foram definidos pela técnica utilizada, o quais comportam-se portanto, como alelos recessivos. Para o cálculo da freqüência de “blank”, considera-se que o loco apresenta $k - 1$ alelos codominantes e um recessivo, o qual corresponde à soma dos alelos não identificados (blank). A freqüência dos alelos codominantes (p_i) e de alelos recessivos (p_{blank}) são calculadas pelas fórmulas:

$$p_i = \frac{\sum_{j=1}^{k-1} n_{ij} + (n_i \cdot h_i)}{2N}$$

$$p_{blank} = 1 - \sum_{j=1}^{k-1} p_i$$

Sendo n_{ij} o número de indivíduos heterozigotos para os alelos i e j ; n_i o número de indivíduos possuindo apenas o antígeno i , e h_i a proporção esperada de indivíduos homozigotos para o alelo i . Para o cálculo de frequência de blank, utilizamos o método de máxima verossimilhança (CEPPELINI *et al.*, 1955; YASUDA e KIMURA, 1968), através do programa VEROS 1.0.

Foram realizados testes de neutralidade para todos os locos HLA-G, DMA e DMB, pelo método de Ewens-Watterson (WATTERSON, 1978), utilizando o programa ARLEQUIN 1.1.

Foram realizados testes para avaliação do desequilíbrio de ligação para os locos analisados neste trabalho e também entre esses e os outros locos MHC estudados anteriormente nas tribos Kaingang e Guarani e em caucasóides. A frequência haplotípica esperada, sob equilíbrio de ligação, $p_i p_j$, é o produto da frequência do alelo i de um loco e do alelo j em outro loco. Estimativas das frequências haplotípicas (x_{ij}) de dois locos foram obtidas usando o programa ARLEQUIN 1.1. O arquivo de entrada do programa ARLEQUIN 1.1, que consiste das frequências genotípicas absolutas, foi feita pelo programa CONVERT v.1.1, a partir do banco de dados em formato Access.

O coeficiente de desequilíbrio de ligação (Δ), que corresponde à diferença entre a frequência haplotípica esperada ($p_i p_j$) e a frequência haplotípica observada (x_{ij}), é obtido através da fórmula:

$$\Delta = x_{ij} - p_i p_j$$

Uma avaliação padronizada do grau de desequilíbrio de ligação entre dois locos é realizado através do cálculo de desequilíbrio de ligação relativo (ΔR). ΔR é definido como a proporção de desequilíbrio com respeito ao valor máximo possível. É expresso pela fórmula:

$$\Delta R = \sqrt{\frac{\Delta}{\Delta_{max}}}$$

$$\text{sendo que } \Delta_{m\acute{a}x.} = \begin{cases} \min. (p_i, p_j) - p_i p_j & (\text{quando } \Delta > 0) \\ \max. (0, p_i + p_j - 1) - p_i p_j & (\text{quando } \Delta < 0) \end{cases}$$

A hipótese de equilíbrio de ligação ($\Delta = 0$), foi testada pelo Teste Exato de Fisher bilateral (ZAR, 1974), com a utilização de tabelas de contingência 2x2, tendo como valores de entrada as combinações do alelo i de um loco e do alelo j de outro loco, com as seguintes classes: a = ++, b = +-, c = -+, e d = --. Para obter a frequência absoluta destas classes e o valor de p foi utilizado o programa VEROS v.1.1. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Os haplótipos HLA-G, -A, -C, -B, -DRA, -DR, -DQ, TAP2, LMP7, TAP1, LMP2, -DMB, -DMA, foram identificados, quando possível, através de análise de segregação em famílias.

As frequências haplotípicas foram estimadas por contagem direta.

5. RESULTADOS

5.1. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

As frequências alélicas dos locos HLA-E, HLA-G, HLA-DMA e HLA-DMB são mostradas na Tabela 5.

As frequências genotípicas dos locos HLA-G, HLA-DMA e HLA-DMB são mostradas nas Tabelas 6 e 7.

Os fenótipos de todos os indivíduos podem ser encontrados no Anexo 8.5.

5.1.1. ALELOS HLA-E.

Foram descritos cinco alelos para o gene HLA-E (BODMER *et al.*, 1997), *0101, *0102, *01031, *01031 e *0104. Identificamos com segurança nas três populações analisadas os seguintes: *0101, *01031, *01032. É evidente a existência de outro(s) alelo(s). Certamente *0102 existe nessas populações. Contudo em muitos indivíduos havia grande dificuldade em distinguir *0101 de *0102, de forma que consideramos a existência de “blank” (alelo não definido pela técnica utilizada). Este comporta-se, do ponto de vista de genética formal, como recessivo. O alelo *0104 não foi observado em nenhuma das amostras populacionais.

Nas populações indígenas, o alelo E*0101 foi o mais frequente; o segundo mais comum foi “blank”. Nos caucasóides, os alelos “blank”, *0101 e *01032 foram os mais frequentes. Em

alguns caucasóides não foi possível distinguir *0101 de *01031. Para este loco, não realizamos outras análises, pois precisamos esclarecer o alelo blank.

Tabela 5. Frequências alélicas (%) de HLA-E, HLA-G, HLA-DMA e HLA-DMB.

	KAI (n=478)	KIV (n=262)	KRC (n=216)	GRC (n=186)	CAU (n=126)
HLA-E					
*0101	67,26	67,45	67,03	37,09	26,94
*01031	3,99	5,72	1,90	2,73	10,11
*01032	1,94	0,38	3,83	28,85	25,81
*0104	-	-	-	-	-
blank	26,81	26,45	27,25	31,32	29,21
*0101 ou *01031	-	-	-	-	7,94
HLA-G					
*01011	27,41	20,23	36,11	47,84	47,62
*01012	5,44	5,73	5,09	50,00	23,02
*01013	1,26	-	2,78	-	5,56
*0102	-	-	-	-	-
*0103	60,46	68,70	50,46	1,08	3,96
*0104	5,44	5,34	5,56	1,08	19,84
HLA-DMA					
*0101	73,43	78,63	67,13	82,80	83,33
*0102	26,57	21,37	32,87	17,20	11,91
*0103	-	-	-	-	2,38
*0104	-	-	-	-	2,38
HLA-DMB					
*0101	47,07	44,28	50,46	40,86	82,54
*0102	-	-	-	-	7,14
*0103	52,72	55,72	49,07	59,14	7,14
*0104	0,21	-	0,47	-	-
*0105	-	-	-	-	0,80
*NEW	-	-	-	-	2,38

n= número total de alelos.

KAI = Kaingangues das reservas de Ivaí e Rio das Cobras.

KIV = Kaingangues da reserva de Ivaí.

KRC = Kaingangues da reserva de Rio das Cobras.

GRC = Guaranis da reserva de Rio das Cobras.

CAU = Caucasóides.

5.1.2. ALELOS E GENÓTIPOS DE HLA-G

Dos sete alelos descritos, *01011, *01012, *01013, *0102, *0103, *0104 e *0105N (BODMER *et al.*, 1997), só não testamos G*0105N. O alelo *0102 não foi encontrado em nenhuma das populações estudadas.

Na tribo Kaingang (KAI), observamos que *0103 e *01011 são os mais freqüentes. O alelo *01013 foi encontrado apenas na população Kaingang de Rio das Cobras (KRC). Na tribo Guarani, os alelos *01012 e *01011 são os mais comuns. Na amostra de caucasóides, encontramos os seguintes alelos, em ordem de freqüência decrescente: *01011, *01012, *0104, *01013 e *0103.

O genótipo G*0103/*0103 foi o mais encontrado em Kaingang (KAI). Enquanto que na tribo Guarani e em caucasóides, G*01011/*01012 foi o mais comum.

5.1.3. ALELOS E GENÓTIPOS DE HLA-DMA

Dos quatro alelos descritos, *0101, *0102, *0103 e *0104 (BODMER *et al.*, 1997), encontramos nas populações indígenas apenas dois: *0101 e *0102. Nos caucasóides encontramos todos os quatro. O alelo *0101 é o mais comum em indígenas e caucasóides.

O genótipo DMA*0101/*0101 foi o mais comum em KIV, GRC e caucasóides. Em KRC, DMA*0101/*0102 apresentou maior freqüência.

5.1.4. ALELOS E GENÓTIPOS DE HLA-DMB.

Dos cinco alelos reconhecidos oficialmente por BODMER *et al.*(1997), *0101, *0102,

*0103, *0104 e *0105, e um alelo, *NEW, descrito por DJILALI-SAIAH *et al.* (1996a), encontramos apenas *0101 e *0103 nas três populações indígenas, sendo que *0103 foi mais freqüente em KIV e GRC. O alelo *0101 apresentou maior freqüência em KRC; nessa população encontramos o alelo *0104 em um indivíduo.

Na amostra de caucasóides, foram encontrados os seguintes alelos, *0101, *0102, *0103, *NEW e *0105, em ordem de freqüência decrescente.

Os genótipos mais comuns foram: DMB*0101/*0103 em Kainganges, DMB*0103/*0103 em Guaranis e DMB*0101/*0101 em caucasóides.

Tabela 6. Freqüências genotípicas (%) de HLA-G.

GENÓTIPOS	KAI (n=239)	KIV (n=131)	KRC (n=108)	GRC (n=93)	CAU (n=63)
G*01011/*01011	15,06	9,16	22,22	23,66	22,22
G*01011/*01012	2,51	3,82	0,93	48,39	26,98
G*01011/*01013	0,84	-	1,85	-	6,35
G*01011/*0102	-	-	-	-	-
G*01011/*0103	17,99	15,27	21,30	-	3,17
G*01011/*0104	3,35	3,05	3,70	-	14,29
G*01012/*01012	1,26	0,76	1,85	24,73	1,59
G*01012/*01013	0,42	-	-	-	3,17
G*01012/*0102	-	-	-	-	-
G*01012/*0103	3,35	3,82	2,78	-	1,59
G*01012/*0104	2,51	2,29	2,78	2,15	12,70
G*01013/*01013	-	-	-	-	1,59
G*01013/*0102	-	-	-	-	-
G*01013/*0103	1,26	-	2,78	-	-
G*01013/*0104	0,42	-	0,93	-	1,59
G*0102/*0102	-	-	-	-	-
G*0102/*0103	-	-	-	-	-
G*0102/*0104	-	-	-	-	-
G*0103/*0103	46,86	56,49	35,18	1,07	1,59
G*0103/*0104	4,60	5,34	3,70	-	1,59
G*0104/*0104	-	-	-	-	4,76

n= número total de indivíduos.

KAI = Kainganges das reservas de Ivaí e Rio das Cobras.

KIV = Kainganges da reserva de Ivaí.

KRC = Kainganges da reserva de Rio das Cobras.

GRC = Guaranis da reserva de Rio das Cobras.

CAU = Caucasóides

Tabela 7. Frequências genotípicas (%) de HLA-DMA e HLA-DMB.

GENÓTIPOS	KAI (n=239)	KIV (n=131)	KRC (n=108)	GRC (n=93)	CAU (n=63)
DMA*0101/*0101	52,72	62,60	40,74	67,74	68,25
DMA*0101/*0102	41,42	32,06	52,78	30,11	22,22
DMA*0101/*0103	-	-	-	-	4,76
DMA*0101/*0104	-	-	-	-	3,18
DMA*0102/*0102	5,86	5,34	6,48	2,15	-
DMA*0102/*0103	-	-	-	-	-
DMA*0102/*0104	-	-	-	-	1,59
DMA*0103/*0103	-	-	-	-	-
DMA*0103/*0104	-	-	-	-	-
DMA*0104/*0104	-	-	-	-	-
DMB*0101/*0101	20,92	19,85	22,22	20,43	65,08
DMB*0101/*0102	-	-	-	-	14,29
DMB*0101/*0103	52,30	48,85	56,48	38,71	14,29
DMB*0101/*0104	-	-	-	-	-
DMB*0101/*0105	-	-	-	-	1,58
DMB*0101/*new	-	-	-	-	4,76
DMB*0102/*0102	-	-	-	-	-
DMB*0102/*0103	-	-	-	-	-
DMB*0102/*0104	-	-	-	-	-
DMB*0102/*0105	-	-	-	-	-
DMB*0102/*new	-	-	-	-	-
DMB*0103/*0103	26,36	31,30	20,37	40,86	-
DMB*0103/*0104	0,42	-	0,93	-	-
DMB*0103/*0105	-	-	-	-	-
DMB*0103/*new	-	-	-	-	-
DMB*0104/*0104	-	-	-	-	-
DMB*0104/*0105	-	-	-	-	-
DMB*0104/*new	-	-	-	-	-
DMB*0105/*0105	-	-	-	-	-
DMB*0105/*new	-	-	-	-	-
DMB*new/*new	-	-	-	-	-

vide legenda na Tabela 6.

5.2. ANÁLISES DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.

Foram feitas análises para os genes, HLA-G, -DMA, -DMB, em todas as amostras populacionais. Observamos que, para os genes HLA-DMA, a amostra KRC não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para HLA-DMB, todas as amostras estão em equilíbrio. Para HLA-G, somente Guaranis e a amostra de caucasóides estão em equilíbrio. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

		<i>KIV</i>	<i>KRC</i>	<i>GRC</i>	<i>CAU</i>
HLA-G *	χ^2	27,65	34,27	0,011	11,08
	g.l	6	10	1	10
	p	0,00011	0,00017	0,917	0,352
HLA-DMA	χ^2	0,271	4,367	0,321	3,947
	g.l	1	1	1	6
	p	0,603	0,037	0,571	0,684
HLA-DMB	χ^2	0,013	3,546	2,217	4,689
	g.l	1	3	1	10
	p	0,909	0,315	0,137	0,911

*resultados obtidos reunindo alelos com frequência $\leq 10\%$.

5.3. TESTE DE NEUTRALIDADE

Foram feitos testes de neutralidade para HLA-G, -DMA, -DMB, para todas as amostras populacionais. Observamos que não há evidências de desvios de neutralidade para HLA-G e HLA-DMA, nas três amostras populacionais. Para HLA-DMB, somente na amostra KIV foi observado um desvio significativo (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de p obtidos pelo teste de Ewens-Watterson de neutralidade.

	<i>HLA-G</i>	<i>HLA-DMA</i>	<i>HLA-DMB</i>
<i>KIV</i>	0,380	0,215	0,037
<i>KRC</i>	0,240	0,129	0,158
<i>GRC</i>	0,309	0,273	0,066
<i>CAU</i>	0,110	0,734	0,842

5.4. TESTES DE HOMOGENEIDADE

Foram realizados testes de homogeneidade entre Kaingangues de Ivaí e de Rio das Cobras. Com base nas frequências alélicas de HLA-DMB, essas populações são iguais ($\chi^2 = 3,17$, 2 g.l., $p = 0,21$). Analisando-se os alelos de HLA-G e HLA-DMA, apresentaram-se heterogêneas: obtivemos para HLA-G, $\chi^2 = 24,77$, 4 g.l., $p = 5,56 \times 10^{-5}$. Para HLA-DMA, $\chi^2 = 7,44$, g.l., $p = 6,37 \times 10^{-3}$.

Também foram realizados testes de homogeneidade entre Kaingangues e Guaranis. Os resultados mostraram que as diferenças são significativas, a não ser para HLA-DMB, para o

qual encontramos $\chi^2 = 2,54$ e $p = 0,28$. Para o loco HLA-G, o χ^2 foi 281,37 e o valor de $p = 1,13 \times 10^{-12}$; para HLA-DMA obtivemos $\chi^2 = 5,94$, e $p = 0,015$. Realizamos também testes para comparar Kaingangues com caucasóides, e Guaranis com caucasóides, e observamos que essas populações são muito diferentes, para todos os locos estudados (dados não mostrados).

5.5. HAPLÓTIPOS ESTENDIDOS DAS POPULAÇÕES INDÍGENAS.

Os haplótipos mais comuns e suas frequências são mostrados na Tabela 10.

Com base nos dados sorológicos e moleculares de estudos anteriores, e na análise de segregação em famílias das populações indígenas, foram montados os haplótipos estendidos, contendo os genes: HLA-G, -A, -C, -B, -DRA, -DR, -DQ, TAP2, LMP7, TAP1, LMP2, -DMB, -DMA.

Nossa amostra total era de 239 Kaingangues e 93 Guaranis, perfazendo 332 indivíduos. Não foi possível montar o haplótipo completo de todos, pois não dispúnhamos de dados de famílias de todos os indivíduos.

Identificamos 308 haplótipos de Kaingangues, sendo o mais freqüente G*0103 - A31 - Cw4 - B35 - DRA*0102 - DR8 - DQ4 - TAP2*D - LMP7*A - TAP1*0101 - LMP2*H - DMB*0103 - DMA*0101.

Na amostra Guarani, conseguimos identificar 129 haplótipos. O haplótipo mais freqüente foi: G*01012 - A28 - Cw3 - B40 - DRA*0101 - DR4 - DQ3 - TAP2*0102 - LMP7*B - TAP1*0201 - LMP2*R - DMB*0103 - DMA*0101.

Não foi possível obter dados semelhantes para a amostra de caucasóides pois não temos dados de famílias e, até o presente, poucos locos foram analisados.

Tabela 10. Haplótipos estendidos mais comuns em Kaingangues e Guaranis.

HAPLÓTIPOS													
K (N=308)													
G (N=129)													
-G	-A	-C	-B	-DRA	-DR	-DQ	TAP2	LMP7	TAP1	LMP2	-DMB	-DMA	x _{ij}
0103	31	4	35	0102	8	4	D	A	0101	H	0103	0101	37 12,01
0103	31	3	51	0101	4	3	0101	B	0101	R	0103	0101	33 10,71
0103	31	4	35	0101	2	3	0201	B	0201	R	0101	0102	25 8,12
0103	31	7	39	0101	4	3	0101	B	0101	R	0101	0102	10 3,25
01012	28	3	40	0101	4	3	0102	B	0201	R	0103	0101	- - 15 11,63
01011	31	-	53G	0102	8	4	0101	A	0101	R	0101	0102	- - 12 9,30
01011	2	3	62	0101	2	3	0102	B	0201	R	0103	0101	- - 11 8,53
01011	2	3	62	0101	2	3	0201	B	0201	R	0101	0101	- - 9 6,98
01011	2	3	62	0101	2	3	0201	B	0201	R	0103	0101	- - 9 6,98
01012	2	3	40	0102	6	3	0101	B	0101	R	0101	0101	- - 8 6,20
outros													203 65,91 65 50,38

K = Kaingang.

G = Guaraní.

n = número de haplótipos.

x_{ij} = frequência haplotípica(%).

outros : haplótipos com frequências inferiores a 3% em Kaingangues e inferiores a 6% em Guaranis, e haplótipos oriundos de miscigenação com não-ameríndios.

