



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Análise da variação de marcadores genéticos
associados ao estresse oxidativo em grupos
populacionais brasileiros**

Cássia de Oliveira Hiragi

Brasília
2010



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Análise da variação de marcadores genéticos
associados ao estresse oxidativo em grupos
populacionais brasileiros**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção
do título de Doutor em Ciências
Biológicas, área de concentração:
Genética

Cássia de Oliveira Hiragi

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Nazaré Klautau-Guimarães

Brasília

2010

Ao meu pai e à minha mãe, por tudo que eles representam em minha vida. Pelo amor, carinho e motivação constantes.

Aos meus irmãos: Gilberto, César e Márcio, por todo o carinho, apoio e compreensão.

Aos membros da comunidade remanescentes de quilombos, da tribo Kayabi e do Distrito Federal, por tornarem esse trabalho possível.

Dedico

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos".

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Profa Maria de Nazaré Klautau-Guimarães, pela orientação e confiança depositada em mim durante todos os anos de trabalho no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

À Profa Silviene Fabiana Oliveira e Dulce Maria Suscena de Rocha pela confiança, orientação e apoio durante o trabalho no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília e pelas valiosas e oportunas considerações na análise deste trabalho.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, pelo incentivo e grande amizade: Guilherme, Carol, Mila, Diogo, Ana Paula, Neide, Rejane, Gustavo, Ricardo, Sílvia, Gabriel e em especial: Ana Luísa, Arthur, Penha e Graciana.

Aos meus pais, por todo o amor e carinho e por ser exemplos de vida, me levando a seguir em frente sempre.

Aos meus irmãos (Gilberto, Márcio e César) pelo afeto, incentivo e compreensão em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos-irmãos, por todas as horas de descontração, pelo amor incondicional e pela compreensão nos momentos de ausência: Wesley, Renata, Gizeli e Patrícia.

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, por toda a presteza e atenção dispensadas.

À funcionária da Secretaria do Departamento de Biologia Animal, por ser sempre tão prestativa, paciente e eficiente no trato com os alunos.

À CAPES, CNPq e FINATEC, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a haptoglobina (HAPTO), as glutatona S-Transferases (M1 e T1) e a glutatona peroxidase (GPX1) são marcadores genéticos associados ao estresse oxidativo, que tem como função inibir ou diminuir as taxas de oxidação no organismo, evitando danos ao DNA. A variação genética dessas enzimas sugere diferenças individuais quanto ao grau de proteção antioxidante e a distribuição das frequências alélicas apresenta diferenças geográficas, dependendo do grupo étnico. Neste trabalho foi descrita a distribuição da frequência dos polimorfismos: CAT (21A / T), SOD2 (Ala9Val), GPX1 (Pro198Leu), subtipos da HAPTO e deleção dos genes da GSTM1 e GSTT1 em três grupos populacionais brasileiros de origens étnicas diferentes: Kayabi (n = 60), Kalunga (n = 72) e Distrito Federal (n = 162). A maioria das frequências dos alelos variantes observadas em Kalunga (18% a 60%) e Distrito Federal (15% a 63%) foram similares aos observados em Euro e Afro-descendentes, enquanto que em Kayabi (3% a 68%), dependendo do marcador foram semelhantes aos Asiáticos, Ameríndios e Euro-descendentes. Exceto para SOD2 em todos os grupos populacionais estudados e para HAPTO em Kayabi e Distrito Federal e para GPX1 em Kalunga, as distribuições genóticas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores de F_{ST} mostram que há uma diferenciação genética moderada nestes três grupos populacionais brasileiros. Em populações miscigenadas, como a brasileira, esses dados podem elucidar a contribuição de diferentes etnias em sua formação. Além disso, estes polimorfismos têm revelado dados interessantes para evitar associações genótipo-fenótipo inconsistentes nos estudos de farmacogenética.

ABSTRACT

Genetic markers associated with oxidative stress such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), haptoglobin (HAPTO), glutathione S-transferase (M1 and T1) and glutathione peroxidase (GPX1) inhibit, or decrease the rate of oxidation in the organism avoiding damage to DNA. Genetic variation of these enzymes suggests individual differences in the degree of antioxidant protection and the distribution of allele frequencies shows geographical differences, depending on the ethnic group. This study describes the frequency distribution of polymorphisms CAT (21A/T), SOD2 (Ala9Val), GPX1 (Pro198Leu), HAPTO subtypes and deletions of the GSTM1 and GSTT1 in three population groups from different ethnic backgrounds: Kayabi (n = 60), Kalunga (n = 72) and the Federal District (n = 162). Most of the frequencies of variant alleles observed in Kalunga (18% to 60%) and the Federal District (15% to 63%) were similar to those observed in European and African descendants, while in Kayabi (3% to 68%) depending on the marker were similar to Asians, Amerindians and Euro-descendants. Except for SOD2 in all population groups studied and HAPTO in Kayabi and Federal District and GPX1 in Kalunga, the genotypic distributions were in accordance with the Hardy-Weinberg. F_{ST} values show that there is a moderate genetic differentiation in these three population groups. In admixed populations such as Brazilian, these data can elucidate the contribution of different ethnic groups in their formation. Moreover, these polymorphisms have revealed interesting data to avoid the genotype-phenotype inconsistent in pharmacogenetic studies.

Índice

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	VARIAÇÃO NO GENOMA HUMANO.....	13
1.2.	FONTES DE VARIAÇÃO GENÉTICA.....	13
1.3.	GENÉTICA DE POPULAÇÕES	14
1.3.1.	MARCADORES GENÉTICOS	15
1.3.2.	POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs).....	15
1.4.	ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
1.5.	SISTEMA ENZIMÁTICO DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	18
1.5.1.	SUPERÓXIDO DISMUTASE 2 (SOD2)	18
1.5.2.	GLUTATIONA PEROXIDASE 1 (GPX1).....	19
1.5.3.	CATALASE (CAT).....	20
1.5.4.	HAPTOGLOBINA (HAPTO).....	21
1.5.5.	GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)	23
1.6.	A CONSTITUIÇÃO DA POPULAÇÃO HUMANA BRASILEIRA	25
1.7.	JUSTIFICATIVA	27
2.	HIPÓTESES	29
3.	OBJETIVOS	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES	31
4.1.1.	Distrito Federal	31
4.1.2.	Kayabi.....	33
4.1.3.	Kalunga.....	34
4.2.	Processamento das amostras biológicas e extração de DNA	35
4.2.1.	Processamento das amostras.....	35
4.2.2.	Extração de DNA e verificação em gel de agarose	36
4.2.3.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e visualização dos produtos de amplificação.....	37
4.3.	Análise da variação dos marcadores genéticos.....	43
4.3.1.	Variação na região promotora do gene da Catalase (21 A/T)	43
4.3.2.	Variação do gene da Superóxido Dismutase 2 (Val 9-Ala)	43
4.3.3.	Variação do gene da Glutationa S-Transferase <i>Mu</i> 1	44
4.3.4.	Variação do gene da Glutationa S-Transferase <i>Teta</i> 1	45
4.3.5.	Variação do gene da Glutationa Peroxidase 1 (Pro198Leu).....	46
4.3.6.	Polimorfismo do gene da haptoglobina	47
4.4.	Eletroforese e análise fenotípica.....	48
4.5.	Análise estatística	48
4.5.1.	Frequências Alélicas e Genotípicas.....	48
4.5.2.	Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	49
4.5.3.	Comparação das frequências gênicas e genotípicas	49
4.5.4.	Diferenciação genética	49
4.5.5.	Estatísticas F	49
5.	RESULTADOS	51
5.1.	Descrição das frequências alélicas nos três grupos populacionais.....	51
5.2.	Comparação das frequências gênicas e genotípicas	51
5.3.	Teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e de heterogeneidade	52
5.4.	Estatísticas F.....	54