5.6. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA PARES DE LOCOS.

Foram realizados cálculos de desequilíbrio de ligação entre os genes estudados neste trabalho para as tribos Kaingang e Guaraní e para a amostra de caucasóides. Devido ao fato dessas amostras terem sido analisadas anteriormente, dispunhamos de dados dos locos HLA-A, -B, -C, -DRA, DR, -DQ, -DPA1, DPB1, TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7 para as populações indígenas. Para os caucasóides tínhamos dados de TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7. A análise foi realizada para pares de locos, como por exemplo, DMA-DRA. Em alguns casos, como HLA-DP, consideramos os locos DPB1 e DPA1 como um só marcador, haja visto a associação absoluta entre os alelos desses locos como, por exemplo, entre DPA1*0201 e DPB1*2701. O mesmo foi feito para HLA-B e -C. As análises foram realizadas entre os genes não-clássicos de classe I com os clássicos de classe I. O mesmo procedimento foi realizado com relação aos genes de classe II. A análise de genes de classe I com genes de classe II, por exemplo, HLA-G e HLA-DMA, não revelou desequilíbrios importantes, de forma que os resultados não são mostrados aqui. A seguir serão mencionados apenas os haplótipos que apresentaram desequilíbrio de ligação positivo e somente os desvios mais significativos.

Com respeito aos genes HLA-G e HLA-A, o haplótipo G*01011-A2 em Kaingangues e G*01012-A28 em Guaranis estão em desequilíbrio de ligação positivo. Em Guaranis o haplótipo G*01011-A2 também está em desequilíbrio, embora pouco acentuado em comparação com Kaingangues. Entre os haplótipos HLA-G-C-B, os desvios mais significativos foram: G*01011-Cw3-B62 e G*01011-Cw1-B51 em Guaranis e Kaingangues, respectivamente. Outros haplótipos em desequilíbrio foram observados, sendo os desvios pouco acentuados e nenhum deles é compartilhado pelas duas tribos. Os haplótipos e valores

correspondentes são mostrados nas Tabelas 11 e 12.

Para os genes HLA-DMA e HLA-DMB (Tabela 13), os desvios positivos mais significativos foram vistos no haplótipo DMA*0102-DMB*0101 em Guaranis e Kaingangues. Para este par de locos, observamos que os desvios tendem a mesma direção (positivos e negativos) para os haplótipos existentes nas duas tribos. Em caucasóides, somente o haplótipo DMA*0103-DMB*NEW está em desequilíbrio. Os desvios entre as frequências observada e esperada dos outros haplótipos encontrados é pouco intenso.

Foram feitos cálculos de desequilíbrio para HLA-DMA com os genes TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7, para todas as populações estudadas. Todos os haplótipos observados e análises para desequilíbrio de ligação são mostrados nas Tabelas 14, 15, 16 e 17.

Entre os genes HLA-DMA e TAP1, os desvios mais significativos ocorreram entre DMA*0102-TAP1*0101 em Guaranis; e DMA*0102-TAP1*0201 em Kaingangues. Nota-se que para este par de locos os desvios seguem direções opostas nas duas tribos, por exemplo, o haplótipo DMA*0102-TAP1*0101, o qual apresenta um desvio positivo em Guaranis, mas negativo em Kaingangues. Para HLA-DMA e TAP2, os desvios não foram significativos para Guaranis e caucasóides. Em Kaingangues, o haplótipo DMA*0102-TAP2*0201 está em desequilíbrio de ligação positivo. Para os haplótipos HLA-DMA e LMP2, observamos desequilíbrio de ligação positivo em Kaingangues, entre DMA*0102-LMP2*R. Em Guaranis LMP2 é monomórfico. Para os haplótipos HLA-DMA e LMP7, constatamos desequilíbrio de ligação em DMA*0102-LMP7*A em Guaranis e, em Kaingangues DMA*0102-LMP7*B apresentou maior desvio; observamos que para este par de locos, os desvios tendem a direções opostas. Na amostra de caucasóides não foi observado nenhum desequilíbrio entre os locos mencionados acima.

Fizemos testes de desequilíbrios de ligação entre HLA-DMA e HLA-DRA, DR, DP, nas populações indígenas. Todos os haplótipos observados e análises para desequilíbrio de ligação são mostrados nas Tabelas 18, 19 e 20.

Entre HLA-DMA e HLA-DRA, os desvios mais significativos ocorreram para DMA*0102-DRA*0101 em Kaingangues. Não foi observado desvio significativo em Guaranis. Quanto a HLA-DMA e HLA-DR, os haplótipos DMA*0102-DR8 e DMA*0102-DR2 estão em desequilíbrio de ligação positivo em Guaranis e Kaingangues, respectivamente. Entre HLA-DMA e HLA-DP os únicos desvios significativos ocorreram para DMA*0102-DPA1*01-DPB1*0402 em Kaingangues e DMA*0102-DPA1*0201-DPB1*1401 em Guaranis. De maneira geral, os desvios observados para este conjunto de locos tendem na mesma direção nas duas populações analisadas, com exceção daqueles observados para os haplótipos que incluem o alelo DPB1*0402.

Foram feitos também cálculos de desequilíbrio para HLA-DMB com os genes TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7, para todas as populações estudadas. Todos os haplótipos observados e análises para desequilíbrio de ligação são mostrados nas Tabelas 21, 22, 23 e 24.

Entre HLA-DMB e TAP1, os desvios mais significativos ocorreram entre DMB*0101-TAP1*0101 em Guaranis e DMB*0101-TAP1*0201 em Kaingangues. Para HLA-DMB e TAP2, os desvios mais acentuados ocorreram entre DMB*0101-TAP2*0101 e DMB*0103-TAP2*0102 em Guaranis; DMB*0101-TAP2*0201 e DMB*0103-TAP2*D em Kaingangues.. Para HLA-DMB e LMP2, há desequilíbrio de ligação em Kaingangues, sendo o de DMB*0103-LMP2*H o desequilíbrio positivo mais significativo. Em Guaranis LMP2 é monomórfico. Para HLA-DMB e LMP7, observamos que o haplótipo DMB*0101-LMP7*B em Kaingangues, apresentou maior desvio; não houve desvios significativos em Guaranis e

caucasóides. Notamos que os desvios (embora a maioria não seja significativa) entre as frequências observada e esperada dos haplótipos para HLA-DMB-TAP1, DMB-TAP2 e DMB-LMP7 seguem direções opostas em Guaranis e Kaingangues. Além disso, em Kaingangues os desequilíbrios são bem mais acentuados que em Guaranis, para todos os pares de locos citados. Na amostra de caucasóides não foi observado nenhum haplótipo em desequilíbrio-significativo.

Foram realizados testes de desequilíbrios de ligação entre HLA-DMB e HLA-DRA, DR, DP nas populações indígenas. Todos os haplótipos observados e análises para desequilíbrio de ligação são mostrados nas Tabelas 25, 26 e 27.

Para os locos HLA-DMB e HLA-DRA, os desvios (pouco acentuados) mais significativos ocorrem entre DMB*0101-DRA*0102 em Guaranis e Kaingangues. Contudo, o desequilíbrio é positivo em Guaranis e negativo em Kaingangues. Entre HLA-DMB e HLA-DR, o desvio mais significativo ocorre entre DMB*0103-DR2 em Guaranis e DMB*0101-DR2 em Kaingangues, sendo que nesta amostra os desvios são bem mais acentuados do que os obtidos em Guaranis. Há uma tendência dos desvios para DMB-DRA e DMB-DR seguirem direções opostas nas duas tribos. Entre HLA-DMB e HLA-DP, os desvios positivos mais acentuados ocorrem entre DMB*0101-DPA1*0201-DPB1*1401 em Guaranis e, em Kaingangues, o desvio mais significativo foi o de DMB*0101-DPA1*01-DPB1*0402. Novamente, em Kaingangues as diferenças entre as frequências observada e esperada são mais acentuadas do que em Guaranis.

Tabela 11. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-G e HLA-A.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=90)					KAINGANG (N=230)				
	x_{ij}	p_{ij}	Δ	ΔR	p	x_{ij}	p_{ij}	Δ	ΔR	p
G*01011-A blank	1,67	1,06	0,61	0,52	ns	2,02	1,03	0,99	0,36	ns
G*01011-A2	32,71	24,42	8,28	0,36	0,005	13,88	4,02	9,86	0,92	$< 1 \times 10^{-10}$
G*01011-A28	2,09	15,93	-13,84	-0,87	$1,53 \times 10^{-7}$	0	0,11	-0,11	-1	ns
G*01011-A29	0,56	0,27	0,29	1	ns	2,32	0,63	1,69	1	0,004
G*01011-A30	1,67	0,80	0,87	1	ns	0,84	0,28	0,56	0,72	ns
G*01011-A31	9,09	4,78	4,31	0,83	0,02	8,15	18,84	-10,69	-0,57	$7,05 \times 10^{-6}$
G*01012-A blank	0,56	1,14	-0,58	-0,51	ns	0	0,20	-0,20	-1	ns
G*01012-A2	18,40	25,62	-7,22	-0,32	0,01	0,65	0,78	-0,13	-0,17	ns
G*01012-A24	0	0,60	-0,60	-1	ns	0,84	0,33	0,51	0,10	ns
G*01012-A26	0	0				0,63	0,03	0,60	1	ns
G*01012-A28	31,25	17,04	14,21	0,87	$4,46 \times 10^{-6}$	0,21	0,02	0,19	0,47	ns
G*01012-A31	0,91	5,11	4,20	-0,82	ns	2,94	3,65	-0,71	-0,20	ns
G*01013-A11	0	0				1,27	0,02	1,25	1	ns
G*0103-A blank	0	0				1,78	2,31	-0,53	-0,23	ns
G*0103-A2	0	0				0,23	8,97	-8,74	-0,97	$5,00 \times 10^{-11}$
G*0103-A3	0	0				0,21	0,13	0,08	1	ns
G*0103-A28	0	0				0,21	0,26	-0,05	-0,18	ns
G*0103-A30	0	0				0,21	0,64	-0,43	-0,67	ns
G*0103-A31	0	0				58,12	42,05	16,07	0,86	0,0005
G*0104-A24	1,11	0,01	1,10	1	ns	5,49	0,35	5,14	1	0,03

N = número total de indivíduos.

 x_{ij} = frequência haplotípica observada (%). p_{ij} = frequência haplotípica esperada (%). Δ = coeficiente de desequilíbrio de ligação (%) ΔR = coeficiente de desequilíbrio relativo.

ns = não significativo.

Obs.: somente os haplótipos encontrados em pelo menos uma das amostras populacionais estão relacionados.

Tabela 12. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-G e HLA-B-C.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=90)					KAINGANG (N=237)				
	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p
G*01011-Cw blank-B blank	1,67	0,80	0,87	1	ns	0,61	0,86	-0,25	-0,29	ns
G*01011-Cw blank-B18	0	0				0,21	0,06	0,15	1	ns
G*01011-Cw blank-B22	0	0				0,63	0,34	0,29	0,66	ns
G*01011-Cw blank-B39	0,56	0,27	0,29	1	ns	0,21	0,11	0,10	0,31	ns
G*01011-Cw blank-B40	0	0				0,21	0,17	0,04	0,08	ns
G*01011-Cw blank-B48	2,22	1,06	1,16	1	ns	0,49	1,96	-1,47	-0,75	0,03
G*01011-Cw blank-B51	0	0				0,21	0,06	0,15	1	ns
G*01011-Cw blank-B53G	7,22	3,45	3,77	1	0,016	0	0			
G*01011-Cw1-B51	0	0				7,40	2,64	4,76	0,67	3,12 x 10 ⁻⁹
G*01011-Cw2-B blank	0	0				0,21	0,06	0,15	1	ns
G*01011-Cw2-B52	0	0				0,21	0,06	0,15	1	ns
G*01011-Cw2-B53	0	0				1,27	0,35	0,92	1	ns
G*01011-Cw3-B35	2,15	6,90	-4,75	-0,69	0,0001	0	0	-0,06	-1	ns
G*01011-Cw3-B40	4,12	18,58	-14,46	-0,78	0,008	1,94	3,44	-1,5	-0,44	ns
G*01011-Cw3-B51	0	0				0,42	0,23	0,19	0,31	ns
G*01011-Cw3-B62	23,81	11,95	11,86	0,91	6,42 x 10 ⁻⁸	0	0			
G*01011-Cw4-B blank	0,56	0,27	0,29	1	ns	3,82	9,65	-5,83	-0,61	2,77 x 10 ⁻⁶
G*01011-Cw4-B35	3,25	2,65	0,60	0,21	ns	0,47	0,40	0,07	0,07	ns
G*01011-Cw4-B51	0	0				0,21	0,33	-0,12	-0,36	ns
G*01011-Cw4-B62	0	0				0	0			
G*01011-Cw5-B blank	0,56	0,27	0,29	1	ns	1,90	0,52	1,38	1	0,01
G*01011-Cw6-B13	0	0				0,21	0,06	0,15	1	ns
G*01011-Cw6-B37	0	0				0	0			
G*01011-Cw7-B8	1,67	0,80	0,87	1	ns	6,21	5,11	1,10	0,08	ns
G*01011-Cw7-B39	0	0,27	-0,27	-1	ns	0,37	0,18	0,19	0,42	ns
G*01011-Cw8-B14	0	0				0,30	0,17	0,13	0,05	ns
G*01012-Cw blank-B blank	0	0,85	-0,85	-1	ns	0,42	0,03	0,39	0,64	ns
G*01012-Cw blank-B40	0	0				0,23	0,38	-0,15	-0,39	ns
G*01012-Cw blank-B48	0	1,14	-1,14	-1	ns	0	0			
G*01012-Cw blank-B62	0,56	0,29	0,27	1	ns	0	0			