6.	DISCUSSÃO	56
6.1.	Frequências alélicas e genotípicas	56
6.2.	Equilíbrio de Hardy-Weinberg	73
6.3.	ESTATÍSTICA F E DIVERSIDADE INTER POPULACIONAL	75
7.	Conclusões	77
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9.	ANEXO I	102
10.	ANEXO II	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças nos aminoácidos das cadeias polipeptídicas do tipo α^{1F} e α^{1S}	22
Tabela 2. Distribuição dos indivíduos componentes da amostra do Distrito Federal com relação à região administrativa da residência dos pais na época do nascimento. (Modificado, Godinho 2008).....	32
Tabela 3. Condições da mistura para a reação de PCR para os marcadores genéticos analisados.	38
Tabela 4. Seqüência dos iniciadores e temperatura de anelamento para os marcadores: SOD2, GPX1, CAT, GSTM1, GSTT1 e haptoglobina	39
Tabela 5. Concentração dos reagentes utilizados nas reações de restrição dos produtos de PCR dos marcadores do tipo SNPs, temperatura ótima da enzima e tempo de restrição.	40
Tabela 6. Preparo da solução para géis de poliacrilamida a 6% e a 10%.....	42
Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas de SOD2 ^{*C} , CAT ^{*T} , GPX1 ^{*T} , GSTM1 ^{*0} GSTT1 ^{*0} , Hp ^I , Hp ^{IS} , Hp ^{IF} e Hp ² nos grupos populacionais analisados nesse estudo.	51
Tabela 8. Valores de <i>p</i> obtidos pelo teste para diferenciação gênica e genotípica entre os pares de populações analisadas.....	52
Tabela 9. Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de heterogeneidade para os polimorfismos da CAT, SOD2, GPX1, GSTM1, GSTT1 e haptoglobina nas amostras deste estudo.	53
Tabela 10. Valores de F_{IS} nos grupos populacionais de Kayabi, Kalunga e Distrito Federal.	54
Tabela 11. Valores de F_{ST} para os três pares dos grupos populacionais e para os três grupos populacionais em conjunto.	55
Tabela 12. Frequências alélicas e genotípicas da variação na região promotora do gene da catalase (21A/T) em diversas populações.....	57
Tabela 13. Frequências alélicas e genotípicas da variação na seqüência sinal-mitocondrial do gene da SOD2 (Val9Ala) em diversas populações.	59
Tabela 14. Frequências alélicas e genotípicas da variação do gene da GPX1 (Pro198Leu) em diversas populações.....	61
Tabela 15. Frequências alélicas e genotípicas da variação do gene da haptoglobina em diversas populações.	63
Tabela 16. Frequências fenotípicas da variação do gene da Glutathione S-Transferase M1 e T1 em diversas populações.	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Posição do gene SOD2 no cromossomo 6, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOD2&search=SOD2>)..... 18
- Figura 2. Posição do gene GPX1 no cromossomo 3, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1&search=GPX1>)..... 19
- Figura 3. Posição do gene CAT no cromossomo 11, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1&search=GPX1>)..... 20
- Figura 4: Desenho esquemático da estrutura da Hp humana. Todos os três fenótipos compartilham uma estrutura comum de cadeias β , enquanto Hp 1-2 e 2-2 são formas poliméricas heterogêneas. O grau de polimerização dentro do arranjo intermolecular é mostrado. Devido a um grupo tiol extra na cadeia $\alpha 2$, Hp1-2 e 2-2 podem formar grandes polímeros (Tseng *et al.*, 2004)..... 21
- Figura 5. Posição do gene GSTM1 no cromossomo 1, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTM1&search=GSTM1>)..... 24
- Figura 6. Posição do gene GSTT1 no cromossomo 22, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTT1&search=GSTT1>)..... 24
- Figura 7. Regiões Administrativas que compunham o Distrito Federal em 2002 (Fonte: Godinho, 2008), época da coleta de material biológico. 32
- Figura 8. Perfil eletroforético do polimorfismo CAT 21A/T (ref SNP ID: rs7943316) através de gel poliacrilamida 6% não-desnaturante. 1 – Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder); 2- Homozigoto TT; 3 – Heterozigoto AT; 4 – Homozigoto AA. O tamanho dos produtos de restrição estão indicados nas laterais. 43
- Figura 9. Perfil eletroforético do polimorfismo Val 9-Ala da Mn-SOD (ref SNP ID: rs179972) através de gel poliacrilamida 6% não-desnaturante. 1 - Homozigoto Val/Val; 2 - Heterozigoto Val/Ala; 3 - Homozigoto Ala/Ala; 4 – Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder). O tamanho dos produtos de restrição estão indicados nas laterais 44
- Figura 10: Gel de poliacrilamida 6% não desnaturante para detecção do polimorfismo do gene da GSTM1. Os produtos da PCR são fragmentos de 268 pb e 132 pb, que correspondem à presença do gene da β -globina e da GSTM1. M corresponde ao marcador de 100 pb, nas linhas 1, 2 e 3 estão representados indivíduos com o fenótipo nulo GSTM1^{0*/0*} e nas linhas 4, 5 e 6 os indivíduos com o fenótipo positivo GSTM1^{+/+} 45
- Figura 11: Gel de poliacrilamida 6% não desnaturante para detecção do polimorfismo do gene da GSTT1. Os produtos da PCR são fragmentos de 268 pb e 480 pb, que correspondem à presença do gene da β -globina e da GSTT1. M corresponde ao marcador de 100 pb, nas linhas 1, 2, 3 e 4 estão representados indivíduos com o fenótipo positivo GSTT1^{+/+}, enquanto que nas linhas 5, 6 e 7 os indivíduos com o fenótipo nulo GSTT1^{0*/0*} 46
- Figura 12. Perfil eletroforético do polimorfismo GPX1 (Pro198Leu) (ref SNP ID: rs1050450) através de gel poliacrilamida 10% não-desnaturante. 1 – Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder); 2- Homozigoto Pro/Pro 3 – Heterozigoto

Pro/Leu; 4 – Homozigoto Leu/Leu. O tamanho dos produtos de restrição estão indicados nas laterais.....	47
Figura 13. Perfil eletroforético do polimorfismo da cadeia α da haptoglobina através de gel poliacrilamida 6% não-desnaturante. Cada genótipo está representado em três poços do gel.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. VARIAÇÃO NO GENOMA HUMANO

O seqüenciamento do nosso genoma representou um passo essencial no entendimento da biologia humana e no planejamento racional de pesquisas biomédicas. A finalização do seqüenciamento do nosso material genético entusiasmou as buscas de novas abordagens para se determinar o risco associado a uma determinada doença ou o desenvolvimento de terapias individualizadas (Sharp *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da biologia molecular e o surgimento de novas técnicas nesse campo de pesquisa, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), técnicas que utilizam enzimas de restrição e o seqüenciamento automático de fragmentos de DNA permitiram importantes avanços na detecção de polimorfismos genéticos. Dentre essas variações genéticas, temos a do nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), vários elementos repetitivos de seqüências curtas (microsatélites e minissatélites) e pequenas (1 kb) inserções, deleções, inversões e duplicações (Sharp *et al.*, 2006). Além disso, há estimativa de mais de 200.000 variações de substituições de aminoácidos em seqüências codantes de proteínas presente no genoma humano. Essas regiões são denominadas também de polimorfismos de nucleotídeo único não-sinônimo (nsSNPs, do inglês *Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms*) (Won *et al.*, 2008).

1.2. FONTES DE VARIAÇÃO GENÉTICA

A mutação é a fonte suprema da variação genética e gera mudanças no material genético. As alterações na seqüência de nucleotídeos do DNA ou a movimentação de seqüências de DNA, transposons podem acontecer por ação de agentes mutagênicos, como radiações, e alguns produtos químicos que podem modificar bases nitrogenadas, substituindo uma base por outra. Por outro lado, algumas mutações são espontâneas decorrentes de processos internos, próprios do organismo (Hartl e Clark, 1997).

Outra fonte de variação fundamental é a recombinação genética. Duas amplas classes de recombinação são comumente reconhecidas: a recombinação geral e a sítio-específica. Na recombinação geral, ou recombinação homóloga, a troca genética envolve permuta entre cromossomos homólogos (*crossing-over*) durante a meiose. Na recombinação sítio-específica não é necessária homologia extensa do DNA. Nesse caso,

seqüências específicas de nucleotídeos são reconhecidas por uma enzima de recombinação sítio-específica que altera a posição relativa da seqüência de nucleotídeos nos genomas (Strachan e Read, 1997).

1.3. GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A genética de populações humanas dedica-se ao estudo da distribuição de frequências gênicas e de caracteres hereditários normais e patológicos nas populações humanas, bem como aos fatores que mantêm ou, em oposição, alteram as frequências gênicas ou genotípicas nessas populações. A busca pela compreensão da dinâmica populacional dos genes e dos genótipos normais e patológicos é a razão da importância da genética de populações para os estudiosos da genética humana e médica, da epidemiologia, da antropologia física e para aqueles que se dedicam à biologia humana e à evolução, pois é por intermédio do estudo dos fatores evolutivos que entendemos como se faz a manutenção da carga hereditária deletéria através de gerações (Beiguelman, 2008). Este ramo da biologia é fundamental na compreensão da variação humana, uma vez que liga temas da área médica e de evolução, que nos permite compreender as origens e os impactos das nossas diferenças genômicas. A caracterização genética da população está se desenvolvendo em ritmo acelerado, trazendo novos conhecimentos sobre a adaptação humana recente, o genoma e doenças. Uma das preocupações da genética de populações é com o histórico das variantes genéticas e as propriedades gerais dessa variação. (Conrad e Hurler, 2007).

A variação genética é um processo natural, gerada a partir de mutações e recombinação da variação pré-existente (Futuyma, 1998). Os trabalhos inseridos neste ramo da ciência procuram analisar a distribuição dos polimorfismos genéticos de indivíduos pertencentes a uma determinada população e essas informações podem ser úteis na busca do conhecimento das relações históricas e os processos demográficos que influenciaram na formação de uma determinada população.

1.3.1. MARCADORES GENÉTICOS

Marcadores genéticos são caracteres com mecanismos de herança mendeliana, que podem ser empregados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (Robinson, 1998). Eles podem ser morfológicos, bioquímicos (isoenzimas) ou moleculares e podem ser definidos como todo fenótipo molecular originário de um gene expresso como isoenzimas ou de um segmento específico de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Regiões do genoma que apresentam variação e cujo alelo mais comum apresenta uma frequência populacional de no máximo 99% são denominados marcadores genéticos polimórficos (Saitou, 1995). Os marcadores genéticos são uma importante ferramenta no entendimento das relações evolutivas populacionais (Hajibabaei *et al.*, 2007; Córdova *et al.*, 2008), no diagnóstico de patologias humanas (Sun *et al.*, 2007), na identificação humana (Albuquerque, 2004) e no mapeamento genético (Eichler *et al.*, 2007).