continuação da tabela 12.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=90)					KAINGANG (N=237)				
	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p
G*01012-Cw1-B51	0	0				0,58	0,52	0,06	0,01	ns
G*01012-Cw3-B35	12,29	7,38	4,91	0,69	0,005	0	0			
G*01012-Cw3-B40	34,77	19,88	14,89	0,78	0,0002	0,21	0,01	0,20	1	ns
G*01012-Cw3-B51	0	0				1,28	0,67	0,61	0,13	ns
G*01012-Cw3-B53G	0,56	0,29	0,27	1	ns	0	0			
G*01012-Cw3-B62	1,20	12,78	-11,58	-0,90	0,0005	0	0,04	-0,04	-1	ns
G*01012-Cw4-B35	1,19	0,27	0,92	1	ns	2,25	1,87	0,38	0,11	ns
G*01012-Cw7-B39	0,56	0,29	0,27	1	ns	0	1,00	-1,00	-1	ns
G*01013-Cw blank-B blank	0	0				1,06	0,05	1,01	0,83	ns
G*01013-Cw3-B48	0	0				0,21	0,001	0,209	1	ns
G*0103-Cw blank-B blank	0	0				1,20	1,93	-0,73	-0,38	ns
G*0103-Cw blank-B22	0	0				0,21	0,51	-0,30	-0,59	ns
G*0103-Cw blank-B39	0	0				0,21	0,51	-0,30	-0,18	ns
G*0103-Cw blank-B48	0	0				6,46	4,36	2,10	0,75	0,02
G*0103-Cw1-B51	0	0				1,73	5,89	-4,16	-0,71	ns
G*0103-Cw1-B62	0	0				0,63	0,38	0,25	1	ns
G*0103-Cw11-B48	0	0				0,21	0,13	0,08	1	ns
G*0103-Cw3-B51	0	0				9,44	7,70	1,74	0,35	ns
G*0103-Cw3-B62	0	0				0,21	0,51	-0,30	-0,59	ns
G*0103-Cw4-B35	0	0				25,16	21,54	3,62	0,26	0,02
G*0103-Cw4-B51	0	0				1,00	0,89	0,11	0,18	ns
G*0103-Cw4-B62	0	0				1,05	0,77	0,28	0,56	ns
G*0103-Cw6-B13	0	0				0	1,15	-1,15	-1	ns
G*0103-Cw7-B35	0	0				0,21	0,13	0,08	1	ns
G*0103-Cw7-B39	0	0				12,57	11,41	1,16	0,16	ns
G*0103-Cw7-B48	0	0				0,21	0,13	0,08	1	ns
G*0103-Cw8-B14	0	0				0,27	0,39	-0,12	-0,31	ns
G*0104-Cw3-B62	0	0,28	-0,28	-1	ns	0,21	0,51	-0,30	-0,59	ns
G*0104-Cw4-B35	1,11	0,06	1,05	1	ns	4,22	2,07	2,15	0,57	ns
G*0104-Cw11-B62	0	0				1,05	0,65	0,40	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 13. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DMB.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=93)					KAINGANG (N=239)					CAUCASÓIDES (N=63)				
	x _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p
DMA*0101-DMB*0101	23,66	33,83	-10,17	-1	ns	21,05	34,57	-13,52	-0,96	0,014	70,05	69,44	0,61	0,04	ns
DMA*0101-DMB*0102	0	0				0	0				4,88	4,63	0,25	0,27	ns
DMA*0101-DMB*0103	59,14	48,97	10,17	1	ns	52,17	38,71	13,46	0,96	0,034	7,61	6,62	0,99	0,75	ns
DMA*0101-DMB*0104	0	0				0,21	0,15	0,06	1	ns	0	0			
DMA*0101-DMB*0105	0	0				0	0				0,79	0,66	0,13	1	ns
DMA*0102-DMB*0101	17,20	7,03	10,17	1	7,57 x 10 ⁻⁹	26,03	12,51	13,52	0,96	<1,0 x 10 ⁻¹²	11,57	9,92	1,65	0,83	ns
DMA*0102-DMB*0103	0	10,17	-10,17	-1	ns	0,54	14,00	-13,46	-0,96	7,41 x 10 ⁻⁷	0,33	0,94	-0,61	-0,65	ns
DMA*0103-DMB*NEW	0	0				0	0				2,38	0,06	2,32	1	2,52 x 10 ⁻⁵
DMA*0104-DMB*0101	0	0				0	0				1,71	1,99	-0,28	-0,14	ns
DMA*0104-DMB*0102	0	0				0	0				0,68	0,14	0,54	0,24	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 14. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e TAP1.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=83)					KAINGANG (N=225)					CAUCASÓIDES (N=63)				
	x _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p
DMA*0101-TAP1*0101	20,48	31,05	-10,57	-1	ns	61,28	55,90	5,38	0,31	ns	63,58	64,81	-1,23	-0,33	ns
DMA*0101-TAP1*0201	62,05	51,58	10,47	1	ns	12,28	17,66	-5,38	-0,31	7,50 x 10 ⁻⁴	17,37	16,53	0,84	0,25	ns
DMA*0101-TAP1*0301	0,60	0,50	0,10	1	ns	0	0				2,38	1,98	0,4	1	ns
DMA*0102-TAP1*0101	16,87	6,30	10,57	1	1,06 x 10 ⁻⁶	14,72	20,10	-5,38	-0,31	0,021	-10,92	9,26	1,66	0,63	ns
DMA*0102-TAP1*0201	0	10,47	-10,47	-1	0,03	11,72	6,34	5,38	0,31	6,67 x 10 ⁻⁴	0,99	2,37	-1,38	-0,58	ns
DMA*0103-TAP1*0101	0	0				0	0				1,09	1,85	-0,76	-0,41	ns
DMA*0103-TAP1*0201	0	0				0	0				1,29	0,47	0,82	0,43	ns
DMA*0104-TAP1*0101	0	0				0	0				2,18	1,85	0,33	0,63	ns
DMA*0104-TAP1*0201	0	0				0	0				0,20	0,48	-0,28	-0,58	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 15. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e TAP2.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=83)					KAINGANG (N=229)					CAUCASÓIDES (N=63)				
	X _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p
DMA*0101-TAP2*0101	18,29	22,20	-3,91	-0,33	ns	34,78	34,18	0,60	0,5	ns	45,98	42,50	3,48	0,46	ns
DMA*0101-TAP2*0102	28,31	23,70	4,61	1	ns	0	0				0	0			
DMA*0101-TAP2*0201	35,33	36,32	-0,99	-0,11	ns	18,82	24,28	-5,46	-0,30	4,48 x 10 ⁻⁴	16,84	20,54	-3,70	-0,33	ns
DMA*0101-TAP2*D	1,81	1,52	0,29	1	ns	17,37	13,10	4,27	0,89	0,040	1,73	2,83	-1,1	0,41	ns
DMA*0101-TAP2*C	0	0				2,18	1,59	0,59	1	ns	10,45	9,21	1,24	0,76	ns
DMA*0101-TAP2*0101 ou 0201	0	0				0	0				2,50	2,12	0,38	1	ns
DMA*0101-TAP2*0101 ou C	0	0				0	0				3,33	2,83	0,50	1	ns
DMA*0101-TAP2*0102 ou D	0	0				0	0				2,50	2,83	-0,33	-0,12	ns
DMA*0101-TAP2*0102 ou G	0	0				0	0				0,83	0,71	0,12	1	ns
DMA*0101-TAP2*C ou H	0	0				0	0				0,83	1,41	-0,58	-0,41	ns
DMA*0102-TAP2*0101	8,22	4,31	3,91	0,33	ns	11,95	12,55	-0,60	-0,50	ns	2,71	5,84	-3,13	-0,54	ns
DMA*0102-TAP2*0201	8,04	7,05	0,99	0,11	ns	14,37	8,91	5,46	0,30	0,011	5,31	2,82	2,49	0,28	ns
DMA*0102-TAP2*D	0	0,29	-0,29	-1	ns	0,53	4,80	-4,27	-0,89	0,001	1,60	0,39	1,21	0,41	ns
DMA*0102-TAP2*C	0	0				0	0,59	-0,59	-1	ns	0,39	1,27	-0,88	-0,70	ns
DMA*0102-TAP2*0102 ou D	0	0				0	0				0,83	0,39	0,44	0,15	ns
DMA*0102-TAP2*C ou H	0	0				0	0				0,83	0,19	0,64	0,43	ns
DMA*0103-TAP2*0101	0	0				0	0				1,32	0,84	0,48	0,58	ns
DMA*0103-TAP2*0201	0	0				0	0				0,35	0,40	-0,05	-0,13	ns
DMA*0104-TAP2*0201	0	0				0	0				1,67	0,41	1,26	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 16. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e LMP2.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=91)					KAINGANG (N=230)					CAUCASÓIDES (N=56)				
	x _{ij}	p _{i j}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{i j}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{i j}	Δ	ΔR	p
DMA*0101-LMP2*H	0	0				17,24	13,06	4,18	0,88	ns	24,75	26,23	-1,48	-0,13	ns
DMA*0101-LMP2*R	82,97	82,97	0			56,02	60,20	-4,18	-0,88	ns	59,18	57,70	1,48	0,13	ns
DMA*0102-LMP2*H	0	0				0,59	4,77	-4,18	-0,88	0,007	3,82	3,35	0,47	0,06	ns
DMA*0102-LMP2*R	17,03	17,03	0			26,15	21,97	4,18	0,88	0,015	6,89	7,36	-0,47	-0,06	ns
DMA*0103-LMP2*R	0	0				0	0				2,68	1,84	0,84	1	ns
DMA*0104-LMP2*H	0	0				0	0				2,68	0,84	1,84	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 17. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e LMP7.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=90)					KAINGANG (N=223)					CAUCASÓIDES (N=63)				
	x _{ij}	p _{i j}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{i j}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{i j}	Δ	ΔR	p
DMA*0101-LMP7*A	2,52	7,82	-5,3	-0,68	ns	41,71	34,64	7,07	0,55	ns	36,97	37,04	-0,07	-0,008	ns
DMA*0101-LMP7*B	80,26	74,96	5,3	0,68	ns	31,16	38,23	-7,07	-0,55	0,044	46,37	46,30	0,07	0,008	ns
DMA*0102-LMP7*A	6,92	1,62	5,3	0,68	6,16 x 10 ⁻⁴	5,82	12,89	-7,07	-0,55	1,23 x 10 ⁻⁴	5,09	5,29	-0,20	-3,69	ns
DMA*0102-LMP7*B	10,30	15,60	-5,3	-0,68	ns	21,31	14,24	7,07	0,55	7,96 x 10 ⁻⁶	6,81	6,61	0,20	3,69	ns
DMA*0103-LMP7*B	0	0				0	0				2,38	1,32	1,06	1	ns
DMA*0104-LMP7*A	0	0				0	0				2,38	1,06	1,32	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 18. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DRA.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=93)					KAINGANG (N=239)				
	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p
DMA*0101-DRA*0101	60,12	58,36	1,76	0,14	ns	25,50	33,39	-7,89	-0,54	0,043
DMA*0101-DRA*0102	22,49	24,25	-1,76	-0,14	ns	48,00	40,11	7,89	0,54	0,044
DMA*0102-DRA*0101	10,53	12,29	-1,76	-0,14	ns	19,90	12,01	7,89	0,54	1,92 x 10 ⁻⁷
DMA*0102-DRA*0102	6,86	5,10	1,76	0,14	ns	6,60	14,49	-7,89	-0,54	1,13 x 10 ⁻⁵

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 19. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DR.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=91)					KAINGANG (N=237)				
	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p
DMA*0101-DR blank	2,20	2,30	-0,10	-0,04	ns	2,95	2,16	0,79	1	ns
DMA*0101-DR1	0	0				0,42	0,31	0,11	1	ns
DMA*0101-DR2	36,26	30,28	5,98	1	ns	0,75	8,65	-7,90	-0,91	0,02
DMA*0101-DR4	20,73	24,78	-4,05	-0,35	ns	20,21	20,38	-0,17	-0,009	ns
DMA*0101-DR6	13,74	11,48	2,26	1	ns	0,77	1,55	-0,78	-0,50	ns
DMA*0101-DR7	0,55	0,46	0,09	1	ns	0	0,15	-0,15	-1	ns
DMA*0101-DR8	6,87	11,47	-4,60	-0,40	ns	44,53	36,92	7,61	0,56	ns
DMA*0101-DR9	2,20	1,84	0,36	1	ns	0	0,46	-0,46	-1	ns
DMA*0101-DR11	0,97	0,92	0,06	0,27	ns	3,59	2,63	0,96	1	ns
DMA*0102-DR blank	0,55	0,45	0,10	0,42	ns	0	0,79	-0,79	-1	ns
DMA*0102-DR2	0	5,98	-5,98	-1	ns	11,07	3,17	7,90	0,91	< 1 x 10 ⁻¹⁰
DMA*0102-DR4	8,94	4,89	4,05	0,35	0,04	7,64	7,46	0,18	0,009	ns
DMA*0102-DR6	0	2,26	-2,26	-1	ns	1,34	0,56	0,78	0,50	ns
DMA*0102-DR7	0	0,09	-0,09	-1	ns	0,21	0,06	0,15	1	ns
DMA*0102-DR8	6,86	2,26	4,60	0,40	0,001	5,90	13,51	-7,61	-0,56	2,50 x 10 ⁻⁵
DMA*0102-DR9	0	0,36	-0,36	-1	ns	0,63	0,17	0,46	1	ns
DMA*0102-DR11	0,13	0,18	-0,05	-0,40	ns	0	0,96	-0,96	-1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 20. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DP.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=86)						KAINGANG (N=124)					
	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p		X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	
DMA*0101-DPA1*01-DPB1*02012	0,58	0,48	0,10	1	ns		3,63	2,73	0,90	1	ns	
DMA*0101-DPA1*01-DPB1*0301	0	0					13,00	9,93	3,07	1	ns	
DMA*0101-DPA1*01-DPB1*0401	15,93	13,92	2,01	0,68	ns		6,45	4,81	1,64	1	ns	
DMA*0101-DPA1*01-DPB1*0402	40,00	37,86	2,14	0,27	ns		29,51	40,31	-10,80	-0,93	ns	
DMA*0101-DPA1*01-DPB1*0901	0	0					0,40	0,30	0,10	1	ns	
DMA*0101-DPA1*01-DPB1*1401	0	0,48	-0,48	1	ns		0,81	0,61	0,20	1	ns	
DMA*0101-DPA1*0201-DPB1*01011	1,16	0,96	0,20	1	ns		0	0				
DMA*0101-DPA1*0201-DPB1*0901	0,58	0,48	0,10	1	ns		18,15	13,54	4,61	1	ns	
DMA*0101-DPA1*0201-DPB1*1301	0	0					2,82	2,10	0,72	1	ns	
DMA*0101-DPA1*0201-DPB1*1401	2,54	10,08	-7,54	-0,75	ns		0,73	1,20	-0,47	-0,39	ns	
DMA*0101-DPA1*0201-DPB1*2701	22,67	18,72	3,95	1	ns		0	0				
DMA*0102-DPA1*01-DPB1*0401	0,93	2,94	-2,01	-0,68	ns		0	1,64	-1,64	-1	ns	
DMA*0102-DPA1*01-DPB1*0402	5,67	7,81	-2,14	-0,27	ns		24,52	13,72	10,80	0,93	0,00004	
DMA*0102-DPA1*01-DPB1*1401	0,58	0,10	0,48	1	ns		0	0,20	-0,20	-1	ns	
DMA*0102-DPA1*0201-DPB1*1401	9,68	2,13	7,55	0,75	0,0004		0,88	0,41	0,47	0,39	ns	
DMA*0102-DPA1*02021-DPB1*1401	0,58	0,10	0,48	1	ns		0	0				

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 21. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e TAP1.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=83)					KAINGANG (N=224)					CAUCASÓIDES (N=63)				
	x_{ij}	$p_i p_j$	Δ	ΔR	p	x_{ij}	$p_i p_j$	Δ	ΔR	p	x_{ij}	$p_i p_j$	Δ	ΔR	p
DMB*0101-TAP1*0101	31,90	15,26	16,64	0,76	$8,60 \times 10^{-10}$	24,04	35,27	-11,23	-0,88	0,038	62,36	64,81	-2,45	-0,66	ns
DMB*0101-TAP1*0201	9,28	25,68	-16,40	-0,74	0,006	22,17	10,93	11,24	0,88	$< 1 \times 10^{-11}$	18,59	16,53	2,06	0,62	ns
DMB*0101-TAP1*0301	0	0,24	-0,24	-1	ns	0	0				2,38	1,98	0,40	1	ns
DMB*0102-TAP1*0101	0	0				0	0				5,56	4,33	1,23	1	ns
DMB*0103-TAP1*0101	5,16	21,80	-16,64	-0,76	0,012	52,08	40,90	11,18	0,88	ns	7,94	6,18	1,76	1	ns
DMB*0103-TAP1*0201	53,08	36,68	16,40	0,74	0,060	1,49	12,67	-11,18	-0,88	$1,03 \times 10^{-7}$	0	1,57	-1,57	-1	ns
DMB*0103-TAP1*0301	0,58	0,34	0,24	1	ns	0	0				0	0,19	-0,19	-1	ns
DMB*0104-TAP1*0101	0	0				0,22	0,17	0,05	1	ns	0	0			
DMB*0105-TAP1*0101	0	0				0	0				0,79	0,61	0,18	1	ns
DMB*NEW-TAP1*0101	0	0				0	0				1,13	1,85	-0,72	-0,39	ns
DMB*NEW-TAP1*0201	0	0				0	0				1,25	0,47	0,78	0,41	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 22. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e TAP2.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=85)					KAINGANG (N=224)					CAUCASÓIDES (N=63)				
	x_{ij}	p_{ij}	Δ	ΔR	p	x_{ij}	p_{ij}	Δ	ΔR	p	x_{ij}	p_{ij}	Δ	ΔR	p
DMB*0101-TAP2*0101	19,66	10,45	9,21	0,59	$1,18 \times 10^{-4}$	19,08	22,05	-2,97	-0,14	ns	40,37	41,67	-1,3	-0,16	ns
DMB*0101-TAP2*0102	2,35	11,63	-9,28	-0,80	$7,20 \times 10^{-4}$	0	0				0	0			
DMB*0101-TAP2*0201	16,09	17,09	-1,00	-0,06	ns	25,56	15,51	10,05	0,57	$2,18 \times 10^{-8}$	23,33	20,14	3,19	0,79	ns
DMB*0101-TAP2*D	1,79	0,72	1,07	1	ns	0,70	8,37	-7,67	-0,92	$5,43 \times 10^{-7}$	3,33	2,77	0,56	1	ns
DMB*0101-TAP2*C	0	0				1,62	1,02	0,60	0,52	ns	8,80	9,03	-0,23	-0,3	ns
DMB*0101-TAP2*0101 ou 0201	0	0				0	0				2,50	2,08	0,42	1	ns
DMB*0101-TAP2*0101 ou C	0	0				0	0				3,33	2,77	0,56	1	ns
DMB*0101-TAP2*0102 ou G	0	0				0	0				0,83	0,69	0,14	1	ns
DMB*0101-TAP2*C ou H	0	0				0	0				0,83	1,39	-0,56	-0,40	ns
DMB*0102-TAP2*0101	0	0				0	0				5,83	2,91	2,92	1	ns
DMB*0103-TAP2*0101	6,53	15,74	-9,21	-0,59	ns	27,88	24,81	3,07	0,14	ns	2,13	4,17	-2,04	-0,49	ns
DMB*0103-TAP2*0102	26,81	17,53	9,28	0,80	$1,67 \times 10^{-3}$	0	0				0	0			
DMB*0103-TAP2*0201	26,77	25,77	1,00	0,06	ns	7,48	17,45	-9,97	-0,57	$2,26 \times 10^{-6}$	0	2,01	-2,01	-1	ns
DMB*0103-TAP2*D	0	1,07	-1,07	-1	ns	16,91	9,41	7,50	0,89	$2,35 \times 10^{-7}$	0	0,28	-0,28	-1	ns
DMB*0103-TAP2*C	0	0				0,55	1,14	-0,59	-0,52	ns	2,04	0,91	1,13	0,15	ns
DMB*0103-TAP2*0102 ou D	0	0				0	0				3,33	0,27	3,06	1	ns
DMB*0103-TAP2*C ou H	0	0				0	0				0,83	0,14	0,69	0,45	ns
DMB*0104-TAP2*D	0	0				0,22	0,04	0,18	1	ns	0	0			
DMB*0105-TAP2*0201	0	0				0	0				0,83	0,20	0,63	1	ns
DMB*NEW-TAP2*0101	0	0				0	0				1,69	0,86	0,83	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 23. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e LMP2.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=91)					KATINGANG (N=230)					CAUCASÓIDES (N=50)				
	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p
DMB*0101-LMP2*H	0	0				1,00	8,38	-7,38	-0,88	2,07 x 10 ⁻⁷	28,99	25,93	3,04	0,57	ns
DMB*0101-LMP2*R	41,21	41,21	0			45,96	38,59	7,37	0,88	ns	54,04	57,08	-3,04	-0,57	ns
DMB*0102-LMP2*R	0	0				0	0				5,36	3,69	1,67	1	ns
DMB*0103-LMP2*H	0	0				16,61	9,41	7,20	0,86	3,51 x 10 ⁻⁶	2,26	2,51	-0,25	-0,10	ns
DMB*0103-LMP2*R	58,79	58,79	0			36,21	43,41	-7,2	-0,86	ns	5,78	5,53	0,25	0,10	ns
DMB*0104-LMP2*H	0	0				0,22	0,04	0,18	1	ns	0	0			
DMB*0105-LMP2*R	0	0				0	0				0,89	0,61	0,28	1	ns
DMB*NEW-LMP2*R	0	0				0	0				2,68	1,84	0,84	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 24. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e LMP7.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=90)					KATINGANG (N=225)					CAUCASÓIDES (N=63)				
	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p	X _{ij}	p _i p _j	Δ	ΔR	p
DMB*0101-LMP7*A	6,25	4,11	2,14	0,36	ns	11,23	22,71	-11,48	-0,51	7,44 x 10 ⁻⁴	42,67	37,04	5,63	0,76	ns
DMB*0101-LMP7*B	34,86	37,00	-2,14	-0,36	ns	35,88	24,40	11,48	0,51	7,22 x 10 ⁻⁹	40,66	46,29	-5,63	-0,76	ns
DMB*0102-LMP7*A	0	0				0	0				1,78	2,47	-0,69	-0,28	ns
DMB*0102-LMP7*B	0	0				0	0				3,78	3,09	0,69	0,28	ns
DMB*0103-LMP7*A	3,75	5,89	-2,14	-0,36	ns	36,99	25,40	11,59	0,51	3,27 x 10 ⁻⁵	0	3,53	-3,53	-1	ns
DMB*0103-LMP7*B	55,14	53,00	2,14	0,36	ns	15,68	27,27	-11,59	-0,51	1,58 x 10 ⁻³	7,94	4,41	3,53	1	ns
DMB*0104-LMP7*B	0	0				0,22	0,11	0,11	1	ns	0	0			
DMB*0105-LMP7*B	0	0				0	0				0,79	0,44	0,35	1	ns
DMB*NEW-LMP7*B	0	0				0	0				2,38	1,32	1,06	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 25. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e HLA-DRA.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=92)					KAINGANG (N=239)				
	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p
DMB*0101-DRA*0101	22,15	28,80	-6,65	-0,38	ns	26,81	21,37	5,44	0,23	ns
DMB*0101-DRA*0102	18,61	11,96	6,65	0,38	0,004	20,26	25,70	-5,44	-0,23	0,013
DMB*0103-DRA*0101	48,50	41,85	6,65	0,38	ns	18,38	23,93	-5,55	-0,23	ns
DMB*0103-DRA*0102	10,74	17,39	-6,65	-0,38	0,042	34,34	28,79	5,55	0,23	ns
DMB*0104-DRA*0101	0	0				0,21	0,10	0,11	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 26. Frequências haplotípicas e desequilíbrios de ligação entre HLA-DMB e HLA-DR.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=91)					KAINGANG (N=237)				
	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p
DMB*0101-DR blank	1,25	1,11	0,14	0,08	ns	0,41	1,40	-0,99	-0,71	ns
DMB*0101-DR1	0	0				0,42	0,20	0,22	1	ns
DMB*0101-DR2	6,98	14,74	-7,76	-0,53	ns	11,32	5,61	5,71	0,92	1,32 x 10 ⁻⁷
DMB*0101-DR4	13,98	12,07	1,91	0,11	ns	13,10	13,28	-0,18	-0,005	ns
DMB*0101-DR6	9,38	5,58	3,80	0,47	0,030	2,11	1,00	1,11	1	ns
DMB*0101-DR7	0	0,22	-0,22	-1	ns	0,21	0,10	0,11	1	ns
DMB*0101-DR8	7,97	5,58	2,39	0,29	0,032	15,60	23,83	-8,23	-0,35	0,004
DMB*0101-DR9	0	0,89	-0,89	-1	ns	0,63	0,30	0,33	1	ns
DMB*0101-DR11	1,10	0,45	0,65	1	ns	3,45	1,70	1,75	0,93	ns
DMB*0103-DR blank	1,49	1,63	-0,14	-0,08	ns	2,33	1,55	0,78	0,56	ns
DMB*0103-DR2	29,28	21,52	7,76	0,53	0,016	0,49	6,21	-5,72	-0,92	ns
DMB*0103-DR4	15,69	17,60	-1,91	-0,11	ns	14,75	14,63	0,12	0,009	ns
DMB*0103-DR6	4,36	8,16	-3,80	-0,47	ns	0	1,11	-1,11	-1	ns
DMB*0103-DR7	0,55	0,33	0,22	1	ns	0	0,11	-0,11	-1	ns
DMB*0103-DR8	5,77	8,16	-2,39	-0,29	ns	34,82	26,49	8,33	0,35	ns
DMB*0103-DR9	2,20	1,31	0,89	1	ns	0	0,33	-0,33	-1	ns
DMB*0103-DR11	0	0,65	-0,65	-1	ns	0,14	1,88	1,74	-0,93	ns
DMB*0104-DR blank	0	0				0,21	0,01	-0,20	1	ns