1.3.2. POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs)

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) equivalem a uma mutação de ponto do tipo substituição. Em sua maioria, são marcadores bi-alélicos, mas em princípio os SNPs podem ser também tri- ou tetra-alélicos (Brown, 2002). São os marcadores mais amplamente distribuídos no genoma humano, estimando-se que eles sejam responsáveis por cerca de 90% das variações de seqüências (Sherry *et al.*, 2001). Refletem mutações ocorridas no passado e que, em sua maioria, foram eventos únicos. Dessa forma, dois indivíduos que compartilham um determinado alelo apresentam uma herança evolutiva comum (Stoneking, 2001). Esses fatos associados à ampla ocorrência de SNPs no genoma humano, quando comparada à de outros marcadores, os tornam ideais para análises genômicas.

Os SNPs são marcadores interessantes por vários motivos. Primeiramente, um SNP, particularmente quando encontrado numa região gênica funcional, pode por si só ser responsável por diferenças na estrutura e função de proteínas, o que pode levar a doenças. Em segundo lugar, por meio de SNPs pode-se marcar ou rastrear a presença de outras diferenças genéticas que geram fenótipos de interesse. Em terceiro, eles são úteis no estudo de taxas de mutação e história evolutiva (Venter *et al.*, 2001). Nos últimos

anos, esforços têm sido feitos no sentido de rastrear e mapear o maior número possível de SNPs no genoma humano. Esse esforço é justificado, dentre outros, pelo uso do mapa de SNPs para melhor compreender a contribuição de genes individuais em doenças que tenham uma base complexa e poligênica (Dutt e Beroukhim, 2007; Altshuler *et al.*, 2008). Além disso, esses marcadores genéticos podem servir como ferramenta para estudos na área de genética forense (Butler *et al.*, 2007; Westen *et al.*, 2009) e para estudos na área de genética de populações (Weir *et al.*, 2006) particularmente para o entendimento da variação genética existente na população humana (Li *et al.*, 2008).

A ubiqüidade desses marcadores também é uma característica importante; há SNPs em alta freqüência em todas as populações humanas, e eles são abundantes em todo o genoma. Estimativas sugerem que a taxa de SNPs é de 1 a cada 200-300 pares de base do genoma. Portanto, considerando todo o genoma humano, devem existir ao menos cerca de 15 milhões de SNPs, isso sem considerar SNPs específicos de populações (Kruglyak e Nickerson, 2001; Stephens *et al.*, 2001).

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO

O metabolismo oxidativo que utiliza oxigênio como acceptor final de hidrogênios na cadeia respiratória é mais vantajoso para os organismos porque gera mais energia do que o mecanismo anaeróbico (fermentação). Entretanto, também gera os chamados radicais livres (RL), espécies químicas que contém número ímpar de elétrons. Essa configuração faz com que sejam altamente instáveis, tenham meia vida curtíssima e sejam quimicamente muito reativos. Provocam ou resultam de reações de óxido-redução e têm vida média muito curta, multiplicando-se rapidamente pelo seqüestro de elétrons de outras moléculas, que também se transformam em RL. Os RL podem apresentar o elétron não pareado centrado no átomo de oxigênio (ERO) ou no átomo de nitrogênio (ERN). (Ferreira e Matsubara, 1997). Apesar desses oxidantes serem produzidos pelo metabolismo normal do corpo, se não controlados, podem provocar danos extensivos (Cooke *et al.*, 2003). As EROs atacam os açúcares, as proteínas e as bases nitrogenadas do DNA, provocando quebras de fita simples, de fita dupla, além de aberrações cromossômicas. Os danos oxidativos ocorrem também nos lipídios das membranas celulares, levando à lise celular (Imlay e Linn, 1988).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio do sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes (Schafer e Buettner, 2001). Este processo tem sido associado

ao envelhecimento e ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo desordens inflamatórias crônicas, câncer, doenças cardiovasculares e na patogenicidade de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington e Parkinson. Portanto, o equilíbrio/desequilíbrio entre o stress oxidativo e as funções antioxidantes naturais dos organismos vivos tem papel crucial na prevenção ou no desenvolvimento dessas patologias (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Cooke *et al.*, 2003, Janaydeh, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004).

Nos sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Com a finalidade de proteção, a célula desenvolveu um sistema de defesa, podendo atuar no reparo da lesão já ocorrida, ou antes, que o agente cause a lesão, uma ação detoxificadora – representada pela atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GSTM1 e GSTT1), glutathione peroxidase (GSH-PX) além da glicoproteína plasmática tetramérica (haptoglobina), do tripeptídeo glutathione reduzida (GSH) e das vitaminas C e E (Hermes-Lima, 2004; Valko *et al.*, 2007). Também apresentam função essencial na proteção do sistema reprodutivo humano (Fujii *et al.*, 2005) e sofrem alterações na exposição a diferentes pesticidas, os quais induzem estresse oxidativo (López *et al.*, 2007).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado, ou de fase I, e as enzimas conjugadas, ou de fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas de fase I, principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs). Em contraposição, as reações da fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno, por meio das glutathione S-transferases (GSTs), UDP glucuroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (Rossit e Conforti-Froes, 2000).

A utilização de biomarcadores em estudos que envolvem o estresse oxidativo é de grande interesse (Hwang e Kim, 2007; Hwang e Bowen, 2007). A suscetibilidade aos danos causados por compostos químicos estranhos ao metabolismo individual, os chamados xenobióticos, pode ser devida a características genéticas ou adquiridas, estando associada a diferenças no metabolismo entre os indivíduos (Autrup, 2000). Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados, com a finalidade de observar se há

associação do polimorfismo das enzimas antioxidantes, em relação à suscetibilidade ao estresse oxidativo e a fisiopatologia de doenças.

1.5. SISTEMA ENZIMÁTICO DE DEFESA ANTIOXIDANTE

1.5.1. SUPERÓXIDO DISMUTASE 2 (SOD2)

A superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) é uma metaloenzima que promove uma desmutação do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), mediante um próton (H^+). Ela promove a diferenciação celular e a tumorigênese (Clair *et al.*, 1994) e a proteção contra a hiperoxia induzida pela toxicidade pulmonar (Wispe *et al.*, 1992). As superóxidos dismutases podem ser separadas em três classes: Cu-Zn-SOD ou SOD1 presente no citosol, Mn-SOD ou SOD2 presente nas mitocôndrias e SOD extracelular ou ecSOD ou ainda SOD3.

A MnSOD humana é codificada por um único gene nuclear, contendo 5 éxons e 4 íntrons, que está localizado no braço longo do cromossomo 6 (6q25) (Akyol *et al.*, 2005) (Figura 1). É sintetizada com uma seqüência-sinal mitocondrial (hidrofóbica) que permite sua passagem através da membrana e, conseqüentemente, sua importação para a mitocôndria. Na matriz mitocondrial, a seqüência-sinal é clivada e a proteína madura é montada em um tetrâmero ativo com subunidades de 23kDa (Martin *et al.*, 2009).

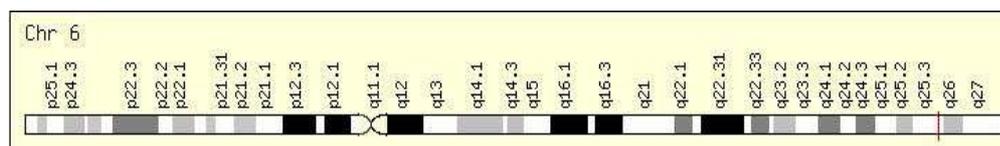


Figura 1. Posição do gene SOD2 no cromossomo 6, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOD2&search=SOD2>).

No gene da Mn-SOD humana um dos polimorfismos estudado é o que foi descoberto em 1996 (Shimoda-Matsubayashi *et al.*) e envolve uma substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) no códon 9 da seqüência-sinal mitocondrial, a qual resulta numa troca do aminoácido valina (GTT) pelo aminoácido alanina (GCT). Este polimorfismo da Val 9-Ala induz uma mudança conformacional na seqüência-sinal mitocondrial, que passa de α -hélice para β -pregueada, o que dificulta o transporte da

enzima para o interior das mitocôndrias e reduz a formação do tetrâmero ativo, diminuindo sua eficiência no combate ao estresse oxidativo (Akyol *et al.*, 2004)

A variante alélica 9-Ala do polimorfismo da Mn-SOD (ref SNP ID: rs179972) (Mitrunen *et al.*, 2001) está associada ao aumento do risco de cânceres de mama, próstata e ovário (Mitrunen *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2008), doenças esporádicas do neurônio motor, esquizofrenia (Akyol *et al.*, 2005), degeneração macular exsudativa relacionada à idade (Kimura *et al.*, 2000) e doença de Parkinson (Grasbon-Frodl *et al.*, 1999).

Esse polimorfismo apresenta variação na frequência entre os grupos étnicos, no qual o alelo alanina está presente em 14% (Cai *et al.*, 2004) dos Asiáticos e 44% dos euro-descendentes (Mitrunen *et al.*, 2001).

1.5.2. GLUTATIONA PEROXIDASE 1 (GPX1)

A glutatona peroxidase (EC 1.11.1.9) é uma enzima selênio-dependente que catalisa o peróxido de hidrogênio e demais peróxidos orgânicos, em álcool, por meio da conversão da glutatona reduzida (GSH) em GSSG. Sua ação antioxidante ocorre tanto no citosol quanto na membrana citoplasmática. O gene da GPX1 é composto por dois éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.3) (Fosberg *et al.*, 1999) (Figura 2). Em mamíferos é expressa no fígado, rins e eritrócitos (Chambers and Harrison, 1988).