vide legenda na Tabela 11.

Tabela 27. Frequências haplotípicas e desequilíbrio de ligação entre HLA-DMB e HLA-DP.

HAPLÓTIPOS	GUARANI (N=86)					KAINGANG (N=124)				
	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p	x _{ij}	p _{ij}	Δ	ΔR	p
DMB*0101-DPA1*01-DPB1*02012	0,58	0,23	0,35	1	ns	2,60	1,53	1,07	0,51	ns
DMB*0101-DPA1*01-DPB1*0401	1,48	6,76	-5,28	-0,78	ns	0,56	2,73	-2,17	-0,79	ns
DMB*0101-DPA1*01-DPB1*0402	24,24	17,96	6,28	0,28	0,04	37,56	22,88	14,68	0,76	5,05 x 10 ⁻⁷
DMB*0101-DPA1*01-DPB1*1401	0,58	0,23	0,35	1	ns	0	0,34	-0,34	-1	ns
DMB*0101-DPA1*0201-DPB1*01011	1,16	0,46	0,70	1	ns	0	0			
DMB*0101-DPA1*0201-DPB1*1401	10,08	4,89	5,19	0,71	0,006	1,61	0,68	0,93	1	ns
DMB*0101-DPA1*0201-DPB1*2701	1,40	9,09	-7,69	-0,85	0,0003	0	0			
DMB*0101-DPA1*0201-DPB1*1401	0,58	0,23	0,35	1	ns	0	0			
DMB*0103-DPA1*01-DPB1*0301	0	0				13,00	7,88	5,12	1	0,004
DMB*0103-DPA1*01-DPB1*0401	15,38	10,10	5,28	0,78	ns	5,89	3,72	2,17	0,79	ns
DMB*0103-DPA1*01-DPB1*0402	20,53	26,81	-6,28	-0,28	ns	16,47	31,15	-14,68	-0,76	0,008
DMB*0103-DPA1*01-DPB1*02012	0	0,35	-0,35	-1	ns	1,03	2,10	-1,07	-0,51	ns
DMB*0103-DPA1*01-DPB1*0901	0	0				0,40	0,23	0,17	1	ns
DMB*0103-DPA1*01-DPB1*1401	0	0,35	-0,35	-1	ns	0,81	0,47	0,34	1	ns
DMB*0103-DPA1*0201-DPB1*0901	0,58	0,35	0,23	1	ns	18,15	10,47	7,68	1	0,0007
DMB*0103-DPA1*0201-DPB1*1301	0	0				2,82	1,62	1,20	1	ns
DMB*0103-DPA1*0201-DPB1*1401	2,13	7,32	-5,19	-0,71	ns	0	0,93	-0,93	-1	ns
DMB*0103-DPA1*0201-DPB1*2701	21,27	13,58	7,69	0,85	0,008	0	0			

vide legenda na Tabela 11.

6. DISCUSSÃO

Uma das características principais do MHC é o seu alto grau de polimorfismo. Estudos populacionais comparativos desse complexo gênico podem ajudar a elucidar questões a respeito da origem e manutenção desse polimorfismo, além de contribuir ao esclarecimento das relações históricas entre os grupos populacionais. Deste modo, o estudo de populações indígenas das Américas é extremamente informativo, visto que muitas destas populações permaneceram praticamente isoladas dos outros grupos étnicos, podendo-se extrair informações sobre a diversidade genética estabelecida ao longo das gerações no continente americano.

Muitas populações mundiais estão sendo estudadas para genes do MHC, sendo que a maioria dos estudos concentra-se na variabilidade do genes HLA clássicos, como HLA-DRB1 (que é, ao lado de HLA-B, o gene com maior número de alelos), HLA-DQA1 e -DQB1, HLA-DPA1, -DPB1, -A, -B e -C.

Pesquisas de variabilidade de genes não-clássicos são muito recentes. Os objetivos principais dos estudos publicados concentram-se na determinação da função desses genes.

Estão sendo realizados estudos de associação entre genes não-clássicos e doenças, mas devido ao desequilíbrio de ligação entre os locos do MHC, é difícil afirmar se variantes desses genes são responsáveis pela predisposição ou proteção às doenças.

O presente trabalho é o primeiro a analisar a diversidade dos genes HLA-E, -G, -DMA e -DMB em populações indígenas. Esperamos com o mesmo contribuir para melhor compreensão do seu polimorfismo e das possíveis fontes de sua diversidade.

Para o loco HLA-E, identificamos quatro alelos: *0101, *01031, *01032 e “blank” nas três populações indígenas. O alelo E*0102 pode ser discriminado do alelo *0101 através do padrão de reação de uma única sonda (vide tabela 3, e anexo 8.1). As hibridações foram repetidas várias vezes, alterando-se condições como temperatura de hibridação, temperatura de lavagem de alta estringência, e concentração da sonda. Além disso, foi sintetizada nova sonda, utilizando-se a sequência complementar. Todos os padrões de reação obtidos após essas modificações foram semelhantes. Concluimos que parte da alta frequência do alelo E*0102 poderia ser devida à existência de falsos positivos, e resolvemos que este alelo seria considerado não tipado, ou “blank”. Não conduzimos análises que incluíssem HLA-E, além do cálculo de frequências alélicas. Sugerimos que esse loco seja reanalisado por outra metodologia como, por exemplo, PCR-SSP ou PCR-RFLP, para então estimarmos com maior segurança suas frequências alélicas e genotípicas, e aplicar os testes que foram feitos para os demais genes deste estudo.

Com relação ao loco HLA-G, identificamos quatro alelos: *01011, *01012, *0103 e *0104 nas três populações indígenas. Encontramos o alelo G*01013 em seis Kaingangues de Rio das Cobras, inserido em um haplótipo portador de HLA-A11, um marcador não-indígena: **G*01013 - A11 - Cw blank - B blank - DRA*0101 - DR4 -DQA1*03011 - DQB1*0302 - TAP2*D - LMP7*A - TAP1*0101 - LMP2*H - DMB*0103 -DMA*0101 - DPA1*01 - DPB1*0401.**

Para os genes HLA de classe II, os resultados indicam a presença de dois alelos HLA-DMA (*0101 e *0102) e dois alelos HLA-DMB (*0101 e *0103) nas três populações indígenas. O alelo DMB*0104, visto somente em um indivíduo Kaingang de Rio das Cobras, provavelmente foi introduzido nessa tribo por miscigenação, uma vez que este alelo está

inserido num haplótipo contendo alelos não-indígenas (em negrito): G*0103 - A blank - Cw8 - **B14** - DRA*0101 - DR blank - TAP2*0101 - LMP7*B - TAP1*0101 - LMP2*R - **DMB*0104** -DMA*0101.

Assim, os alelos DMB*0104 e G*01013 provavelmente surgiram nessa população através de miscigenação com populações não ameríndias, visto que Kaingang e Guarani apresentam 5,3% e 2,5% de miscigenação, respectivamente (PETZL-ERLER *et al.*, 1993). É provável também que esses alelos não estavam presentes nas populações ancestrais desses ameríndios mas, como outras populações ameríndias ainda não foram investigadas, não podemos excluir a possibilidade de terem sido introduzidas no continente americano também pelos paleo-índios.

Em caucasóides, para o loco HLA-E, encontramos *0101, *01031, *01032 e “blank”; o alelo E*0104 não foi observado.

Com relação a HLA-G, encontramos cinco alelos dos sete descritos, *01011, *01012, *01013, *0103 e *0104. Não testamos o alelo G*0105N e não encontramos G*0102. Segundo SUÁREZ (1997), os alelos *01011 e *0102 apresentam o mesmo padrão quando investigados através de PCR-RFLP. Em publicação recente das seqüências dos alelos deste loco (ARNAIZ-VILLENA *et al.*, 1997b), pode-se observar que G*01011 e *0102 possuem a mesma seqüência de nucleotídeos, nos exons 2 e 3, os quais foram analisados. Portanto há evidências que G *01011 e *0102 sejam o mesmo alelo, isto é, que *0102 não existe e que a seqüência publicada tenha resultado de um erro de seqüenciamento de um alelo *01011.

Para os locos de classe II, identificamos os quatro alelos HLA-DMA descritos, sendo *0101 e *0102 os mais comuns. Para HLA-DMB, observamos cinco dos seis alelos descritos

(o alelo não encontrado foi DMB*0104); os alelos *0101 e *0103 apresentaram maior frequência.

Testamos também 10 negróides e 12 orientais, sendo todos tipados para os quatro locos deste estudo. Decidimos retirar da análise final esses indivíduos devido ao seu número reduzido. Mas, é importante mencionar que encontramos nos negróides e orientais os mesmos alelos que em caucasóides, com exceção de HLA-DMB*0104, observado em apenas um indivíduo negróide.

As frequências genóticas para HLA-DMB nas três populações indígenas e em caucasóides encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para HLA-DMA, observamos que somente a amostra KRC não está em equilíbrio. Quanto a HLA-G, Guaranis e caucasóides estavam em equilíbrio. Para a tribo Kaingang, ao analisarmos separadamente os genótipos deste loco, observamos que G*01011/*01011, G*01011/*0103 e G*0103/*0103 são os responsáveis pelo desvio significativo, sendo que os demais genótipos estão em frequência estatisticamente semelhante à esperada.

O alelo G*0103 é discriminado dos outros por uma única sonda (vide tabela 4 e anexo 8.2). As hibridações foram repetidas várias vezes, alterando-se condições como as descritas para HLA-E, e obtivemos sempre o mesmo padrão de reação. Contudo, uma vez que o sinal obtido com a sonda foi fraco, sugerimos que, assim como HLA-E, esse loco seja analisado por outra metodologia como, por exemplo, PCR-SSP, antes de concluir-se acerca das possíveis causas do desvio com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Testes de homogeneidade mostram que Kaingangues de Rio das Cobras (KRC) são

similares aos Kaingangues de Ivaí (KIV) apenas para o gene HLA-DMB. Para os demais locos estudados, essas populações são heterogêneas.

Quando comparamos Kaingangues e Guaranis, notamos que as duas tribos são bem diferentes entre si, como por exemplo para o loco HLA-G. Observando as frequências dos alelos de HLA-G, vemos que G*0103 é encontrado com frequências acima de 60% em Kaingangues, mas de 1,08% em Guaranis. O alelo G*01012 é o mais freqüente em Guaranis e o menos freqüente em Kaingangues.

Esses dados mostram que existem diferenças significativas entre as duas tribos, corroborando resultados de estudos anteriores dessas populações (PETZL-ERLER *et al.*, 1993 PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; FAUCZ, 1997). Essas tribos apresentam diferenças marcantes também no aspecto cultural e lingüístico. A distância genética é muito grande, principalmente se levarmos em conta que KRC e GRC vivem lado a lado, na mesma reserva, entretanto, a miscigenação é reduzida. Existem também semelhanças como, por exemplo, para os locos HLA-DMA e HLA-DMB os alelos DMA*0101 e DMB*0103 são os mais freqüentes em ambas.

Quando comparamos os resultados das populações indígenas com os de caucasóides, notamos que, para o loco HLA-G, os alelos G*0103 e G*01012 são os mais comuns em Kaingangues e Guaranis, respectivamente, enquanto que, em caucasóides, G*01011 foi o mais encontrado. Diferenças também são notadas com relação a G*0104, o qual é bastante comum em caucasóides (cerca de 20%), mas pouco freqüente em indígenas.

Podemos observar que a variabilidade encontrada em caucasóides foi maior do que a dos indígenas, para os locos HLA-DMA e DMB. Encontramos os quatro alelos HLA-DMA em caucasóides amostra, nos indígenas, apenas dois. O mesmo aconteceu com HLA-DMB,

havendo três alelos em Kaingangues, dois em Guaranis e cinco em caucasóides. Entretanto, os alelos não encontrados em indígenas possuem frequências relativamente baixas em caucasóides. Para o loco HLA-DMA, o alelo *0101, foi o mais freqüente e, para o loco HLA-DMB, o alelo *0101 foi o mais comum em caucasóides e *0103 em indígenas.

Os testes de homogeneidade realizados entre Guaranis e caucasóides e entre Kaingangues e caucasóides mostram que apesar da heterogeneidade para todos os locos, existem mais semelhanças entre Guaranis e caucasóides, que entre esses últimos e Kaingangues.

Podemos concluir que os alelos DMA*0101 e *0102, DMB*0101 e *0103, G*01011, *01012, *0103 e *0104, já estavam no pool gênico das populações fundadoras que deram origem aos ameríndios. Uma questão importante a ser investigada é qual a(s) causa(s) da diferença de frequência de certos alelos, como por exemplo, G*0103, o qual ocorre com frequências acima de 60% em Kaingangues, e possui frequências inferiores a 5% em Guaranis e caucasóides, mas nula em diversas populações estudadas (MORALES *et al.*, 1993; KARHUKORPI *et al.*, 1996). Provavelmente, essas diferenças são causadas por deriva genética, principalmente efeito fundador.

Os resultados obtidos através do teste de Ewens-Watterson de neutralidade mostram que não ocorre vantagem (ou desvantagem) de heterozigotos para nenhum dos locos estudados, com possível exceção de HLA-DMB em KIV.

Uma das hipóteses para a manutenção do polimorfismo dos genes clássicos de classe I e II é de seleção a favor de heterozigotos; a heterozigosidade beneficiaria o indivíduo aumentando sua capacidade de responder a diferentes patógenos. As diferenças entre

indivíduos, devidas ao alto grau de polialelismo e polimorfismo, beneficiariam a população. A molécula HLA-DM não tem a função de apresentar antígenos, mas atua na liberação de CLIP (fragmento da cadeia invariável, portanto não polimórfico). Portanto não há motivos para supor que polimorfismo fosse vantajoso. Quanto aos genes não-clássicos, não há estudos publicados que analisem a heterozigosidade e possível vantagem seletiva.

Não podemos comparar os resultados obtidos em nossas populações com os de outras populações indígenas, pois até o momento não há nenhum estudo publicado. Compararemos os resultados com os obtidos para outras populações caucasóides, o grupo étnico mais estudado até o momento, e para negróides e orientais.

Para o loco HLA-E temos dados de duas amostras de caucasóides, e de negróides, orientais e indianos (Tabela 28). De modo geral, observamos que o alelo E*0101 é o mais comum em todas as populações, seguido por E*0103. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em nossas populações indígenas. Em orientais, E*0104 é o segundo mais freqüente. ARNAIZ-VILLENA *et al.* (1997a) e GOMEZ-CASADO *et al.* (1997) analisaram possíveis desequilíbrios de ligação de HLA-E com HLA-G e HLA-A, mas nenhum desequilíbrio foi encontrado.

Com relação a HLA-G, dispomos de resultados de quatro amostras de caucasóides e uma oriental (Tabela 29). Para este loco, nossa amostra caucasóide e Guarani é muito semelhante às outras populações, sendo os alelos G*01011 e G*01012 sempre os mais comuns. Já em orientais, G*01011 e *0104 são os mais comuns.

Tabela 28. Frequências alélicas (%) de HLA-E em diversas populações.