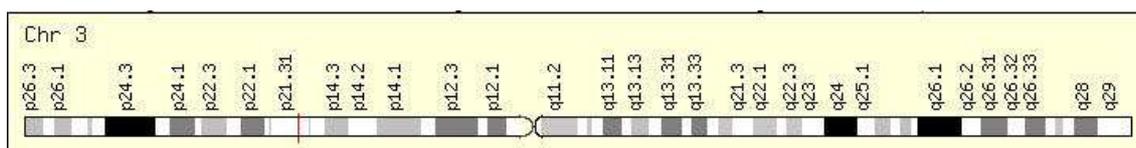


Figura 2. Posição do gene GPX1 no cromossomo 3, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1&search=GPX1>).

Um dos polimorfismos genético da GPX1 (Pro198Leu) (ref SNP ID: rs1050450) (Zhao *et al.*, 2005), o qual consiste na substituição de uma base citosina por uma timina no códon 198, inicialmente atribuída incorretamente ao códon 197, resulta na troca do aminoácido prolina pelo aminoácido leucina (Knight *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que a variante Leu afeta a atividade da enzima (Shinkai *et al.*, 2006) e está relacionada a risco de câncer de pulmão (Ratnasinghe *et al.*,

2000) e de mama (Hu e Diamond, 2003). Além disso, ela pode servir como marcador molecular para o monitoramento da recorrência do câncer de bexiga (Zhao *et al.*, 2005) e glioblastoma multiforme (Bhatti *et al.*, 2009).

A frequência da variante (Leu) varia entre os grupos étnicos; em Asiáticos é 5%, enquanto que em euro-descendentes é 36% (Zhao *et al.*, 2005).

1.5.3. CATALASE (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma heme proteína citoplasmática, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Sua presença exógena inibe lesões oxidativas do DNA submetidos à sobrecarga de Fe^{++} (Ferreira e Matsubara, 1997). O gene que codifica essa enzima localiza-se no braço curto do cromossomo 11 (11p13), possui 13 éxons e sua região promotora com 527 pares de base (pb) (Figura 3). É um complexo de quatro subunidades, cada uma com um peso molecular aproximado de 60 KDa e contém um único grupo de hematina. Em mamíferos ela pode ser encontrada em altos níveis no fígado, rins e eritrócitos (Quan *et al.*, 1986).

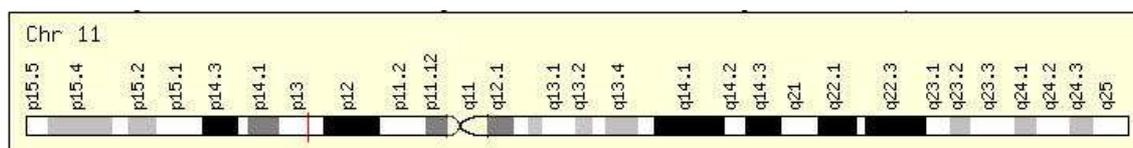


Figura 3. Posição do gene CAT no cromossomo 11, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GPX1&search=GPX1>).

Diversos SNPs foram descritos para esse gene e a maioria associado com a acatalasemia, uma doença autossômica recessiva, caracterizada por um nível de 0.2 a 4% de catalase nos eritrócitos comparado com o normal (Góth e Vitai, 1997; Góth *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2006; Flekac *et al.*, 2008). Nessa situação há uma deficiência genética dessa enzima nos eritrócitos e apresenta como manifestações clínicas a gangrena oral, alteração do metabolismo de lipídeos, carboidratos e homocisteína e aumento do risco de diabetes melitus (Góth *et al.*, 2004). O polimorfismo CAT 21A/T (ref SNP ID: rs7943316) (Ukkola *et al.*, 2001) está localizado na região promotora próxima do sítio de iniciação da transcrição e consiste na substituição de uma adenina por uma timina na posição -21, a qual não reduz a atividade da enzima e não tem sido associado à doenças (Góth *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2006). Porém, em um estudo com indivíduos de uma

população da Rússia foi observado para fumantes de genótipo AA (selvagem) um risco aumentado de asma não alérgica; além disso, indivíduos com o mesmo genótipo que tinham dieta pobre em vegetais e frutas tiveram risco aumentado para asma alérgica e não alérgica (Polonikova *et al.*, 2009).

A frequência da variante T varia entre grupos étnicos, sendo 31% em Asiáticos (Young *et al.*, 2006) e 58% em euro-descendentes (Ukkola *et al.*, 2001).

1.5.4. HAPTOGLOBINA (HAPTO)

A haptoglobina é uma glicoproteína plasmática sintetizada principalmente pelo fígado com atividade antioxidante e imunomodulatória (Langlois e Delanghe, 1996). A sua principal função é a formação de um complexo estável com a hemoglobina livre liberada no interior dos vasos sanguíneos prevenindo desta forma a excreção de ferro pelos rins e os danos causados pelo efeito oxidativo do ferro ao permanecer livre (Gutteridge, 1987; Wang *et al.*, 1993; Melamed-frank *et al.*, 2001).

O gene da haptoglobina está localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22.1), sendo que esse gene apresenta dois alelos codominantes, Hp^1 e Hp^2 , que codificam os principais genótipos da haptoglobina em humanos (Schultze e Heremans, 1966; Bowman, 1993) (Figura 4). É sintetizado um único mRNA, gerando uma única cadeia polipeptídica que é então clivada para formar as duas cadeias distintas unidas por pontes de hidrogênio (Raugei *et al.*, 1983; Koch *et al.*, 2003).

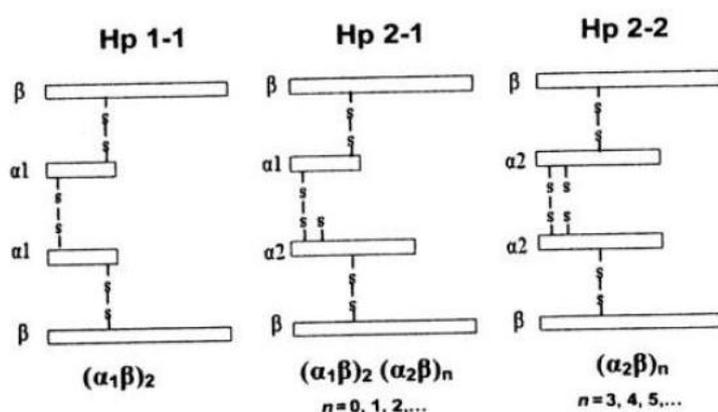


Figura 4: Desenho esquemático da estrutura da Hp humana. Todos os três fenótipos compartilham uma estrutura comum de cadeias β , enquanto Hp 1-2 e 2-2 são formas poliméricas heterogêneas. O grau de polimerização dentro do arranjo intermolecular é mostrado. Devido a um grupo tiol extra na cadeia α_2 , Hp1-2 e 2-2 podem formar grandes polímeros (Tseng *et al.*, 2004).

Em relação à expressão da haptoglobina em humanos os homozigotos para o alelo Hp^1 codificam polipeptídios para a cadeia $\alpha 1$ e β ($Hp^{1\alpha}$ e Hp^β), caracterizando o genótipo Hp1-1. Por sua vez, os homozigotos para o alelo Hp^2 codificam polipeptídios de cadeia $\alpha 2$ e β ($Hp^{2\alpha}$ e Hp^β) apresentando genótipo Hp2-2. Os heterozigotos codificam cadeias do tipo $\alpha 1$, $\alpha 2$ e β , sendo seu genótipo Hp2-1 (Smithies e Walker, 1955; Smithies *et al.*, 1962; Parker e Bearn, 1963).

Após a dissociação e caracterização dos constituintes das cadeias polipeptídicas, demonstrou-se a existência de dois tipos de cadeias $\alpha 1$: $\alpha 1F$ e $\alpha 1S$, sendo que a variação herdada nos polipeptídios desta cadeia reflete o polimorfismo das proteínas (Smithies *et al.*, 1962; Connell *et al.*, 1962, 1966). Assim existem genes correspondentes a Hp^{1F} e Hp^{1S} , alelos de Hp^1 , que codificam polipeptídeos de tamanhos iguais diferindo em dois aminoácidos.

O gene que sintetiza o alelo Hp^1 é formado por cinco exons, sendo que o exon 4 apresenta uma variação na sua seqüência de nucleotídeos com tradução de dois tipos de cadeia polipeptídicas do tipo α . Esta cadeia polipeptídica pode apresentar nas posições 52 e 53, respectivamente, ácido aspártico e lisina quando do tipo α^{1F} e asparagina e ácido glutâmico quando do tipo α^{1S} (Tabela 1). No gene que sintetiza Hp^2 esta mudança ocorre nas posições 111 e 112 da cadeia $\alpha 2$ levando a uma variação eletroforética distinguível do produto gênico (Maeda *et al.*, 1984; Van Der Straten *et al.*, 1984; Yano *et al.*, 1998).

Tabela 1. Diferenças nos aminoácidos das cadeias polipeptídicas do tipo α^{1F} e α^{1S} .

Aminoácido	α^{1F}	α^{1S}
47	Valina (GTA)	Valina (GTG)
51	Asparagina (AAT)	Asparagina (AAC)
52	Ácido aspártico	Asparagina
53	Lisina	Ácido glutâmico

(Adaptada de Carter e Worwood, 2007).

O gene que sintetiza o alelo Hp^2 apresenta 7 exons e acredita-se que ele tenha surgido após um crossing-over desigual entre os alelos Hp^{1F} e Hp^{1S} , onde os exons 3 e 4 destes alelos deram origem, respectivamente aos exons 5 e 6 do alelo da Hp^2 (Black e Dixon, 1968; Maeda *et al.*, 1984; Koch *et al.*, 2002).

O genótipo Hp1-1 é super representado em pacientes com certos tipos de câncer (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Levy, 2004; Tseng *et al.*, 2004), mas apresentou em um estudo maior atividade antioxidante (Moreira *et al.*, 2009). Por outro

lado, o genótipo Hp 2-2 é mais comum em pacientes com doenças auto-imunes, epilepsia, psicoses afetivas e abuso de álcool e drogas, além de estar relacionado com o risco a neuropatia, retinopatia e doenças cardiovasculares (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Bernard *et al.*, 2003; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Quaye, 2008). Em estudos de sucesso reprodutivo, foi observado que casais com aborto recorrente e espontâneo em que ambos os parceiros tem o fenótipo Hp1-2 há uma menor probabilidade de gerar um recém-nascido vivo (Gloria-Bottini *et al.*, 2009). Vale ressaltar, que também já foram identificadas outras alterações, como na cadeia polipeptídica β , alelo Hp^{a2} triplicado, Hp2-1 modificado e uma deleção alélica no gene levando à deficiência congênita da haptoglobina (Langlois e Delanghe, 1996; Delanghe *et al.*, 1998; Koda *et al.*, 1998; Koda *et al.*, 2000).

As freqüências dos alelos variam mundialmente dependendo da origem étnica da população: a freqüência do alelo Hp¹ varia de 7% em regiões da Índia a mais de 70% na África e América do Sul. Ambos alelos (Hp¹ e Hp²) têm sido associados à suscetibilidade a várias doenças (Carter e Worwood, 2007).

1.5.5. GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A Glutathione S-Transferase constitui uma família enzimática responsável pelo metabolismo de uma grande variedade de substâncias xenobióticas. Uma de suas principais funções é a promoção de uma catálise da conjugação da glutathione com uma ampla variedade de compostos químicos eletrofílicos que são geralmente citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. São encontradas em todos os organismos aeróbicos. Basicamente, podem ser divididas em dois grandes grupos: enzimas (diméricas) presentes no citosol ou solúveis e enzimas (triméricas) ligadas à membrana ou microsossomais (Josephy, 1997).

Inicialmente, os estudos sobre a estrutura molecular das GST revelaram a existência de quatro classes: Alfa, Mi, Pi e Teta. Com o avanço dos estudos sobre as GST solúveis, observou-se a existência de outras classes: Zeta, Omega, Sigma e Kapa (Hayes e Strange, 2000). Alguns genes têm sido bem caracterizados como polimórficos. Alguns destes polimorfismos estão associados com aumento da suscetibilidade à carcinogênese e a doenças inflamatórias (Hayes *et al.*, 2005, Rhor *et al.*, 2008).

A classe Mi das GSTs são codificadas por cinco genes diferentes localizados em tandem na região 1p13.3: GSTM1 (OMIM-138350), GSTM2 (OMIM-138380), GSTM3 (OMIM-138390) GSTM4 (OMIM-138333) e GSTM5 (OMIM-138350) (Figura 5). O

gene da glutathione S-transferase M1 é polimórfico em humanos, apresentando um alelo que leva a deficiência na atividade da enzima, causada por deleção dessa região gênica ($GSTM1^{*0/*0}$). É expressa principalmente no fígado, mas também é encontrada em grandes quantidades no estômago, cérebro e, em menores proporções, em diversos outros tecidos como o tecido cardíaco (Strange e Fryer, 1999; Strange *et al.*, 2000).

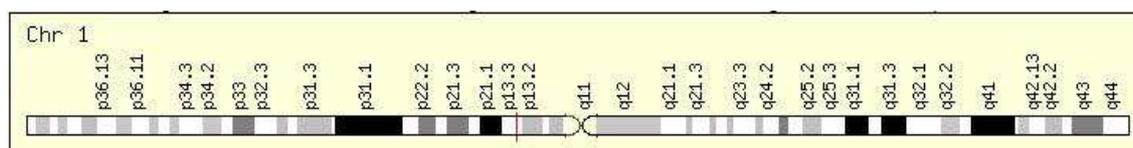


Figura 5. Posição do gene $GSTM1$ no cromossomo 1, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTM1&search=GSTM1>).

O fenótipo positivo ($GSTM1^{+/+}$), ou seja, a presença da enzima, e $GSTM1$ nulo ($GSTM1^{*0/*0}$), são determinados por três alelos, $GSTM1^{*A}$, $GSTM1^{*B}$ e $GSTM1^{*0}$. Os alelos $GSTM1^{*A}$ e $GSTM1^{*B}$, diferem em apenas um único par de bases no exon 7 e codificam monômeros da enzima que formam homo- e heterodímeros ativos. A atividade catalítica é semelhante nas enzimas homo e heterodiméricas resultantes desses alelos, o que sugere que as enzimas não diferem quanto à atividade enzimática. Já o homocigoto do alelo $GSTM1^{*0}$ não expressa esta proteína (Strange e Fryer, 1999) e sua frequência é surpreendentemente alta na maioria das populações humanas, sendo de aproximadamente 50%, com uma variação de 30%-70%, em diferentes grupos étnicos brasileiros (Hiragi *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2009; Magno *et al.*, 2009).

As GSTs da classe Teta são consideradas, do ponto de vista evolutivo, as mais ancestrais pois é detectada em quase todos os organismos vivos, ao contrário das demais classes de GST. O gene da GST classe Teta está localizado na região 22q11.2 (Landi, 2000) (Figura 6).

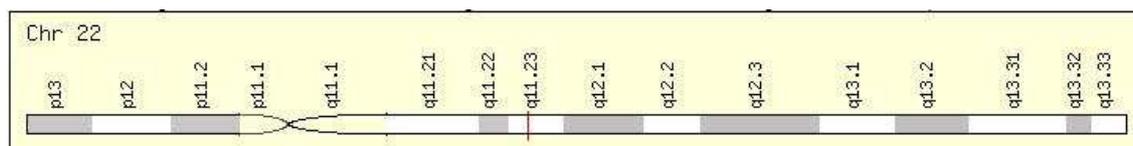


Figura 6. Posição do gene $GSTT1$ no cromossomo 22, indicado pelo traço vermelho. Extraído do site GeneCard. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTT1&search=GSTT1>).

Dentro da classe das GST Teta, pode-se subdividir a classe em dois genes distintos: GSTT1 (OMIM-600436) e GSTT2 (OMIM-600437). Esta enzima é caracterizada por um polimorfismo representado pela ausência do gene da GSTT1 e, conseqüentemente, da atividade enzimática. O alelo não funcional da GSTT1 (GSTT1^{*0}) é resultado de uma deleção parcial ou completa do gene. Estudos da atividade enzimática da GSTT1 mostram que existem 3 fenótipos: atividade alta, intermediária e ausência de atividade. A verificação do genótipo de indivíduos representantes dos três fenótipos indica que o genótipo GSTT1^{+/+}, ou seja, homocigoto para a presença do gene, possuem alta atividade enzimática. Os indivíduos homocigotos para a deleção (GSTT1^{*0/*0}) não apresentam atividade enzimática. Porém, os heterocigotos GSTT1^{+/*0*} apresentam atividade enzimática intermediária, o que caracteriza efeito de dosagem gênica. Análises de segregação dos genótipos em famílias sugerem um tipo de herança seguindo os padrões mendelianos (Landi *et al.*, 2000; Sprenger *et al.*, 2000). A frequência do alelo nulo difere com respeito à etnicidade. Na população caucasiana, o gene da GSTT1 e sua correspondente atividade enzimática está ausente em aproximadamente 20% da população caucasiana e em 80% da população asiática (Honma *et al.*, 2008; Losi-Guembarovski *et al.*, 2008; Kvitko *et al.*, 2009).

Há um especial interesse nas frequências alélicas da GSTM1 e GSTT1 porque os homocigotos de alelos nulos (GSTM1^{*0/*0} e GSTT1^{*0/*0}) não produzem essas enzimas (Pemble *et al.*, 1994; Seidegard *et al.*, 1988). Várias associações entre os genótipos nulos da GSTM1 e/ou GSTT1 com dano citogenético induzido por mutagênese (Rossi *et al.*, 2009), doenças cardiovasculares (Manfredi *et al.*, 2009) e câncer (Sing *et al.*, 2008; Hatajima *et al.*, 2008) têm sido relatadas. Além disso, nos diferentes grupos étnicos brasileiros há uma ampla variação nas frequências desses polimorfismos (Morais *et al.*, 2008; Torresan *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008).

1.6. A CONSTITUIÇÃO DA POPULAÇÃO HUMANA BRASILEIRA

A população brasileira tornou-se um objeto de interesse para estudos na área de genética de populações por ser considerada, altamente miscigenada e heterogênea, resultado de cinco séculos de cruzamentos interétnicos entre europeus, ameríndios e africanos sub-saharianos, e, mais recentemente, com indivíduos de origem asiática.(Alves-Silva *et al.*, 2000; Abe-Sandes *et al.*, 2004).