<i>Alélos</i>	<i>Caucasóides (n=63)</i>	<i>#Caucasóides (n=60)^a</i>	<i>#Caucasóides (n=269)^b</i>	<i>Índios asiáticos (n=35)</i>	<i>Negróides (n=24)</i>	<i>Orientais (n=51)</i>	<i>Guaranis (n=93)</i>	<i>Kaingangues (n=239)</i>
E*0101	26,9	57,1	53,5	49,2	50,0	46,6	37,1	67,3
E*0102	nt	5,1	4,9	0,0	0,0	2,7	nt	nt
♦E*0103	35,9	40,1	32,6	26,3	20,9	25,8	31,6	5,9
E*01031	10,1	6,0	nt	nt	nt	nt	2,7	4,0
E*01032	25,8	34,1	nt	nt	nt	nt	28,9	1,9
E*0104	0,0	0,0	7,8	18,9	18,3	30,9	0,0	0,0
E blank	29,2	nd	nd	nd	nd	nd	31,3	26,8
E*0101 ou *01031	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>AUTORES</i>	presente trabalho	♦GOMEZ- CASADO <i>et al.</i> (1997)	♦ARNAIZ- VILLENNA <i>et al.</i> (1997a)	♦ARNAIZ- VILLENNA <i>et al.</i> (1997a)	♦ARNAIZ- VILLENNA <i>et al.</i> (1997a)	♦ARNAIZ- VILLENNA <i>et al.</i> (1997a)	presente trabalho	presente trabalho

n = número total de indivíduos.

nt = não testado

nd = não definido

#^a = espanhóis#^b = espanhóis, italianos, húngaros, franceses e dinamarqueses.

♦E*0103 inclui os alelos E*01031 e E*01032.

♣ = frequências fenotípicas publicadas foram por nós utilizadas para o cálculo de frequências alélicas, através da fórmula de Bernstein.

Tabela 29. Frequências alélicas (%) de HLA-G em diversas populações.

<i>Alelos</i>	<i>Caucasóides</i> (n=63)	<i>#Caucasóides</i> (n=121) ^a	<i>#Caucasóides</i> (n=97) ^b	<i>#Caucasóides</i> (n=114) ^c	<i>#Caucasóides</i> (n=105) ^d	<i>Orientais</i> (n=103)	<i>Guaranis</i> (n=93)	<i>Kaingangues</i> (n=239)
G*01011	47,6	55,0	57,7	51,3	49,2	31,7	47,8	27,4
G*01012	23,0	38,0	37,5	25,1	36,0	15,8	50,00	5,4
G*01013	5,6	7,0	4,8	7,3	5,9	15,8	0,0	1,3
G*0102	0,0	nt	nt	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G*0103	4,0	0,0	0	0,0	1,9	0,0	1,1	60,5
G*0104	19,8	nt*	nt*	11,2	12,7	30,3	1,1	5,4
G*0105N	nt	nt	nt	3,1	nt	nt	nt	nt
<i>AUTORES</i>	presente trabalho	MORALES <i>et al.</i> (1993)	KARHUKORPI <i>et al.</i> (1996)	*SUÁREZ <i>et al.</i> (1997)	*ARNAIZ- VILLENA <i>et al.</i> (1997b)	*ARNAIZ- VILLENA <i>et al.</i> (1997b)	presente trabalho	presente trabalho

n = número total de indivíduos.

nt = não testado.

nt* = nos trabalhos onde G*0104 não foi testado, a frequência de G*01012 pode corresponder à frequência acumulada de *01012 + *0104.

#^a = espanhóis.#^b = finlandeses.#^c = espanhóis.#^d = espanhóis, italianos, húngaros, franceses e dinamarqueses.

* = frequências fenotípicas publicadas foram por nós utilizadas para o cálculo de frequências alélicas, através da fórmula de Bernstein.

MORALES *et al.* (1993) encontraram associações do alelo G*01011 com A2, A3, e A31. O alelo G*01012 foi encontrado associado com A23 e A24 e G*01013 com A11. KARHUKORPI *et al.* (1996) detectaram associações entre G*01011-A2 e G*01011-A3, G*01012-A1, G*01012-A19 e G*01012-A28 e G*01013-A11. ARNAIZ-VILLENA *et al.* (1997b) encontraram associações para G*01011-A2; G*01013-A11 e G*0104-A24.

Observamos que algumas associações encontradas em nossas populações indígenas são as mesmas nas populações caucasóides citadas, como por exemplo: G*01013-A11 (desequilíbrio não significativo) e G*01011-A2 em Kaingangues, G*01011-A31 e G*01011-A2 em Guaranis. Provavelmente esses haplótipos são antigos, já existindo nas populações fundadoras da América (com exceção para G*01013-A11, o qual provavelmente foi inserido na tribo Kaingang por miscigenação com neo-brasileiros). Ainda em nossa amostra, observamos que o haplótipo G*01012-A28 está em desequilíbrio de ligação positivo em Guaranis; em Kaingangues, G*0103-A31, sendo que este haplótipo não foi descrito em nenhuma população, provavelmente porque alelo G*0103 não é comum em outras populações, e é o mais freqüente em Kaingangues, juntamente com A2 e A31.

Para haplótipos HLA-G-C-B, até o presente nenhum estudo foi publicado mencionando desequilíbrios entre esses locos. Nesse trabalho encontramos acentuado desequilíbrio de ligação positivo entre G*01011-Cw3-B62 em Guaranis e, em Kaingangues, G*01011-Cw1-B51.

Para o loco HLA-DMA, quatro amostras de caucasóides e duas de orientais foram estudadas (Tabela 30). Comparando nossa amostra caucasóide com as populações mencionadas acima, notamos que DMA*0101 é o mais freqüente em todas as populações, seguido de *0102. Os alelos DMA*0103 e *0104 sempre apresentaram freqüências baixas. Em orientais, assim como em Guaranis e Kaingangues, somente os alelos *0101 e *0102 foram encontrados.

Tabela 30. Frequências alélicas (%) de HLA-DMA em diversas populações.

<i>Alelos</i>	<i>Caucasóides</i> (n=63)	<i>#Caucasóides</i> (n=90) ^a	<i>#Caucasóides</i> (n=162) ^b	<i>#Caucasóides</i> (n=118) ^c	<i>#Caucasóides</i> (n=190) ^d	<i>Orientais</i> (n=95)	<i>Orientais</i> (n=52)	<i>Guaranis</i> (n=93)	<i>Kaingangues</i> (n=239)
DMA*0101	83,3	84,0	85,5	83,0	85,8	85,5	89,4	82,8	73,4
DMA*0102	11,9	10,0	11,1	11,0	7,9	15,4	10,6	17,2	26,6
DMA*0103	2,4	3,0	3,0	4,0	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0
DMA*0104	2,4	3,0	0,4	2,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>AUTORES</i>	presente trabalho	CARRINGTON HARDING (1994)	DILALI- SAIAH et al. (1996a)	TEISSERENC et al. (1997)	BRUENNER E ALBERT (1997)	♣ISHIHARA et al. (1996)	KUWATA et al. (1996)	presente trabalho	presente trabalho

n = número total de indivíduos.

#^a = franceses.#^b = franceses.#^c = provavelmente franceses e alemães.#^d = alemães.

♣ = frequências fenotípicas publicadas foram por nós utilizadas para o cálculo de frequências alélicas, através da fórmula de Bernstein.

DJILALI-SAIAH *et al.* (1996a) analisaram possíveis desequilíbrios de ligação entre DMA e DPB1, TAP1, LMP2, DRB1, mas nenhum desequilíbrio significativo foi encontrado. TEISSERENC *et al.* (1997) observaram desequilíbrio de ligação para HLA-DMA*0103-TAP1*0201 e HLA-DMA*0103-TAP2*C. BRUENNLER e ALBERT (1997) analisaram os locos DMA, DR/DQ e DP, e encontraram os seguintes haplótipos em desequilíbrio de ligação: DMA*0101-DMB*0103; DMA*0103-DRB1*1101; DMA*0102-DQA1*0201-DQB1*0201 e DMA*0101-DPB1*1301. ISHIHARA *et al.* (1996) analisaram possíveis desequilíbrios entre DMA e DRB1, DQA1, DQB1 e DPB1, mas nenhum desequilíbrio significativo foi observado.

Analisamos as frequências haplotípicas de HLA-DMA e vários outros locos de classe II para a amostra de caucasóides e também nas populações indígenas. Encontramos forte desequilíbrio entre DMA*0102 e DMB*0101 em Guaranis e Kaingangues. Em Kaingangues também encontramos em desequilíbrio o seguinte haplótipo: DMA*0101-DMB*0103. Em caucasóides, somente uma associação foi encontrada: DMA*0101-DMB*NEW, a qual foi absoluta. Essa mesma associação foi descrita por DJILALI-SAIAH *et al.* (1996a), também em caucasóides.

Em nossa amostra de caucasóides nenhum desequilíbrio de ligação entre os genes DMA com TAP1, TAP2, LMP2 ou LMP7 foi observado. Nos indígenas, encontramos desequilíbrio no haplótipo DMA*0102-TAP1*0101 em Guaranis. Em Kaingangues, DMA*0102-TAP1*0201. Nenhuma associação significativa entre DMA e TAP2 foi encontrada entre os Guaranis, mas, em Kaingangues, encontramos desequilíbrios para DMA*0102-TAP2*D e DMA*0102-TAP2*0201 (embora pouco acentuado)

Foi observado em Kaingangues desequilíbrio significativo entre DMA*0102-LMP2*H. Em Guaranis, LMP2 é monomórfico. Com relação DMA-LMP7, observamos que os haplótipos DMA*0102-LMP7*A e DMA*0101-LMP7*B estão em desequilíbrio positivo, em

Guaranis e Kaingangues, respectivamente. Aqui também foram encontrados nos ameríndios desequilíbrios de ligação não vistos em outras populações, sugerindo efeito da deriva genética.

Analizamos os haplótipos DMA-DRA-DR-DQ nas populações indígenas. O desequilíbrio desse haplótipo pode ser inferido a partir de dados isolados, como por exemplo: desequilíbrio entre DMA*0102-DRA*0101 e DMA*0101-DRA*0102; associação entre DRA*0101 com DR2, o qual apresenta associação absoluta com DQ3; associação absoluta entre DRA*0102 com DR8-DQ4 (a análise de associação entre DR e DQ foi realizada por PETZL-ERLER *et al.*, 1993). Observamos em Kaingangues que os haplótipos DMA*0101-DRA*0102-DR8-DQ4 e DMA*0102-DRA*0101-DR2-DQ3 apresentam desequilíbrio de ligação. Na tribo Guaraní, notamos o haplótipo DMA*0102-DRA*0102-DR8-DQ4, também a partir de inferências de dados isolados; embora nenhum desequilíbrio tenha sido detectado entre DMA e DRA, a associação entre DMA*0102 e DR8 nos indica que o alelo DRA*0102 seja o alelo presente neste haplótipo, devido à sua associação absoluta com DR8.

Para HLA-DMA, -DPA1 e DPB1, observamos em desequilíbrio de ligação o haplótipo DMA*0101-DPA1*01-DPB1*0402 em Kaingangues, e DMA*0102-DPA1*0201-DPB1*1401 em Guaranis.

Para o loco HLA-DMB, dispomos de dados de quatro amostras de caucasóides e de quatro de orientais. As comparações entre as amostras de caucasóides mostram grande semelhança, sendo que os alelos *0101 e *0103 são sempre os mais frequentes. Os alelos *0102 e *0104 ocorrem com frequência reduzida (5% em média). Em orientais, de modo geral, *0101 e *0103 são os mais comuns, o alelo *0104 é inexistente (com exceção para a amostra estudada por NARUSE *et al.*, 1996). Nesse grupo étnico o alelo *0102 apresenta frequências de 15% a 30%.

Tabela 31. Frequências alélicas (%) de HLA-DMB em diversas populações.

<i>Alélos</i>	<i>Caucasóides</i> (n=63)	<i>#Caucasóides</i> (n=200) ^a	<i>#Caucasóides</i> (n=162) ^b	<i>#Caucasóides</i> (n=118) ^c	<i>#Caucasóides</i> (n=190) ^d	<i>Orientais</i> (n=144)	<i>Orientais</i> (n=95)	<i>Orientais</i> (n=234)	<i>Orientais</i> (n=52)	<i>Guaranis</i> (n=93)	<i>Kaingangues</i> (n=239)
DMB*0101	82,5	77,2	73,5	70,0	79,6	49,3	54,06	46,5	50,0	40,9	47,1
DMB*0102	7,2	3,0	3,0	1,0	2,0	23,2	18,58	15,4	27,9	0,0	0,0
DMB*0103	7,2	18,3	16,5	25,0	17,1	23,2	23,91	38,1	22,1	59,1	52,7
DMB*0104	0,0	1,5	3,0	4,0	1,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
DMB*0105	0,8	nt	nt	nt	nt	0,0	nt	nt	nt	0,0	0,0
DMB*NEW	2,3	nt	4,0	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0,0	0,0
AUTORES	presente trabalho	CARRINGTON <i>et al.</i> (1993)	DJILALI- SAIAH <i>et al.</i> (1996a)	TEISSERENC <i>et al.</i> (1997)	BRUENNLER ALBERT (1997)	♣NARUSE <i>et al.</i> (1996)	♣ISHIHARA <i>et al.</i> (1996)	KIM <i>et al.</i> (1996)	KUWATA <i>et al.</i> (1996)	presente trabalho	presente trabalho

n = número total de indivíduos.

nt = não testado.

#^a = franceses.#^b = franceses.#^c = provavelmente franceses e alemães.#^d = alemães.

♣ = frequências fenotípicas publicadas foram por nós utilizadas para o cálculo de frequências alélicas, através da fórmula de Bernstein.

CARRINGTON *et al.* (1993) observaram que HLA-DMB está em completo equilíbrio de ligação com TAP1 e TAP2 e somente ocorre um leve desvio positivo entre DMB*0103 e TAP2*C. Além disso, DMB está em equilíbrio com DQA1 e DQB1. HLA-DMB*0101 encontra-se em equilíbrio com alelos DPB1, mas DMB*0102 e *0104 foram encontrados, em alguns casos, em desequilíbrio com alelos DPB1 relativamente raros, como DMB*0104 e DPB1*1101 (a frequência de *1101 foi de 2,3%); DMB*0102 e DPB1*1001 (a frequência de *1001 foi de 0,4%). DJILALI-SAIAH *et al.* (1996a) encontraram desequilíbrio de ligação entre DMB*0103-TAP2*C e DMB*0104-TAP2*C; nenhum desequilíbrio foi encontrado entre DMB e TAP1 ou LMP2, o que está de acordo com a existência de vários pontos quentes de recombinação nessa região. Foram encontradas associações entre DRB1*11-DMB*0102; DRB1*07-DMB*0104, e DRB1*0401-DMB*0101. Para o loco HLA-DQB1, foi encontrada associação entre DQB1*0201-DMB*0104. O alelo DMB*0104 também apresentou associação com DPB1*0101 e DPB1*1101. TEISSERENC *et al.* (1997) encontraram desequilíbrio de ligação entre DMB*0101 e TAP2*0102. BRUENNLER e ALBERT (1997) observaram desequilíbrio de ligação entre DMB*0103 e DPB1*0401 e entre DMB*0101 e DPB1*1101. NARUSE *et al.* (1996) encontraram forte desequilíbrio de ligação entre DMB*0101 com DRB1*0101, DPB1*0402, *1502, DQB1*0601 e DPB1*0901. O alelo DMB*0103 também está significativamente associado com DRB1*1501 e DQB1*0602.

Analisamos possíveis desequilíbrios de ligação entre HLA-DMB e vários outros locos, para a amostra de caucasóides e também nas populações indígenas. Entre os haplótipos HLA-DMB com TAP1, TAP2, LMP2 ou LMP7 encontrados em caucasóides, todos estavam em equilíbrio. Nas populações indígenas, observamos desequilíbrio entre DMB*0101-TAP1*0101 e DMB*0101-TAP1*0201 em Guaranis e Kaingangues, respectivamente. Entre DMB-TAP2, observamos os haplótipos DMB*0101-TAP2*0101 e DMB*0103-TAP2*0102 em Guaranis e

DMB*0101-TAP2*0201 e DMB*0103-TAP2*D em Kaingangues. Para LMP7, foi observado desequilíbrio entre DMB*0101 e LMP7*B, DMB*0103 e LMP7*A, sendo as diferenças entre frequência observada e esperada muito acentuadas, em comparação com Guaranis, onde DMB*0101-LMP7*A apresentou um leve desequilíbrio positivo. A existência de desequilíbrio entre genes localizados em pontos quentes de recombinação, somente na nossa amostra de ameríndios é sugestiva de atuação de fatores evolutivos estocásticos, provavelmente deriva genética.

Ao analisarmos os haplótipos DMB-DRA-DR-DQ nas populações indígenas, observamos que os haplótipos DMB*0101-DRA*0102-DR8-DQ4 e DMB*0103-DRA*0102-DR8-DQ4 em Guaranis e DMB*0101-DRA*0101-DR2-DQ3 em Kaingangues estão em desequilíbrio. A presença de desequilíbrio desse haplótipo estendido pode ser inferida a partir de dados isolados, como por exemplo, desequilíbrio entre DMB*0101-DRA*0102; associação entre DRA*0102 e DR8, sendo que DR8 encontra-se associado com DQ4, e de DRA*0101 com DR2 (embora não haja desvio significativo entre DMB*0101 e DRA*0101, inferimos que seja DRA*0101 o alelo presente, devido à sua associação com DR2).

Para HLA-DMB-DPA1-DPB1, foi encontrado desequilíbrio entre DMB*0103-DPA1*01-DPB1*0401, em Guaranis. Em Kaingangues, encontramos desequilíbrio entre DMB*0101-DPA1*01-DPB1*0402. O alelo DMB*0103 foi encontrado associado a DPA1*0201-DPB1*0901 e DPA1*01-DPB1*0402, sendo que este último também foi observado em Guaranis, embora apresentando desequilíbrio pouco acentuado. As associações de DMB*0101 e *0103 com os alelos DPB1*0401, *0402 e *0901 foram observadas também em outras populações (CARRINGTON *et al.*, 1993; BRUENNLER e ALBERT, 1997).

De maneira geral, observamos que as diferenças entre as frequências observadas e esperadas para os pares de locos G-B-C, DMA e TAP1, LMP7, DRA, DR; DMB e TAP1, TAP2, LMP7, DRA, DR seguem direções opostas entre Kaingangues e Guaranis: um determinado haplótipo apresenta um desvio positivo (frequência observada do haplótipo é maior que a esperada) em uma tribo, e o mesmo haplótipo apresenta desvio negativo (frequência esperada do haplótipo é maior que a observada) na outra tribo. Para os locos DMA-DMB e desses com DPA1-DPB1, observa-se que os desvios estão na mesma direção.

Os resultados levam-nos a sugerir que as diferenças entre associações e haplótipos encontrados entre os grupos étnicos, provavelmente são causadas pelo efeito da deriva genética, apesar de co-evolução por seleção natural não poder ser excluída, como causa do desequilíbrio.