No Brasil, diferentemente dos demais países latino-americanos, o principal colonizador foi o português. Quando os colonizadores chegaram ao atual território brasileiro, encontraram na costa atlântica grupos ameríndios que pertenciam a diversos grupos lingüísticos, especialmente Tupi-guarani, dentre os quais os do grupo Jê, habitantes da região mais central do Brasil (Vainfas, 2000; Salzano e Callegari-Jacques, 1988).

Os ameríndios autóctones representavam uma população de aproximadamente 2,4 milhões de indivíduos (IBGE, 2000) quando a colonização européia se iniciou, em 1500, com a chegada de aproximadamente 500.000 portugueses, quase todos homens (Ribeiro, 1995). O tráfico de escravos começou na metade do século XVI e, até 1855, aproximadamente 4 milhões de africanos foram trazidos ao Brasil (IBGE, 2000). Dessa maneira a população brasileira trihíbrida inicial se originou da mistura entre homens europeus e mulheres ameríndias e africanas.

Godinho *et al.* (2008) estimou a contribuição dos grupos parentais africano, europeu e ameríndio a partir de marcadores microssatélites na formação das cinco regiões brasileiras. Os resultados obtidos mostraram proporções diferentes das indicadas pela autoclassificação em raças. Em geral, as contribuições ameríndia e européia são subestimadas por esse critério e a africana, superestimada. É provável que isso se deva à grande proporção de pardos observada em todo o país: essa categoria inclui indivíduos cuja ancestralidade inclui mais de um grupo parental, diluindo as contribuições ameríndia e européia.

A forma como esses grupos se distribuíram e contribuíram para a formação das populações das diversas regiões do país se reflete na distribuição diferencial de fenótipos entre elas. De acordo com a Pesquisa Nacional por Amostra Domiciliar (PNAD) realizada em 2008 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 55,2% dos mais de 189 milhões de brasileiros devem ter indicações morfológicas de contribuição africana (auto-definidos como pretos ou pardos, de acordo com a nomenclatura utilizada no levantamento). Porém, a porcentagem desta contribuição varia entre as cinco regiões brasileiras, sendo a maior encontrada na região Nordeste (76,1%). Análise de AIMs (do inglês *Ancestry Informative Markers*), marcadores informativos de ancestralidade em amostras de quatro regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste e Sul) mostraram que a contribuição africana foi de 4 a 34%, enquanto de ameríndios foi de 0 a 27% (Parra *et al.*, 2002)

1.7. JUSTIFICATIVA

A introdução de marcadores moleculares em análises genéticas revolucionou a medicina, uma vez que alguns destes constituem variações genéticas associadas a uma predisposição para doenças complexas e variações individuais na resposta a fármacos. A identificação e a genotipagem de um vasto número de polimorfismos genéticos em populações grandes têm sido importantes nos estudos populacionais e na área de farmacogenética e medicina. Entre as variações analisadas, SNPs parecem ser os mais úteis em análise genética de grande escala (Elahi *et al.*, 2004).

O recente sucesso de estudos de associação na busca de genes de suscetibilidade para muitas doenças complexas apresenta grandes oportunidades para estudos epidemiológicos de fatores de risco ambiental (Khoury e Wacholder, 2009). O conhecimento nessa linha de pesquisa nos fornecerá informações relevantes sobre a dinâmica gênica e estrutura genética da população brasileira, caracterizada por significativas miscigenações étnicas, comparada com outras populações mundiais estudadas para os marcadores moleculares citados anteriormente.

Segundo Pearce *et al.* (2005), a etnicidade de uma população é uma construção complexa que inclui biologia, história, orientação cultural e prática, idioma, religião e estilo de vida, ou seja, vários fatores que podem influenciar na saúde dos indivíduos. A ausência de amplas diferenças genéticas entre grupos étnicos, aliada à presença de grandes diferenças em estilo de vida (dieta, álcool, alojamento, tabagismo e etc.), ressalta a importância de estudos que têm por objetivo descrever a distribuição de variantes de marcadores genéticos que possam predispor determinados grupos às doenças complexas, uma vez que essa distribuição da variação genética difere entre os principais grupos humanos.

Portanto, o estudo da variação populacional desses marcadores genéticos é importante por dois motivos: (a) por meio deste é possível identificar-se as origens e compreender-se a história evolutiva e as peculiaridades genéticas de uma determinada população; e (b) essas peculiaridades podem condicionar suscetibilidades diferenciais a doenças, sua heterogeneidade, além de reações adversas a drogas farmacêuticas e alimentos (Salzano e Hutz, 2005).

Além disso, nos últimos anos vários marcadores genéticos têm sido utilizados na tentativa de caracterizar a ancestralidade, a formação e a estrutura de populações brasileiras (Suarez-Kurtz e Pena, 2006). O impacto da farmacogenômica nas pesquisas

que buscam o desenvolvimento de drogas de acordo com a heterogeneidade da população impulsionou a criação de uma rede de colaboração no Brasil, denominada de Rede Nacional de Farmacogenética/Farmacogenômica (REFARGEN) (Suarez-Kurtz, 2004). Essa rede tem como preocupação criar um banco de dados farmacogenômicos de populações brasileiras (Suarez-Kurtz, 2004) e nesse sentido os dados obtidos neste estudo podem ser úteis.

2. HIPÓTESES

- A distribuição das frequências de marcadores genéticos associados ao estresse oxidativo não apresenta padrão definido.
- Os três grupos populacionais apresentam diferenciação genética para os marcadores CAT, SOD2, GXP1, GSTM1, GSTT1 e HAPTO.
- A distribuição dos genótipos da SOD2 não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos três grupos populacionais.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi descrever a distribuição de polimorfismos nos genes de enzimas e proteínas de função antioxidantes em três grupos populacionais brasileiros compostos por indivíduos de diferentes etnias: 1. o remanescente de quilombo da região norte do estado de Goiás (Kalunga) ; 2. a tribo indígena da região de divisa do Mato Grosso e Pará (Kayabi) e 3. a população urbana da região centro-oeste (Distrito Federal). Visando atingir esse objetivo geral, foram buscados:

- a) estimar as frequências alélicas para seis marcadores genéticos (Haptoglobina, GSTT1, GSTM1, CAT, SOD2, GPX1) nos grupos populacionais brasileiros estudados;
- b) comparar a variação detectada com as descritas na literatura em diferentes populações;
- c) estimar as frequências genótípicas para todos loci e verificar se a distribuição dos genótipos encontra-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- d) analisar a diferenciação genética entre os grupos populacionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES

As amostras analisadas neste trabalho foram coletadas nos Estado de Mato Grosso (Kayabi), de Goiás (Kalunga), e no Distrito Federal. Foi aprovado pelo CEP da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília e CONEP (Processo n°. 176/2008) a utilização desse material que já havia sido coletado previamente.

De cada indivíduo foram coletados cerca de 5 ml de sangue periférico, utilizando um sistema a vácuo tendo o EDTA como anticoagulante. Essas amostras foram devidamente identificadas e refrigeradas o mais breve possível. Os critérios básicos para a escolha dos voluntários foram: aleatoriedade e com um grau de parentesco de no máximo 1/16, isto é, não apresentam parentesco até a terceira geração (avós) anterior a atual (Kayabi: n=60, Kalunga: n=72, Distrito Federal: n=172).

4.1.1. Distrito Federal

O Distrito Federal, localizado no Planalto Central do Brasil tem uma população estimada em 2.051.146 habitantes (Censo 2000 – IBGE), sendo que aproximadamente metade dos habitantes é nascida na própria região e metade são pessoas advindas de todas as regiões do Brasil, além de uma pequena participação de estrangeiros, o que torna o brasiliense um caso único quanto à sua formação. Administrativamente, é composto por 27 regiões, considerando Lago Sul e Lago Norte como regiões distintas. Entretanto, à época da coleta (2002) eram 19 regiões (sítio oficial do Governo do Distrito Federal – www.districtofederal.df.gov.br acessado em 21 de abril de 2008) e somente 13 regiões (Brasília, Ceilândia, Cruzeiro, Entorno, Gama, Guará, Lago Norte, Lago Sul, Núcleo Bandeirante, Paranoá, Planaltina, Sobradinho, Taguatinga) foram amostradas. A informação concernente à região administrativa onde habitavam os pais na época da coleta foi obtida durante a entrevista, dado esse que permitiu o agrupamento dos indivíduos por região (Tabela 2). O mapa da Figura 7 representa as regiões administrativas existentes na época da coleta.



Figura 7. Regiões Administrativas que compunham o Distrito Federal em 2002 (Fonte: Godinho, 2008), época da coleta de material biológico.

Tabela 2. Distribuição dos indivíduos componentes da amostra do Distrito Federal com relação à região administrativa da residência dos pais na época do nascimento. (Modificado, Godinho 2008).

<i>Região administrativa</i>	<i>Número de indivíduos</i>
Brasília	54
Ceilândia	9
Cruzeiro	13
Entorno	2
Gama	7
Guará	10
Lago Norte	7
Lago Sul	2
Núcleo Bandeirante	5
Paranoá	1
Planaltina	14
Sobradinho	12
Taguatinga	17
Não especificou	19
TOTAL	172

As amostras de material biológico e os dados foram coletados no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília e no curso preparatório para o Vestibular “Alunos da Unb” (Alunb) no ano de 2002. Paralelamente à coleta de material biológico, foi feito um levantamento de dados demográficos utilizando um questionário (Anexo I) respondido por todos os indivíduos que tiveram seu sangue coletado. O objetivo do questionário foi obter informações referentes a sexo, idade, ancestralidade, incluindo no mínimo uma geração ascendente, dentre outros.

A amostra foi composta por 72 homens (41,9%) e 100 mulheres (58,1%) e a média da idade dos participantes foi de 21,1 anos (desvio padrão = 3,9 anos). Com relação à autodeclaração de etnia, do total de 172 indivíduos, 120 (69,8%) se autodeclararam como mestiço entre pelo menos duas das parentais que formaram a população, isto é, branco, negro e índio, 41 (23,8%) como brancos, 3 (1,7%) como negro e 8 (4,6%) não informaram sua etnia.

Todos os procedimentos relativos à coleta do material biológico no Distrito Federal fazem parte do projeto de pesquisa “Brasília: reflexo da constituição genética brasileira?” previamente autorizado (registro nº 028/2001; processo nº 25000.102003/2001-05 e pela CONEP registro nº 2932), que tem como pesquisadora responsável a Dra. Silviene Fabiana Oliveira.

4.1.2. Kayabi

A coleta de material biológico na comunidade Kayabi fez parte de um projeto multidisciplinar que teve início ainda no final dos anos 90 e início de 2000. Esse projeto intitulado como: Projeto Integrado de Proteção a Populações Indígenas da Amazônia Legal-PPTAL teve apoio da ONG alemã Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). Um dos subprojetos que estava relacionado com a linha de suscetibilidade genética a metais neurotóxicos nessas populações gerou alguns trabalhos já publicados (Klautau-Guimarães *et al.*, 2005a; Klautau-Guimarães *et al.*, 2005b). Na aldeia, o líder deu a sua permissão para a coleta de material biológico depois que o objetivo da pesquisa foi explicado a todos da comunidade. A participação indígena (Kayabi) em todas as fases do processo foi acompanhada pela antropóloga Patrícia de M. Rodrigues com prévia aprovação do PPTAL-GTZ (Projeto Integrado de Proteção às Populações e Terras Indígenas da Amazônia Legal).

A tribo ameríndia Kayabi tem como linguagem o Tupi-Guarani (Rodrigues, 1994), sua população é de cerca de 110 habitantes que ocupam principalmente uma área

do Parque Nacional Indígena do Xingu (Mato Grosso). Houve um total de 60 participantes da aldeia que está localizada na margem direita do Rio Teles Pires, também conhecido como Rio São Manuel na divisa do Pará com Mato Grosso. A amostra foi coletada no ano de 2000 e foi composta de 31 homens (51,7%) e de 29 mulheres (48,3%) com idade média de 24,5 anos.

4.1.3. Kalunga

Kalunga é o remanescente de quilombo mais importante numericamente (cerca de 5300 habitantes) e historicamente da região Centro-Oeste e um dos maiores do Brasil. A comunidade ocupa uma área de aproximadamente 258 mil hectares na zona rural do Nordeste do estado de Goiás, próxima às cidades de Monte Alegre e Cavalcante, a 320 quilômetros de Brasília. Está estruturado em várias subcomunidades, como, por exemplo, Vão de Almas, Vão de Moleque e Engenho. Estas estão dispersas pelo território Kalunga, sem que haja, entretanto, um isolamento geográfico entre elas. Apesar disso, há uma identidade dos próprios habitantes em relação a qual subcomunidade eles pertencem.

Sua população é formada por descendentes de escravos que foram levados para a região da atual cidade de Monte Alegre para trabalharem nas “Minas do Tocantins”. De acordo com Soares (1995), escravos teriam fugido das minas no final do século XVIII e formado o quilombo. Entretanto, alguns moradores contam que seus ancestrais foram abandonados pelos bandeirantes quando o ouro das minas acabou. Com receio de que voltassem para buscá-los, se embrenharam ainda mais nos matagais e lá viveram escondidos por várias décadas (Meegen-Silva 1999). Ao longo do tempo, vilas e cidades cresceram nas proximidades da área Kalunga e, com o tempo, os quilombolas começaram a ter relações comerciais com os habitantes dos centros urbanos (Meegen-Silva, 1999).

Até 1984 a população encontrava-se em uma vida de subsistência, e, sem a posse de suas terras, era constantemente ameaçada por grileiros. Nesse ano, baseada no artigo 68 da ADCT (Ato das Disposições Constitucionais Transitórias), que afirma que “Aos remanescentes das comunidades dos quilombos que estejam ocupando suas terras é reconhecida a propriedade definitiva, devendo o Estado emitir-lhes os títulos respectivos”, a antropóloga Mari de Nazaré Baiocchi em conjunto com a comunidade requisitou ao IDAGO (Instituto de Desenvolvimento Agrário de Goiás) o direito dos

Kalungas à posse das terras (Soares, 1995). Em 2000, a comunidade foi oficialmente reconhecida como remanescente de quilombo pelo governo federal.

A comunidade de Kalunga foi visitada a partir do ano 2002. Para o esclarecimento da comunidade quanto aos objetivos desta pesquisa, houve reuniões e palestras com grupos de pessoas. Além da doação do material biológico foi preenchido um questionário que, entre outros aspectos visava avaliar se a pessoa teria alguma doença genética. Não houve ocorrência de nenhum desses casos. A amostra foi composta por 30 homens (42%) e 42 mulheres (58%) e a média da idade dos participantes foi de 42,9 anos (desvio padrão = 3,9 anos).

Todos os procedimentos relativos à coleta do material biológico em Kalunga fazem parte do projeto de pesquisa “Avaliação Genético-Epidemiológica e Ecotoxicológica de Populações Humanas Afro-Brasileiras” previamente autorizado (registro nº 030/2002; processo nº 25000.096942/2002-86 e pela CONEP registro nº 4514), que tem como pesquisadora responsável a Dra Silviene Fabiana Oliveira.

4.2. *Processamento das amostras biológicas e extração de DNA*

4.2.1. *Processamento das amostras*

As amostras das três populações foram processadas no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília seguindo o mesmo procedimento. O sangue total foi separado em três frações: plasma, leucócitos e células vermelhas. Primeiramente, o plasma foi separado e colocado em tubos de polipropileno etiquetados utilizando códigos de forma a manter a privacidade do doador. Em seguida, solução salina isotônica foi acrescentada ao tubo de coleta e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e houve separação de uma fração contendo hemácias e leucócitos em 2 tubos de polipropileno. Em seguida, foram feitas mais duas lavagens em solução salina isotônica, homogeneização e centrifugação. Após a 3ª lavagem, foi separada uma pequena porção das hemácias lavadas para a realização de fenotipagem sanguínea subsequente. Ao que não foi separado, foi acrescentada solução de glicerol a 40% em tampão de estocagem (citrato de tripotássio (0,1M), fosfato bibásico de potássio (0,0345M) e fosfato monobásico de potássio (0,0344M)) à temperatura ambiente na proporção de 1:1. Essa mistura foi homogeneizada e colocada em tubos de polipropileno também identificados pelos

códigos das amostras. Todo o material processado foi congelado e está sob a guarda do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

A fração leucocitária foi utilizada para a extração de DNA utilizando, a priori, o kit de extração comercial “Illustra™ blood genomic Prep Mini Spin” da GE Healthcare. O DNA extraído foi quantificado e armazenado em microtubos devidamente etiquetados de forma que não se permita a identificação individual dos doadores. As amostras estão armazenadas a 4°C para utilização e uma fração está estocada a -80°C para integrar o Banco de DNA do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

4.2.2. Extração de DNA e verificação em gel de agarose

À época da coleta, as amostras do estado de Kayabi e Kalunga foram submetidas à extração de DNA por meio do kit “Illustra™ blood genomic Prep Mini Spin” da GE Healthcare, seguindo as recomendações do fabricante, enquanto que as amostras do Distrito Federal foram submetidas à extração de DNA pela técnica Salting out (Miller *et al.*, 1988) com modificações (4.2.2.1). Para o desenvolvimento do presente estudo as amostras que necessitaram ser re-extraídas, foram submetidas à extração por meio do Kit de extração. Após extração, as amostras de DNA foram conservadas em freezer a 4°C até o momento do uso.

Para verificação da qualidade e quantidade de DNA por amostra, foi utilizado gel de agarose a 1% com brometo de etídio para visualização, utilizando um transiluminador de luz ultravioleta. Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para 50ng/μl e armazenadas em freezer a 4°C até o momento do uso.

4.2.2.1. Extração de DNA: Método “Salting Out”

Um volume inicial da parte leucocitária de 200 μL em 200μL de tampão Buffer A (sacarose 0,32 M; Tris HCl 10 mM pH 7,6; MgCl₂ 5 mM; Triton X 100 1%) resfriado foi centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 150 μL de tampão Buffer B(EDTA 25 mM pH 8,0; NaCl 75 mM). À solução, foi adicionado 20 μL de SDS 10% e 2,2 μL de proteinase K (10mg/μL), que então foi incubada a 55°C por 1h30. Após a incubação, foi adicionada uma quantidade de NaCl saturado (6 M) que variou de 65 a 80 μL, para que então o tubo fosse centrifugado a 9000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante, resultado da centrifugação, foi transferido para outro tubo de 1,5 μL, ao qual foi

adicionado 467 μL de isopropanol. A solução foi então agitada até a formação de “medusa” e centrifugada a 11000 rpm durante 4 minutos. O etanol foi então descartado e a solução foi deixada para secagem à temperatura ambiente. O material depositado no fundo do tubo foi ressuspensionado em 50 μL de TE (1X - pH 8,0) e então incubado a 73° C por uma hora.