Com relação à geração dos alelos de genes não-clássicos, pode-se dizer através da análise das seqüências dos seus alelos, que o principal mecanismo envolvido é a mutação de ponto. Essas populações não apresentam alelos novos de HLA-E, HLA-G, HLA-DMA e HLA-DMB ao contrário do que foi observado para HLA-B e HLA-DRB1 nas populações indígenas. Não podemos dizer que estes genes possuem diferentes taxas de mutação, quando comparados com HLA-B e HLA-DRB1, por possivelmente apresentarem mecanismos de geração de alelos distintos, visto que para esses locos, a conversão gênica é o principal mecanismo de geração de novos alelos.

Possivelmente as diferenças do grau de variabilidade encontrada entre genes clássicos e não-clássicos, menor para os últimos, esteja relacionada à diferença de função entre esses genes. Com relação à manutenção do polimorfismo destes genes, pouco se sabe a respeito. Para os genes clássicos a causa mais provável do elevado grau de polimorfismo é a vantagem

do heterozigoto. Para os genes analisados aqui, não há evidências de vantagem dos heterozigotos, inclusive observamos muitas vezes um aumento de homozigotos, embora não significativo.

Seriam necessários estudos de diversidade alélica de genes não-clássicos em mais populações, tanto populações isoladas como outras populações miscigenadas. Podemos concluir com os resultados obtidos neste trabalho que as populações aqui estudadas apresentam diferenças significativas entre si e com respeito a outras populações, e esperamos que futuramente este trabalho contribua para a elucidação de questões evolutivas sobre os genes não-clássicos.

7. CONCLUSÃO

O estudo do polimorfismo de genes HLA não-clássicos nas tribos indígenas Kaingang e Guarani, e em caucasóides pertencentes ao estado do Paraná mostram que o número de alelos é inferior nas populações indígenas para os locos HLA-DMA e HLA-DMB; foram encontrados apenas dois alelos para cada loco (DMA*0101, DMA*0102, DMB*0101 e DMB*0103). Em caucasóides, observamos os quatro alelos DMA descritos e cinco para HLA-DMB. Para o loco HLA-E, identificamos os seguintes alelos *0101, *01031, *01032 e blank em todas as populações estudadas. Para HLA-G, observamos os alelos *01011, *01012, *01013, *0103 e *0104, em indígenas e caucasóides, sendo que o alelo *01013 somente foi observado em Kaingangues. Os alelos DMB*0104 e G*01013 encontrados na tribo Kaingang, inseridos em haplótipos não indígenas, nos leva a sugerir que surgiram nessa população através de miscigenação com neo-brasileiros. Não há evidências de alelos novos para nenhum dos locos analisados. As diferenças do grau de polimorfismo entre genes clássicos e não-clássicos mostra a importância menor de polimorfismo para os últimos, relacionando o polimorfismo com a função do gene.

As análises de desequilíbrio de ligação entre os genes de classe I revelam que ocorre desequilíbrio entre HLA-G e HLA-A, HLA-G e HLA-B-C nas duas tribos indígenas. Para os locos de classe II, constatamos desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e DMB, TAP1, LMP7, DR e DP em Guaranis. Em Kaingangues, ocorre desequilíbrio entre os alelos do loco HLA-DMA e os de DMB, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, DRA, DR e DP. Para o loco HLA-DMB, observamos desequilíbrio com TAP1, TAP2, DRA, DR e DP nas duas tribos e ainda com LMP2 e LMP7 em Kaingang. Em caucasóides, realizamos análises de desequilíbrio de ligação entre HLA-DMA e HLA-DMB e os genes TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7, e

constatamos que são poucos os exemplos de desequilíbrio nesse grupo étnico, para o conjunto de genes analisados.

As claras diferenças dos padrões de desequilíbrio entre caucasóides e ameríndios, bem como diferenças entre as duas tribos indígenas, quanto aos pares de alelos em desequilíbrio, e a intensidade destes, mostram a importância da deriva genética na evolução haplotípica do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

Continuação

	80										90										Intron 2									
E*0101	GCA	CAG	ATT	TTC	CGA	GTG	AAC	CTG	CGG	ACG	CTG	CGC	CGC	TAC	TAC	AAT	CAG	AGC	GAG	GCC	ggt	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-gt	gag	tga	ccc	egg	cca	gga	---	---	---
E*01031	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*01032	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*0104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*0101	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0102	gca	ggt	cac	gac	ccc	tcc	cca	tcc	ccc	acg	gac	ggc	ggc	ggt	ccc	ctc	gaa	tct	tgc	ggt	ccc	aga	ttc	acc	cca	agg	ctg	---	---	---
E*01031	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*01032	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0104	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0101	aac	ccg	ccc	aag	ctt	act	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0102	aac	ccg	ccc	aga	ccc	tag	acc	ggg	gag	agt	ctc	agg	cgc	ctt	tac	ccg	gtt	ctt	ttt	cag	ttt	agg	cca	aaa	tgc	cca	cag	---	---	---
E*01031	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*01032	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0104	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0101	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0102	ggt	ggt	ggc	gac	ggg	ggc	ggg	gct	tgg	tgg	gga	ctg	act	agg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg	ggg
E*01031	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*01032	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0104	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
E*0101	CAT	GGC	TGC	GAG	CTG	GGG	CCC	GAC	AGG	CGC	CTC	CGC	GGG	TAT	GAA	CAG	TTC	GCC	TAC	GAC	GGC	AAG	GAT	TAT	CTC	ACC	---	---	---	---
E*0102	***	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*01031	***	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*01032	***	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*0104	***	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*0101	CTG	AAT	GAG	GAC	CTG	CGC	TCC	TGG	ACC	GCG	GTG	GAC	ACG	GCT	CAG	ATC	TCC	GAG	CAA	AAG	TCA	AAT	GAT	GCC	TCT	GAG	---	---	---	---
E*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*01031	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*01032	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E*0104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Exon 3

Continuação															
160															
E*0101	GCG GAG	CAC CAG AGA GCC TAC	CTG GAA GAC ACA TGC GTG GAG TGG CTC CAC AAA	TAC	CTG GAG AAG GGG AAG GAG ACG	CTG									
E*0102	---	---	---	---	---	---									
E*01031	---	---	---	---	---	---									
E*01032	---	---	---	---	---	---									
E*0104	---	---	---	---	---	---									
170															

Continuação

DMA*0101	CTG	ACA	GTG	AAC	TGG	CAG	CAT	CAT	TCC	GTC	CCT	GTG	GAA	GGA	TTT	GGG	CCT	ACT	TTT	GTC	TCA	GCT	GTC	GAT	GGA	CTC	
DMA*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0103	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	140										150										160						
DMA*0101	AGC	TTC	CAG	GCC	TTT	TCT	TAC	TTA	AAC	TTC	ACA	CCA	GAA	GAA	CCT	TCT	GAC	ATT	TTC	TCC	TGC	ATT	GTG	ACT	CAC	GAA	ATT
DMA*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0103	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	160										170										180						
DMA*0101	GAC	CGC	TAC	ACA	GCA	ATT	GCC	TAT	TGG	GTA	CCC	CGG	AAC	GCA	CTG	CCC	TCA	GAT	CTG	CTG	GAG	AAT	GTG	ACT	CAC	GAA	ATT
DMA*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0103	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	190										200										210						
DMA*0101	GTG	GCC	TTT	GGC	CTG	GGT	GTG	GTG	CTG	GGC	ATC	ATC	GTG	GGC	ATT	GTT	CTC	ATC	ATC	TTC	CGG	AAG	---	---	---	---	
DMA*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0103	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	220										230										240						
DMA*0101	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0102	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0103	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DMA*0104	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

Iniciador DMA35'

S3

S6

S1

S4

S7

S2

S5

Iniciador DMA33'

SEQÜÊNCIAS DOS ALELOS HLA-DMB, COM INDICAÇÃO DAS POSIÇÕES CORRESPONDENTES AOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E OLIGONUCLEOTÍDEOS-SONDA-SEQÜÊNCIA-ESPECÍFICOS (SSO). Os hífen (-) indicam a repetição da base da primeira seqüência. Os asteriscos (*) indicam posições não seqüenciadas. Os números sobre as seqüências indicam o número do códon.

111

continuação

	110	120	130
DMB*0101	ACT CCT TTT AAC ACG AGG GAG CCT GTG ATG CTG GCC TGC TAT GTG TGG GGC TTC TAT CCA GCA GAA GTG ACT ATC ACG		
DMB*0102	---	---	---
DMB*0103	---	---	---
DMB*0104	---	---	---
DMB*0105	---	---	---
DMB*NEW	---	---	---
	140	150	160
DMB*0101	TGG AGG AAG AAC GGG AAG CTT GTC ATG CCT CAC AGC AGT GCG CAC AAG ACT GCC CAG CCC AAT GGA GAC TGG ACA TAC		
DMB*0102	---	---	---
DMB*0103	---	---	---
DMB*0104	---	---	---
DMB*0105	---	---	---
DMB*NEW	---	---	---
	170	180	190
DMB*0101	CAG ACC CTC TCC CAT TTA GCC TTA ACC CCC TCT TAC GGG GAC ACT TAC ACC TGT GTG GTA GAG CAC ATT GGG GCT CCT		
DMB*0102	---	---	---
DMB*0103	---	---	---
DMB*0104	---	---	---
DMB*0105	---	---	---
DMB*NEW	---	---	---
	200	210	220
DMB*0101	GAG CCC ATC CPT GGG GAC TGG ACA CCT GGG CTG TCC TAC GGG ATG CAG ACC CTG AAG GTT TCT GTG TCT GCA GTG ACT CTG		
DMB*0102	---	---	---
DMB*0103	---	---	---
DMB*0104	---	---	---
DMB*0105	---	---	---
DMB*NEW	---	---	---
	230	240	250
DMB*0101	GGC CTG GGC CTC ATC ATC TTC TCT CTT GGT GTG ATC AGC TGG CGG AGA GCT GGC CAC TCT AGT TAC ACT CCT CTT CCT		
DMB*0102	---	---	---
DMB*0103	---	---	---
DMB*0104	---	---	---
DMB*0105	---	---	---
DMB*NEW	---	---	---

V2

V3

V4



V5



Iniciador DMB33'

Continuação

240

DMB*0101	GGG	TCC	AAT	TAT	TCA	GAA
DMB*0102	***	***	***	***	***	***
DMB*0103	***	***	***	***	***	***
DMB*0104	***	***	***	***	***	***
DMB*0105	***	***	***	***	***	***
DMB*NEW	***	***	***	***	***	***



Iniciador DMB25'



Iniciador DMB23'



V6



Iniciador DMB35'



V7



V1



8.5. FENÓTIPOS DE TODOS OS INDIVÍDUOS

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
KIV 001	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KIV 002	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KIV 003	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KIV 004	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 005	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 006	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KIV 007	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 008	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 009	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 010	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 011	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KIV 012	0101	0103/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 013	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 014	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 015	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 016	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 017	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 018	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 019	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 020	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0101
KIV 021	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0101
KIV 022	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 023	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 024	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 025	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 026	0101	01012/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 027	0101	01012/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 028	0101/01031	01012/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 029	0101	0103/0104	0101/0101	0103/0103
KIV 030	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 031	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 032	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 033	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
KIV 034	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
KIV 035	0101	01012/0103	0102/0102	0101/0101
KIV 036	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 037	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KIV 038	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 039	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 040	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 041	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
KIV 042	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 043	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 044	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 045	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103

Continuação

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
KIV 046	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0101
KIV 047	0101/01031	0103/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 048	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 049	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 050	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0101
KIV 051	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 052	01031	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KIV 053	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 054	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 055	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 056	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 057	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 058	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 059	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 060	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 061	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 062	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KIV 063	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 064	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 065	01031	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KIV 066	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 067	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 068	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 069	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 070	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KIV 071	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 072	0101	01011/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 073	0101	01011/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 074	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 075	0101	01011/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 076	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KIV 077	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 078	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 079	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 080	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 081	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 082	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 083	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 084	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 085	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 086	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
KIV 087	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 088	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 089	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KIV 090	01031	0103/0103	0102/0101	0101/0101
KIV 091	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 092	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 093	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 094	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0101

Continuação

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
KIV 095	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 096	01031/01032	01012/01012	0101/0102	0101/0101
KIV 097	0101	01011/0104	0101/0101	0103/0103
KIV 098	0101	0103/0104	0101/0101	0103/0103
KIV 099	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 100	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 101	0101/01031	01012/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 102	0101	01011/0104	0101/0101	0101/0101
KIV 103	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 104	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 105	0101	01012/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 106	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KIV 107	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 108	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
KIV 109	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KIV 110	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 111	0101	01012/0104	0101/0101	0101/0101
KIV 112	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 113	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 114	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 115	0101	0103/0104	0101/0101	0101/0103
KIV 116	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 117	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 118	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 119	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 120	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
KIV 121	01031	01011/01012	0101/0102	0101/0103
KIV 122	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 123	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KIV 124	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 125	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KIV 126	0101	0103/0104	0101/0102	0101/0103
KIV 127	01031	0103/0103	0101/0101	0101/0101
KIV 128	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KIV 129	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 130	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KIV 131	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 001	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 002	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
KRC 003	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 004	01032	01011/01011	0101/0101	0101/0101
KRC 005	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 006A	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 007	01032	01011/0104	0101/0102	0101/0103
KRC 008	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 009	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 010	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 011	0101	01011/0104	0101/0101	0101/0103
KRC 012	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0101

Continuação

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
KRC 013	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 014	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 015	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 016	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0103
KRC 017	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 018	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0101
KRC 019	0101	01013/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 020	0101	01012/0104	0101/0101	0101/0101
KRC 021	0101	01011/01013	0101/0102	0101/0103
KRC 022	0101	01011/01011	0102/0102	0101/0101
KRC 024	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 025	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 026	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KRC 028	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 029	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 030	0101	01011/0104	0101/0101	0101/0103
KRC 031	0101	0103/01013	0101/0102	0101/0103
KRC 032	0101	01012/0104	0101/0101	0103/0103
KRC 033	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 034	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 035	0101	0103/0104	0102/0102	0101/0101
KRC 036	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 038	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 039	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 040	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 041	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
KRC 042	01032	01011/01011	0101/0102	0101/0101
KRC 043	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KRC 044	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
KRC 045	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 046	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KRC 047	0101	0103/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 049	0101	0103/0104	0101/0101	0103/0103
KRC 050	0101/01032	01012/01011	0101/0101	0101/0103
KRC 051	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 052	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 053	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 054	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 055	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 057A	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
KRC 058	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 059	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 060	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 061	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 062	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 063	01031	01012/01012	0101/0101	0101/0103
KRC 064	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 065	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 066	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0103

Continuação

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
KRC 067	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 068	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 069	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 070	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 071	0101	0103/0104	0101/0102	0101/0103
KRC 072	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 073	0101	01011/0103	0101/0101	0103/0103
KRC 074	0101	0103/0103	0102/0102	0101/0101
KRC 075	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 076	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 077	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 078	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 079	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 080	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 081	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 082	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 083	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 084	01031	0103/0103	0102/0102	0101/0103
KRC 085	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 086	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0104
KRC 087	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 088	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 089	01032	01011/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 090	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 092	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
KRC 093	0101	01012/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 094	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 095	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 096	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 097	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 098	0101	01013/0104	0101/0101	0103/0103
KRC 099	0101	01011/0103	0101/0102	0103/0103
KRC 100	01031	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 101	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 102	0101	0104/0103	0101/0101	0101/0103
KRC 103	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0101
KRC 104	0101	0103/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 105	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 106	0101	01012/0104	0101/0102	0101/0103
KRC 107	0101	01011/0104	0101/0101	0103/0103
KRC 108	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 109	0101	01013/0103	0101/0102	0101/0103
KRC 111	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
KRC 112	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
KRC 113	01032	01013/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 163 (KRC)	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 164 (KRC)	0101	01011/0103	0101/0102	0101/0101
GRC 131	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0101
GRC 132	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0103

Continuação

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
GRC 133	01031	01011/01011	0101/0102	0101/0103
GRC 134	0101	01012/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 135	0101	0103/0103	0101/0101	0103/0103
GRC 136	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 137	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 138	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 139	0101	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 140	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 141	0101	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 142	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 143	0101/01032	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 144	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 145	0101	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 146	01032	01012/0104	0101/0101	0103/0103
GRC 147	01032	01012/0104	0101/0101	0103/0103
GRC 148	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 149	0101	01012/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 150	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
GRC 151	0101	01012/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 152	0101	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 153	0101	01012/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 154	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
GRC 155	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 157	0101	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 158	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 159	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 160	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 161	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 162	0101	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 165	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 166	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
GRC 167	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 168	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
GRC 169	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 170	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
GRC 171	0101	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 172	0101	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 173	01032	01012/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 174	01032	01011/01011	0101/0102	0101/0103
GRC 177-A	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 177-B	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 178	01032	01012/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 179	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 180	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 181	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
GRC 182	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 184	01031	01011/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 185	01032	01012/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 186	01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103

Continuação

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
GRC 187	0101	01012/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 188	01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 189	01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 190	0101	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 191	0101/01032	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 192	0101	01011/01012	0101/0102	0101/0101
GRC 193	0101	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 194	01031/01032	01012/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 195	0101/01032	01011/01012	0102/0102	0101/0101
GRC 196	0101	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 198	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 199	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0101
GRC 200	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
GRC 201	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 202	01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 203	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 204	01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 205	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 206	0101/01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 207	0101	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 208	0101	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 209	01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 210	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 211	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 212	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 213	01032	01012/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 214	01032	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 215	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 216	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
GRC 217	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 218	01031	01011/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 219	01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 221	0101/01031	01011/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 222	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0103
GRC 223	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 225	01032	01012/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 226	0101	01012/01012	0101/0101	0103/0103
GRC 227	01032	01012/01012	0101/0102	0101/0103
GRC 228	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
GRC 229	0101	01011/01011	0101/0101	0103/0103
GRC 230	01032	01011/01011	0102/0102	0101/0101
GRC 231	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0101

KIV = Kaingangues de Ivaí.

KRC = Kaingangues de Rio das Cobras

GRC = Guaranis de Rio das Cobras

Continuação: Caucasoídes

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
01 AAF	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0101
02 ACC	01031/01032	01011/01012	0101/0101	0101/0101
96 ALS	01031	01011/01011	0101/0101	0101/0103
03 AQU	01032	01011/01011	0101/0101	0101/0101
76 AVA	01032	01011/01011	0101/0101	0101/0103
06 CFA	01031	0104/0104	0101/0101	0101/0101
09 CPA	0101	01011/0104	0101/0102	0101/0101
97 CRB	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0101
12 CSA	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0101
90 DAM	01032	01011/0104	0101/0102	0101/0101
13 EFM	0101	0103/0104	0101/0101	0101/0101
14 EMB	01032/0101 ou 01031	01011/01011	0101/0102	0101/0101
91 EPB	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0102
87 EOY	01032	01011/01013	0101/0101	0101/0101
15 ESE	01032/0101 ou 01031	01011/0104	0101/0102	0101/0103
64 FPO	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0101
18 FRF	01032	01011/01011	0101/0101	0101/0101
19 GFF	01032	01011/0104	0101/0101	0101/0101
93 GFS	0101	01012/0103	0101/0102	0101/0101
85 LLI	01032	01011/0104	0101/0101	0101/0101
22 ISB	01032	0104/0104	0101/0101	0101/0101
24 JCM	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0101
25 JFF	0101	01012/0104	0101/0101	0101/0101
88 JMD	01032/0101 ou 01031	01011/01011	0101/0101	0101/0102
26 JML	0101	0104/0104	0101/0102	0101/0101
61 JRF	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0105
80 JSI	0101	01013/01013	0101/0101	0101/0101
92 JSS	01032	01011/01011	0101/0102	0101/0101
27 JWM	01031	01011/0104	0101/0101	0101/0101
74 KAB	01031	01012/0104	0101/0102	0101/0101
28 LAF	0101	01012/0104	0101/0101	0101/0103
31 LCU	01032/0101 ou 01031	01012/01012	0101/0101	0101/0101
84 LMS	01031	01011/01012	0101/0101	0101/0101
33 LPN	0101	01011/0103	0101/0101	0101/0102
LP 71	0101	01011/01012	0101/0104	0101/0101
34 LTR	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0101
37 MBL	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0102
38 MBO	01032	01011/0112	0101/0104	0101/0102
39 MCD	01032/0101 ou 01031	01011/0104	0101/0101	0101/0101
40 MFR	0101	01012/0104	0101/0103	0101/new
43 MLP	0101/01032	01012/0104	0101/0102	0101/0103
44 MMB	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0101
45 MME	01031	01012/01012	0101/0102	0101/0101
46 MMI	01032	01011/01011	0101/0101	0101/0102
62 MOJ	0101	01011/01013	0101/0101	0101/0101
48 MRS	0101	01011/0104	0101/0101	0101/0101

Continuação

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
47 MPI	01032/0101 ou 01031	01011/01011	0101/0103	0101/new
49 MSC	01032	01011/01012	0101/0101	0101/0101
50 MSP	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0101
94 NTR	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0101
82 OPA	01032	01011/0104	0101/0101	0101/0101
51 PCM	0101	01011/01012	0101/0101	0101/0103
52 PGO	01032/0101 ou 01031	0103/0103	0101/0101	0101/0103
63 PSS	0101	01012/0104	0102/0104	0101/0101
97 RCB	0101	01013/01012	0101/0101	0101/0103
54 RLA	01032	01011/01013	0101/0101	0101/0103
55 RLE	0101	01011/01012	0101/0102	0101/0101
56 RMU	01032/0101 ou 01031	01011/01012	0101/0103	0101/new
89 ROB	0101/01031	01011/0104	0101/0101	0101/0101
57 RPA	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0101
78 SBA	01031	01012/0104	0101/0102	0101/0102
59 SLE	01032/0101 ou 01031	0104/0104	0101/0101	0101/0101
60 SMA	01032/0101 ou 01031	01012/01013	0101/0101	0101/0102

Negróides e Orientais

INDIVÍDUO	HLA-E	HLA-G	HLA-DMA	HLA-DMB
04 CAF	0101	01012/0104	0101/0101	0101/0101
05 CAO	01032	01011/01011	0101/0101	0102/0102
07 CLK	01032/0101 ou 01031	01011/0103	0101/0102	0101/0103
08 CLL	01032/0101 ou 01031	01012/0104	0101/0101	0101/0104
79 CPS	0101	0104/0104	0101/0102	0101/0103
11 CRE	0101/01031	01011/01012	0101/0101	0101/0101
16 ETN	01031	01012/0104	0101/0102	0101/0102
20 HHT	01032	01011/01012	0101/0102	0101/0102
83 IHH	0101	01011/01011	0101/0101	0101/0103
29 LCF	0101/01031	01012/0104	0101/0102	0101/0101
30 LCR	0101	01012/01012	0101/0101	0101/0102
32 LIY	01032/0101 ou 01031	0104/0104	0101/0102	0101/0103
35 LUR	01032	01011/01011	0101/0102	0101/0101
36 MAS	0101	01011/01013	0101/0103	0101/new
41 MKO	01032/0101 ou 01031	01011/01011	0102/0102	0101/0101
42 MLI	01032	01012/01012	0101/0101	0101/0101
77 MOT	0101	01011/0104	0101/0102	0101/0101
75 NPA	0101	01011/01011	0101/0102	0101/0101
53 REK	0101	0104/0104	0101/0101	0101/0103
73 SSI	01032	01012/01012	0101/0102	0101/0101
98 YBA	0101/01031	0104/0104	0101/0101	0102/0103
99 YBB	0101/01032	01011/01012	0101/0101	0103/0103

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. The major histocompatibility complex. In: **Cellular and Molecular Immunology**. 3^a ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1997, 494p.
- ALBERT, E.D. GÖTZE, D. The major histocompatibility system in man. In GÖTZE, D. **The Major Histocompatibility System in Man and Animals**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p.7-10, 1977.
- ALCÂNTARA, V.M.; de LOURENÇO, M.A.C.; SALZANO, F.M.; PETZL-ERLER, M.L.; COIMBRA, C.E.A.Jr.; SANTOS, R.V.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase polymorphisms (BCHE and CHE2 loci) in Brazilian Indian and admixed populations. **Hum. Biol.**, v.67, p.717-726, 1995.
- ALIZADEH, M.; LEGRAS, C.; SEMANA, G.; LE BOUTEILLER, P.; GENETET, B.; FAUCHET, R. Evidence for a polymorphism of HLA-G. **Hum. Immunol.**, v.38, p.206-212, 1993.
- ALVAREZ, M.; MARTINEZ-LASO, J.; VARELA, P.; DIAZ-CAMPOS, N.; GOMEZ-CASADO, E.; VARGAS-ALARCON, G.; GARCIA-TORRE, C.; ARNAIZ-VILLENA, A. High polymorphism of MHC-E locus in non-human primates: alleles with identical exon 2 and 3 are found in two different species. **Tissue Antigens**, v. 49, p.160-167, 1997.
- ____; RECIO, M.J.; MARTINEZ-LASO, J.; PÉREZ-BLAS, M.; GARCIA-DE-LA-TORRE, C.; VARGAS-ALARCON, G.; ALEGRE, R.; GOMEZ-CASADO, E.; ARNAIZ-VILLENA, A. Allelic diversity at the primate MHC-DMB locus: presence of a conserved tyrosine inhibitory motif in the cytoplasmic tail. **Tissue Antigens**, v.51, p.174-182, 1998.

ANAI/PR-ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE APOIO AO ÍNDIO. **Índios do Paraná**, Curitiba, 1983.

ARNAIZ-VILLENA, A.; FAUCHET, R., WEISS, E. 12th IHWG Protocol for HLA-E and G polymorphism. In: **Twelfth International Workshop and Conference - Technical Handbook, 1994.**

____; CHANDANAYINGYONG, D.; CHIEWSILP, P.; DIAZ-CAMPOS, N.; FAN, L.; FAUCHET, R.; FUMIAKI, N.; GUO, S.S.; GYÖDI, E.; HAMMOND, M.; JERSILD, C.; JUJI, T.; LEPAGE, V.; MARTINETTI, M.; MARTINEZ-LASO, J.; MEHRA, N.; PÉNZES, M.; RAJALINGAM, R.; RAJCZY, K.; TOKUNAGA, K. In: CHARRON, D. **HLA - Genetic diversity of HLA. Functional and medical implications. Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference.** Sèvres, França: EDK, 1997a, v.1; p.151-154.

____; CHANDANAYINGYONG, D.; CHIEWSILP, P.; FAN, L.; FAUCHET, R.; FUMIAKI, N.; GOMEZ-CASADO, E.; GUO, S.S.; GYÖDI, E.; HAMMOND, M.; JERSILD, C.; JUJI, T.; LEPAGE, V.; MARTINETTI, M.; MARTINEZ-LASO, J.; MEHRA, N.; PÉNZES, M.; RAJALINGAM, R.; RAJCZY, K. and TOKUNAGA, K. In: CHARRON, D. **HLA - Genetic diversity of HLA. Functional and medical implications. Proceedings of the twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference.** Sèvres, França: EDK, 1997b, v.1, p.155-158.

BELICH, M.P.; MADRIGAL, J.A.; HILDEBRAND, W.H.; ZEMMOUR, J.; WILLIAMS, R.C.; LUZ, R.; PETZL-ERLER, M.L.; PARHAM, P. Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. **Nature**, v.357, p.326-329, 1992.

BJORKMAN, P.J.; PARHAM, P. Structure, function, and diversity of class I Major Histocompatibility Complex molecules. **Annu. Rev. Biochem.**, v.59, p.253-288, 1990.

BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROP, R.E.; CHARRON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; FAUCHET, R.; MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M. T.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P.I. Nomenclature for Factors of the HLA system, 1996. **Hum. Immunol.**, v.58, p.98-128, 1997.

BOUCRAUT, J.; GUIELAUDEUX, J.; ALIZADEH, M.; BORETTO, J.; CHIMINI, G.; MALECAZE, F.; SEMANA, G.; FAUCHET, R.; PONTAROTTI, P.; LE BOUTEILLER, P.. HLA-E is the only class I gene that escapes CpG methylation and is transcriptionally active in the trophoblast-derived human cell line JAR. **Immunogenetics**, v.38, p.117-130, 1993.

BOYSON, J.E.; McADAM, S.N.; GALLIMORE, A.; GOLOS, T.G.; LIU, X.; GOTCH, F.M.; HUGHES, A.L.; WATKINS, D.I. The MHC E locus is polymorphic and is conserved between macaques and humans. **Immunogenetics**, v.41, p.59-68, 1995.

BRAUD, V.; JONES, E.Y.; McMICHAEL, A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. **Eur. J. Immunol.**, v.27, p.1164-1169, 1997.

BRAUN, K. **Análise do Polimorfismo dos Genes HLA em Populações Indígenas das Américas - uma revisão.** Curitiba, 1996. Monografia (Especialização em Imunologia) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BRUENNLER, G.; ALBERT, E.D. A study of DMA DMB polymorphism in Germany: allelic frequencies and linkage analysis between HLA-DM and HLA-DR/DQ and -DP. In: CHARRON, D. **HLA - Genetic diversity of HLA. Functional and medical implications. Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference.** Sèvres, França: EDK, 1997, v.1, p.168-170.

BUC, M. The Major Histocompatibility Complex in man. **Folia Biologica (Praha)**, v.39, p.223-241, 1993.

BUSCH, R.; MELLINS, E.D. Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. **Curr. Opin. Immunol.**, v.8, p.51-58, 1996.

CADAVID, L.F.; WATKINS, D.I. Heirs of the jaguar and the anaconda: HLA, conquest and disease in the indigenous populations of the Americas. **Tissue Antigens**, v.50, p.209-218, 1997.

CAMPBELL, R.D.; TROWSADLE, J. Map of the human MHC. **Immunol. Today**, v.18, n.1, p.43, 1997.

CARRINGTON, M.; YEAGER, M.; MANN, D. Characterization of HLA-DMB polymorphisms. **Immunogenetics**, v.38, p.446-449, 1993.

____; HARDING, A. Sequence analysis of two novel HLA-DMA alleles. **Immunogenetics**, v.40, p.165, 1994.

CAROSELLA, E.D.; DAUSSET, J.; KIRSZENBAUM, M. HLA-G revisited. **Immunol. Today**, v.17, n.9, p.407-409, 1996.

CEPPELINI, R.; SINISCALCO, M.; SMITH, C.A.B. The estimation of gene frequencies in a random-mating population. **Ann. Hum. Genet.**, v.20, p.97, 1955.

CHUMBLEY, G.; KING, A.; ROBERTSON, K.; HOLMES, N.; LOKE, Y.W. Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. **Cell. Immunol.**, v.155, p.312-322, 1994.

CONVERT.EXE. Versão 1.1. Christian Macagnan Probst. Curitiba, 1998. 1 disquete de 3,5 polegadas. 68.339 bytes. Visual Basic 3.0

DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. **Acta Haemat.**, v.20, p.156-166, 1958.

DENZIN, L.K.; CRESSWELL, P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. **Cell**, v.82, p.155-165, 1995.

____; SANT'ANGELO, D.B.; HAMMOND, C.; SURMAN, M.J.; CRESSWELL, P. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. **Science**, v.278, p.106-109, 1997.

DIEHL, M.; MÜNZ, C.; KEIHOLZ, W.; STEVANOVIC, S.; HOLMES, N.; LOKE, Y.W.; RAMMENSEE, H.-G. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. **Curr. Biol.**, v.6, n.3, p.305-314, 1996.

DJILALI-SAIAH, I.; BENINI, V.; SCHMITZ, J.; TIMSIT, J.; ASSAN, R.; BOITARD, C.; BACH, J.-F.; CAILLAT-ZUCMAN, S. Absence of primary association between DM gene polymorphism and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus or Celiac Disease. **Hum. Immunol.**, v.49, p.22-27, 1996a.

____; I.; BENINI, V.; DANIEL, S.; ASSAN, R.; BACH, J.-F.; CAILLAT-ZUCMAN, S. Linkage disequilibrium between HLA class II (DR, DQ, DP) and antigen processing (LMP, TAP, DM) genes of the major histocompatibility complex. **Tissue Antigens**, v.48, p.87-92, 1996b.

ENGELHARD, V.H.. How cells process antigens. **Scientific American**, v. 271, n.2, p.56-61, 1994.

FAUCZ, F.R. Alelos e haplótipos dos genes TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7 de duas populações indígenas paranaenses: Kaingang e Guarani. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FERNANDEZ-BORJA, M.; VERWOERD, D.; SANDERSON, F.; AERTS, H.; TROWSDALE, J.; TULP, A.; NEEFJES, J. HLA-DM and MHC class II molecules co-distribute with peptidase-containing lysosomal subcompartments. **Int. Immunol.**, v.8, n.5, p.625-640, 1996.

FERNÁNDEZ-VINÃ, M.A.; LÁZARO, A.M.; MARCOS, C.Y.; NULF, C.; RAIMONDI, E.; HAAS, E.J.; STASTNY, P. Dissimilar evolution of B-locus versus A-locus and class II loci of the HLA region in South American Indian tribes. **Tissue Antigens**, v.50, p.233-250, 1997.

FLAHERTY, L.. Major histocompatibility complex polymorphism: a nonimmune theory for selection. **Hum.Immunol.**, v.21, p.3-13, 1988.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T.. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.9145-9149, 1987.

____; STOCKSCHLEADER, M.; ISHITANI, A.; HANSEN, J.A.. Polymorphism at the HLA-E locus predates most HLA-A and -B polymorphism. **Hum.Immunol.**, v.33, p.174-184, 1992a.

____; PEI, J.; LIPSKY, B.; HANSEN, J.A.; TAILLON-MILLER, P.; BRONSON, S.K.; CHAPLIN, D.D.. Cloning and physical mapping of the HLA class I region spanning the HLA-E-to-HLA-F internal by using yeast artificial chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.2669-2673, 1992b.

- _____. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. **Curr. Opin. Immunol.**, v.5, p.3-7, 1993.
- GOBIN, S.J.P.; WILSON, L.; KEIJERS, V.; VAN DEN ELSEN, P.J. Antigen processing and presentation by human trophoblast-derived cell lines. **J. Immunol.**, v.158, p.3587-3592, 1997.
- GOMEZ-CASADO, E.; MARTINEZ-LASO, J.; VARGAS-ALARCÓN, G.; VARELA, P.; DIAZ-CAMPOS, N.; ALVAREZ, M.; ALEGRE, R.; ARNAIZ-VILLENA, A. Description of a new HLA-E (E*01031) allele and its frequency in the spanish population. **Hum. Immunol.**, v.54, p.69-73, 1997.
- GREEN, J.M.; DeMARS, R.; XU, X.; PIERCE, S.K. The intracellular transport of MHC class II molecules in the absence of HLA-DM. **J. Immunol.**, v.155, p.3759-3768, 1995.
- GRUNEBERG, U.; van HAM, S.M.; MALCHEREK, G.; BROKER, I.; MELMS, A.; TROWSDALE, J. The structure and function of the novel MHC class II molecule, HLA-DM. **Biochem. Soc. Trans.**, v.25, p.208, 1997.
- GUERRA, L. K.; REHFELDT, I. R.; LIMA, M. T.; PETZL-ERLER, M. L.; MESSIAS, I. J. T. BF and C3 genetic polymorphisms in Kaingang indians from Southern Brazil. **Hum. Hered.** v.42, p.153-156, 1992.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.
- GUSTAFSON, K.S.; GINDER, G.D. Interferon- γ induction of the Human Leukocyte Antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT α to a distinct Interferon- γ -responsive element. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.33, p.20035-20046, 1996.

HARDING, C.V. Class II antigen processing: analysis of compartments and functions. **Crit. Rev. Immunol.**, v.16, p.13-29, 1996.

HITZEL, C.; KOCH, N. The invariant chain derived fragment CLIP is an efficient *in vitro* inhibitor of peptides binding to MHC class II molecules. **Mol. Immunol.**, v.33, n.1, p.25-31, 1996.

HOULIHAN, J.M.; BIRO, P.A.; HARPER, H.M.; JENKINSON, H.J.; HOLMES, C.H. The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. **J. Immunol.**, v.154, p.5665-5674, 1995.

HUGHES, A.L.; NEI, M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.958-962, 1989.

HUMPHREY, K.E.; HARRISON, G.A.; COOPER, D.W.; WILTON, A.N.; BRENECKE, S.P.; TRUDINGER, B.J. HLA-G deletion polymorphism and pre-eclampsia/eclampsia. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.102, p.707-710, 1995.

ISHIHARA, M.; NARUSE, T.; OHNO, S.; KAWATA, H.; MIZUKI, N.; YAMAGATA, N.; ISHIDA, T.; NOSE, Y.; INOKO, H. Analysis of HLA-DM polymorphisms in sarcoidosis. **Hum. Immunol.**, v.49, p.144-146, 1996.

ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p.3947-3951, 1992.

IWANAGA, K.K.; EBERLE, M.; KOLMAN, C.J.; BERMINGHAM, E.; WATKINS, D.I. Further diversification of the HLA-B locus in Central American Amerindians: new B*39 and B*51 alleles in the Kuna of Panama. **Tissue Antigens**, v.50, p.251-257, 1997.

- JOHN, S.W.M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. **Nucleic Acids Res.**, v.19, n.2, p.408, 1990.
- KARHUKORPI, J.; IKÄHEIMO, I.; SILVENNOINEN-KASSINEN, S.; TIILIKAINEN, A. HLA-G polymorphism and allelic association with hla-a in a finnish population. **Eur. J. Immunogenet.**, v.23, p.153-155, 1996.
- KELLY, A.P.; MONACO, J.J.; CHO, S.; TROWSDALE, J.. A new human HLA class II-related locus, DM. **Nature**, v.353, p.571-573, 1991.
- KERN, I.; STEIMLE, V.; SIEGRIST, C.-A.; MACH, B. The two novel MHC II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes. **Int. Immunol.**, v.7, n.8, p.1295-1299, 1995.
- KIM, T.-G.; CARRINGTON, M.; CHOI, H.-B.; KIM, H.-Y.; HAN, H. Three HLA-DMB variants in korean patients with autoimmune diseases. **Hum. Immunol.**, v.46, p.58-60, 1996.
- KIRSZENBAUN, M.; MOREAU, P.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.4209-4213, 1994.
- ____; MOREAU, P.; TEYSSIER, M.; LAFON, C.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. Evidence for the presence of the alternatively spliced HLA-G mRNA forms in human mononuclear cells from peripheral blood and umbilical cord blood. **Hum. Immunol.**, v.43, p.237-241, 1995.
- ____; DJOULAH, S.; HORS, J.; LE GALL, I.; OLIVEIRA, E.B.; PROST, S.; DAUSSET, D.; CAROSELLA, E.D. HLA-G gene polymorphism segregation within CEPH reference families. **Hum. Immunol.**, v.53, p.140-147, 1997.

KLEIN, J.. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. **Hum. Immunol.**, v.19, p.155-162, 1987.

____; GUTKNECHT, J.; FISCHER, N.. The major histocompatibility complex and human evolution. **TIG**, v. 6, n.1, p.7-12, 1990.

____; TAKAHATA, N.; AYALA, F. J. MHC polymorphism and human origins. The diversity of human tissue types was generated long before *Homo sapiens* emerged. **Scientific American**, p. 46-51, dez 93.

KOLLER, B.H.; GERAGHTY, D.E.; SHIMIZU, Y.; DEMARS, R.; ORR, H.T.. HLA-E A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 141, n.3, p.897-904, 1988.

KOVATS, S.; MAINE, K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISSHER, S.J.; DEMARS, R.. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v.248, p.220-223, 1990.

KROPSHOFER, H.; ARNDT, S.O.; MOLDENHAUER, G.; HÄMMERLING, G.J.; VOGT, A.B. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. **Immunity**, v.6, p.293-302, 1997a.

____; HÄMMERLING, G.J.; VOGT, A.B. How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest? **Immunol. Today**, v.18, n.2, p.77-82, 1997b.

KUWATA, S.; YANAGISAWA, M.; HAKAGAWA, H.; SAEKI, H.; ETOH, T.; MIYAMOTO, M.; JUJI, T. HLA-DM gene polymorphism in atopic dermatitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.98, n.6, parte II, p.192-200, 1996.

- LAHIRI, D.K.; NURNBERGER JR, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.** v.19, n.19, p.5444, 1991.
- LAYRISSE, Z.; GUEDEZ, Y.; DOMINGUEZ, E.; HERRERA, F.; SOTO, M.; BALBAS, O.; MATOS, M.; ALFONZO, J.C.; GRANADOS, J.; SCORZA, J. Extended HLA haplotypes among the Bari amerindians of the Perija Range: relationship to other tribes based on four-loci haplotype frequencies. **Hum. Immunol.**, v.44, n.4, p.228-235, 1995.
- LE BOUTEILLER, P.; LENFANT, F. Antigen-presenting function(s) of the non-classical HLA-E, -F and -G class I molecules: the beginning of a story. **Res. Immunol.**, v.147, n.5, p.301-313, 1996.
- _____. HLA-G: on the track of immunological functions. **Eur. J. Immunogenet.**, v. 24, p.397-408, 1997.
- MACK, S.J.; ERLICH, H.A. HLA class II polymorphism in the Ticuna of Brazil: Evolutionary implications of the DRB1*0807 allele. **Tissue Antigens**, v.51, p.41-50, 1998.
- MESSIAS, I.T.; PETZL-ERLER, M.L.; REHFELDT, I.R.; LIMA, M.T.; GUERRA, L.K. Variability of complement factor B and complement component C3 among Guarani indians from Southern Brazil. **Braz. J. Genetics**, v.16, n.3, p.803-809, 1993.
- MONACO, J.J. Structure and function of genes in the MHC class II region. **Curr. Opin. Immunol.**, v.5, p.17-20, 1993.
- _____. Pathways for the processing and presentation of antigens to T cells. **J. of Leukocyte Biol.**, v.57, p.543-547, 1995.
- MONJI, T.; McCORMACK, A.L.; YATES III, J.R.; PIOUS, D. Invariant-cognate peptide

- exchange restores class II dimer stability in HLA-DM mutants. **J. Immunol.**, v.153, p.4468-4477, 1994.
- MORALES, P.; CORELL, A.; MARTINEZ-LAZO, J.; MARTÍN-VILLA, J.M.; VARELA, P.; PAZ-ARTAL, E.; ALLENDE, L-M.; ARNAIZ-VILLENA, A. Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. **Immunogenetics**, v.38, p.323-331, 1993.
- MORRIS, P.; SHAMAN, J.; ATTAYA, M.; AMAYA, M.; GOODMAN, S.; BERGMAN, C.; MONACO, J.J. ; MELLINS, E.. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. **Nature**, v.368, p.551-554, 1994.
- MULLIS, K.B.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v.155, p.335-350, 1987.
- NARUSE, T.K.; KAWATA, H.; ISHIHARA, M.; ANDO, A.; KAGIYA, M.; NOSE, Y. Analysis on allelic variation of the HLA-DMB gene in japanese by PCR-RFLP as well as direct DNA sequencing and identification of a new DMB allele, DMB*0105. **Tissue Antigens**, v.47, p.530-537, 1996.
- NEEFJES, J.J.; MOMBURG, F. Cell biology of antigen presentation. **Curr. Opin. Immunol.**, v.5, p.27-34, 1993.
- NEI, M.; HUGHES, A.L. Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. In: TSUJI, K.; AIZAWA, M.; SASAZUKI, T. **HLA 1991 - Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference**. Nova York: Oxford Science Publication, 1992, v.2, p.27-37.
- OHYA, K.; KONDO, K.; MIZUNO, S.. Polymorphism in the human class I MHC locus HLA-E in Japanese. **Immunogenetics**, v.32, p.205-209, 1990.

PARHAM, P. Evolution of class I HLA polymorphism: selection and drift. In: TSUJI, K.; AIZAWA, M.; SASAZUKI, T. **HLA 1991 - Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference**. Nova York: Oxford Science Publication, 1992, v.2, p.72-81

____. The rise and fall of great class I genes. **Immunology**, v.6, p.373-382, 1994.

____; OHTA, T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. **Science**, v.272, p.67-74, 1996.

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

PAYNE, R.; TRIPP, M.; WEIGLE, J.; BODMER, W.F.; BODMER, J. A new leucocyte isoantigen system in man. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v.29, p.285, 1964.

PETZEL-ERLER, M.L.; LUZ, R.; SOTOMAIOR, V.S.. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indians tribes: the Kaingang and the Guarani. **Tissue Antigens**, v.41, p.227-237, 1993.

____; McDEVITT, H.O.. Molecular analysis of the HLA-DRB genes in two tribes of Brazilian Indians. **Hum. Immunol.**, v. 41, p.180-184, 1994.

____; GORODEZKY, C.; LAYRISSE, Z.; KLITZ, W.; FAINBOIM, L.; VULLO, C.; BODMER, J.G.; EGEE, E.; NAVARRETE, C.; INFANTE, E.; ALAEZ, C.; OLIVO, A.; DEBAZ, H.; BAUTISTA, N.; de la ROSA, G.; VAZQUEZ, M.N.; NAVARRO, J.L.; PUJOL, M.J.; DURAN, C.; SCHAFHAUSER, C.; FAUCZ, R.F.; MACIAG, P.; BOLDT, A.B.W.; SOUZA, P.S.A.; PROBST, C.M.; SILVA, G.F.; MAKHATADZE, N.; DOMINGUEZ, E.; MONTAGNANI, S.; MATOS, M.; MARTINEZ, A.; HERRERA, F.;

HOLLENBACH, J.; THOMSON, G.; PANDO, M.; SATZ, L.; LARRIBA, J.; FERNANDEZ, G.; PESOA, S.A.; BOROSKY, A.; GARAVITO, G.; ANGEL, L.; BROWN, J.; LLOP, E. Anthropology report for region Latin-America: Amerindian and admixed populations. In: CHARRON, D. **HLA - Genetic diversity of HLA. Functional and medical implications. Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference.** Sèvres, França: EDK, 1997, v.1, p.337-345.

____; PROBST, C.M.; TONGIO, M.-M.; ROZEMULLER, E.; TILANUS, M. Linkage disequilibrium between HLADPA1 and HLA-DPB1 alleles and haplotype evolution. 1998. Submetido.

PIERRE, P.; DENZIN, L.K.; HAMMOND, C.; DRAKE, J.R.; AMIGORENA, S.; CRESSWELL, P.; MELLMAN, I. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. **Immunity**, v.4, p.229-239, 1996.

PIETERS, J. MHC class II restricted antigen presentation. **Curr. Opin. Immunol.**, v.9, p.89-96, 1997.

RADLEY, E.; ALDERTON, R.P.; KELLY, A.; TROWSDALE, J.; BECK, S. Genomic organization of HLA-DMA and HLA-DMB. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n.29, p.18834-18838, 1994.

ROBBINS, N.F.; HAMMOND, C.; DENZIN, L.K.; PAN, M.; CRESSWELL, P. Trafficking of Major Histocompatibility Complex class II molecules through intracellular compartments containing HLA-DM. **Hum. Immunol.**, v.45, p.13-23, 1996.

ROCHE, P.A. HLA-DM: An in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. **Immunity**, v.3, p.259-262, 1995

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Moléculas que reconhecem antígenos. In: **Imunologia**. Tradução Gubert, I.C. 3ª ed. São Paulo, Editora Manole, 1993.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARE, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.

SALZANO, F.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; WEINER, T.A.; FRANCO, M.H.L.P.; HUTZ, M.H.; PETZL-ERLER, M.L. Electrophoretic Protein Polymorphism in Kaingang and Guarani Indians of Southern Brazil. **Am. J. Hum. Biol.**, v.9, p.505-512, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANDERSON, F.; POWIS, S.H.; KELLY, A.P.; TROWSDALE, J.. Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove. **Immunogenetics**, v.39, p.56-58, 1994a.

____; KLEIJMEER, M.J.; KELLY, A.; VERWOERD, D.; TULP, A.; NEEFJES, J.J.; GEUZE, H.J.; TROWSDALE, J. Accumulation of HLA-DM , a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. **Science**, v.266, p.1566-1573, 1994b.

____; TROWSDALE, J. Kissing cousin exchange CLIP. **Curr. Biol.**, v.5, n.12, p.1372-1376, 1995.

SCHMIDT, C.M.; ORR, H.T. A physical linkage map of HLA-A, -G, -7,5p, and -F. **Hum. Immunol.**, v.31, p.180-185, 1991.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J.-M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. (1997) ARLEQUIN: A

Software for population genetic data analysis. Ver 1.1. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.

SHAMAN, J.; VON SCHEVEN, E.; MORRIS, P.; CHANG, M.Y.; MELLINS, E. Analysis of HLA-DMB mutants and -DMB genomic structure. **Immunogenetics**, v.41, p.117-124, 1995.

SHERMAN, M.A.; WEBER, D.A.; JENSEN, P.E. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. **Immunity**, v.3, p.197-205, 1995.

SHUKLA, H.; SWAROOP, A.; SRIVASTAVA, R.; WEISSMAN, S.M. The mRNA of a human class I gene HLA G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression. **Nucleic Acids Res.**, v.18, n.8, p.2189, 1990.

SOTOMAIOR, V.S. **Caracterização dos alelos HLA-DQB1 em índios Kaingang e Guarani, com oligonucleotídeos-sonda seqüência específicos.** Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

_____, FAUCZ, F.R.; SCHAFHAUSER, C.; JANZEN-DÜCK, M.; BOLDT, A.B.W.; PETZLER, M.L. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles and haplotypes of two tribes of Brazilian Indians. Evidence of conservative evolution of HLA-DQ. **Hum. Biol.**, v.70, n.4, p.789-797, 1998.

STITES, D.P.; TERR, A.I. Antígenos leucocitários humanos (HLA) do Complexo Principal de Histocompatibilidade. In **Imunologia Básica**, Prentice Hall do Brasil SA., p.35-46, 1991.

STROYNOWSKI, I.; LINDAHL, K.F. Antigen presentation by non-classical class I molecules. **Curr. Opin. Immunol.**, v.6, p.38-44, 1994.

STOCKSCHLEADER, M.; ISHITANI, A.; HANSEN, J. A.; GERAGHTY, D. E. Polymorphism at the HLA-E is ancient. In: TSUJI, K.; AIZAWA, M.; SASAZUKI, T. **HLA 1991 - Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference**. Nova York: Oxford Science Publication, 1992, v.2, p.135-146.

SUÁREZ, M.B.; MORALES, P.; CASTRO, M.J.; FERNÁNDEZ,V.; VARELA, P.; ALVAREZ, M.; MARTÍNEZ-LASO, J.; ARNAIZ-VILLENA, A. A new HLA-G allele (HLA-G*0105N) and its distribution in the spanish population. **Immunogenetics**, v. 45, p.464-465, 1997.

TAKAHATA, N.; SATTA, Y.; KLEIN, J.. Polimorphism and balancing selection at major histocompatibility complex loci. **Genetics**, v. 130, p.925-938, 1992.

TAMAKI, J.; ARIMURA, Y.; KODA, T.J.; FUGIMOTO, S.; FUJINO, T.; WAKISAKA, A.; KAKINUMA, M.. Heterogeneity of HLA-G genes identified by Polymerase Chain Reaction/Single Strand Conformational Polymorphism (PCR/SSCP). **Microbiol. Immunol.**, v. 37, n.8, p.633-640, 1993.

TEISSERENC, H. 12th IHWC Protocol for DMA/B polymorphism. In: **Twelfth International Workshop and Conference - Technical Handbook**, 1994.

____; BESNAULT, L.; BRIAUD, I.; ALBERT, E.; BIGNON, J.D.; CARABALLO, L.; CHARRON, D.; DANZE, P.M.; LOUIE, L.; MORA, B.; SEMANA, G.; POWIS, S.H. In: CHARRON, D. **HLA - Genetic diversity of HLA. Functional and medical implicationS. Proceedings of the Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference**. Sèvres, França: EDK, 1997, v.1, p.167-168.

TERASAKI, P.I.; McCLELLAND, J.D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature**, v. 204, p.998-1000, 1964.

- TITUS-TRACHTENBERG, E.A.; RICHARDS, O.; De STEFFANO, G.F.; ERLICH, H.A.. Analysis of HLA class II haplotypes in the Cayapa Indians of Ecuador: a novel DRB1 allele reveals evidence for convergent evolution and balancing selection at position 86. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 55, p.160-167, 1994.
- ULBRECHT, M.; REHBERGER, B.; STROBEL, J.; MESSER, G.; KIND, P.; DEGITZ, K.; BIEBER, T.; WEISS, E.H.. HLA-G: expression in human keratinocytes *in vitro* and in human skin *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p.176-180, 1994.
- van der VEN, K.; OBER, C. HLA-G polymorphism in african americans. **J. Immunol.**, v.153, p.5628-5633, 1994.
- van ROOD, J.J.; van LEEUWEN, A. Leucocyte grouping. A method and its application. **J. Clin. Invest.**, v.42, p.1382-1390, 1963.
- VERMA, S.; KING, A.; LOKE, Y.W. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. **Eur. J. Immunol.**, v.27, p.979-983, 1997.
- VEROS.EXE. Versão 1.0. Christian Macagnan Probst. Curitiba, 1997. 1 disquete de 3,5 polegadas. 34.090 bytes. Visual Basic 3.0.
- VEROS.EXE. Versão 1.1. Christian Macagnan Probst. Curitiba, 1998. 1 disquete de 3,5 polegadas. 100.907 bytes. Visual Basic 3.0.
- VOGT, A.B.; KROPSHOFER, H.; HÄMMERLING, G.J. How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. **Hum. Immunol.**, v.54, p.170-179, 1997.
- WATKINS, D.I.; CHEN, Z.W.; HUGHES, A.L.; EVANS, M.G.; TEDDER, T.F.; LETVIN, N.L. Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral

homologues of human non-classical genes. *Nature*, v. 346, p.60-63, 1990.

WATKINS, D.I.; MCADAM, S.N.; LIU, X.; STRANG, C.R.; MILFORD, E.L.; LEVINE, C.G.; GARBER, T.L.; DOGON, A.L.; LORD, C.I.; GHIM, S.H.; TROUP, G.M.; HUGHES, A.L.; LETVIN, N.L. New recombinant HLA-B alleles in a tribe of South American Amerindians indicate rapid evolution of MHC class I loci. *Nature*, v.357, p.329-333, 1992.

WATTERSON, G. The homozygosity test of neutrality. *Genetics*, v.88, p.405-417, 1978.

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

WEI, X.; ORR, H.T. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Hum. Immunol.*, v.29, p.131-142, 1990.

WEI, H.; FAN, W-F.; X, H.; PARIMOO, S.; SHUKLA, H.; CHAPLIN, D.D.; WEISSMAN, S.M.. Genes in one megabase of the HLA class I region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p.11870-11874, 1993.

WESTERHEIDE, S.D.; LOUIS-PLENCE, P.; PING, D.; HE, X.F.; BOSS, J.M. HLA-DMA and HLA-DMB gene expression functions through the conserved S-X-Y region. *J. Immunol.*, v.158, p.4812-4821, 1997.

YASUDA, N.; KIMURA, M.A. A gene-counting method of maximum likelihood for estimating gene frequencies in ABO and ABO-like systems. *Ann. Hum. Genet.*, v.31, p.409, 1968.

ZAR, J.H. The Fisher exact test. In: _____. **Biostatistical analysis**. 1 ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, Inc., 1974, p.291-295.