4.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e visualização dos produtos de amplificação

Foram estudados ao todos seis marcadores genéticos (Tabela 3). As reações de PCR foram preparadas com um volume final variável, dependendo do marcador. A cada conjunto de reações foi incluído controle negativo, isto é, no lugar da amostra de DNA foi acrescentada água milli-Q. As concentrações dos reagentes (Tabela 3) foram levemente distintas entre os marcadores e para cada marcador genético foi utilizado um conjunto de iniciadores específicos (Tabela 4. Na mistura da reação preparada foi adicionado o DNA correspondente a cada amostra, seguido de ligeira homogeneização e depois acrescentado uma gota de óleo mineral para prevenir evaporação dos reagentes. Os microtubos contendo todos os reagentes (4.2.3.1) foram colocados em um termociclador MJ Research – PTC 100, programado para as seguintes condições de reação: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; ciclos de desnaturação (94°C; 45 segundos) pareamento (variável) / extensão (72°C; 2 minutos) das amostras de DNA por 30 ciclos, de acordo com as temperaturas de anelamento especificadas para cada marcador (Tabela 3) e extensão final por 10 minutos a 72°.

4.2.3.1. PCR

Reagentes e soluções:

- * Amostras de DNA genômico (50 ng/ μL)
- * Tampão de reação (Tris/HCl 0,2 M pH 8,5; KCl 0,5 M; MgCl₂ 0,02 M)
- * Solução de MgCl₂ 50 mM
- * Solução de dNTP 10 mM (cada dNTP);
- * Taq DNA Polimerase;
- * Solução de trabalho dos iniciadores (10 μM):

Os iniciadores foram diluídos com água milli-Q esterilizada para uma concentração de 50 μM utilizando-se para base de cálculo a quantidade de nanomoles obtidos na síntese destes (dados fornecidos pelo fabricante). Uma alíquota de 100 μL de

iniciadores diluídos foi então depositada em tubo, para serem estocados em freezer (-20°C) até o momento do uso. Para uso durante os procedimentos de PCR, prepararam-se soluções de trabalho, com os dois iniciadores necessários para a amplificação de cada região genômica selecionada, na concentração de 10 µM de cada iniciador.

** Observação: Todas as reações foram realizadas tomando-se o cuidado com o controle de qualidade interno, utilizando controles positivo e negativo para cada sistema.

Tabela 3. Condições da mistura para a reação de PCR para os marcadores genéticos analisados.

<i>Marcador</i>	<i>Reagentes</i>						
	Água mili-Q (µL)	Tampão (µL)*	dNTP (µL)**	Iniciador (µL)***	MgCl ₂ ****	Taq polimerase (unidade)	DNA (50ng)
CAT	6,30	1,25	0,75	1,30	0,35	1,00	1,00
SOD2	6,30	1,25	0,75	1,30	0,35	1,00	1,00
GPX1	7,12	1,25	0,32	2,50	0,13	2,00	1,00
GSTM1	8,37	1,25	0,13	0,90	-	0,50	1,00
GSTT1	8,37	1,25	0,13	1,00	-	0,50	1,00
HAPTO	8,10	1,56	1,25	0,50*****	0,63	0,25	1,00

* solução composta por Tris/HCl 0,2 M pH 8,5; 0,5 M KCl; 0,02 M de MgCl₂.

** Solução com 10 mM de cada dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

*** 10 µM específico para cada locus.

**** Solução de cloreto de magnésio a 50 mM.

***** Quantidade para cada iniciador.

Tabela 4. Seqüência dos iniciadores e temperatura de anelamento para os marcadores: SOD2, GPX1, CAT, GSTM1, GSTT1 e haptoglobina

<i>Marcador /Referência</i>	<i>Seqüência do Iniciador</i>	<i>Temperatura de anelamento(°C)</i>
SOD2 Akyol et al., 2004	(5´ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG3´) (5´GCGTTGATGTGAGGTTCCAG 3´)	61
GPX1 Zhao et al., 2005	(5´-AGCCCAACTTCATGCTCTTC-3´) (5´-CAGGTGTTCCCTCCTCGTAG-3´)	64
CAT Flekac et al., 2008	(5´-AATCAGAAGGCAGTCCTCCC-3´) (5´-TCGGGGAGCACAGAGTGTAC-3´)	60
GSTM1 Fryer et al., 1993	(5´-GCTTACCGTGTTATGGAGGTT C-3´) (5´-TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC-3´) (5´-TTGGGAAGGCGTCCAAGCAG-3´)	62
GSTT1 Kempkes et al., 1996	(5´-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3´) (5´-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3´) (5´-CAGGAGTATACACCTTAAATG-3´)	62
HAPTO Yano et al., 1998	(5´-TTATCCACTGCTTCTCATTG-3´) (5´- TTACTGTTAGCGAACCGA-3´) (5´-AATTTAAAATTGGCATTTCGCC-3´) (5´-GCAATGATGTCACGGATATC-3´)	58

4.2.3.2. Procedimentos para a reação de restrição

O preparo do sistema, no geral, foi da seguinte forma:

- a) Preparava-se um mix contendo tampão da enzima e 1,0U da enzima;
- b) Adicionava-se 5,0 μL do produto de PCR;
- c) Após a vedação da placa, incubava-se em banho-maria (temperatura e tempo específicos para cada enzima na Tabela 5);
- d) Após a incubação os produtos de digestão eram visualizados em gel de poli-acrilamida a 6 ou 10%, conforme o marcador.

Tabela 5. Concentração dos reagentes utilizados nas reações de restrição dos produtos de PCR dos marcadores do tipo SNPs, temperatura ótima da enzima e tempo de restrição.

<i>Marcador</i>	<i>Reagentes</i>					
	Água Mili-Q (μL)	Tampão (μL) *	BSA Acetilado (μL) **	Enzima (μL) ***	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (h)
CAT (Hinf I)	6,70	0,60	-	0,25	37	4
SOD2 (NgoMIV)	6,15	1,00	0,10	0,25	37	4
GPX1 (ApaEI)	6,70	0,60	-	0,30	30	12

* Tampão da enzima composto por: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl para as enzimas HinfI e ApaEI; 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl e 50 mM KCl para a enzima NgoMIV;

** Soroalbumina Bovina (500 $\mu\text{g/ml}$).

*** Concentração = 10 U/ μL .

4.2.3.3. Procedimentos para Eletroforese - Análise do produto de PCR e de Restrição

Gel de Poliacrilamida – Eletroforese vertical

Soluções para gel

- * Tampão TBE 10X pH 8,0 (Tris/HCl 0,89 M, EDTA 0,08 M, Ácido Bórico 0,89 M);
- * Solução acrilamida 29% e bis-acrilamida 1%;
- * Glicerol;
- * TEMED (N,N,N',N', tetrametiletilenodiamina);
- * Persulfato de potássio ou amônia (APS) a 0,1%.

Preparo das amostras para aplicação no sistema de eletroforese

As amostras (produto da PCR e da restrição) foram preparadas para eletroforese adicionando-se tampão de corrida (TBE 1X), acrescido do corante bromofenol, na proporção de 2 μ L de corante para 5 μ L do produto de PCR ou restrição.

Procedimento

Após a assepsia, as placas de vidro foram montadas com espaçadores e prendidas com grampos de aço. A solução de poliacrilamida foi preparada nas concentrações de 6% e 10% de acordo com protocolo descrito na Tabela 6. Em seguida os catalisadores TEMED e Persulfato de Amônia foram adicionados na proporção descrita na Tabela 5 para que então a solução fosse entornada na placa preparada. Tempo médio de polimerização: 30 minutos.

À cuba de eletroforese foi adicionada solução de TBE 1X preparada pela diluição de solução estoque de TBE concentrada, que, por sua vez, foi preparada segundo este protocolo: 108,0 g de TRIS; 55,0 g de Ácido Bórico; 9,3 g de EDTA e 1L de água destilada. Após a montagem das placas na cuba, a voltagem da eletroforese foi programada para 50 volts durante os primeiros 20 minutos, para que então fosse aumentada para 150 a 200V, de acordo com o sistema. A corrida variava de 3 a 5 horas

conforme o marcador. Para os géis de poliacrilamida a 6% foi aplicada voltagem de 200 V por 3 horas e, para os géis a 10%, 150 V por 5 horas.

Tabela 6. Preparo da solução para géis de poliacrilamida a 6% e a 10%.

Géis (%)	Reagentes						Volume Final
	Solução de acrilamida	Glicerol	Água	TBE 10X	TEMED	APS	
6%*	4 ml	1,4 ml	12,4 ml	2 ml	15 µL	300 µL	≈20 ml
10%**	6 ml	1,4 ml	9,60 ml	2 ml	15 µL	300 µL	≈20 ml

* marcadores: CAT, SOD2, GSTM1, GSTT1 e HAPTOGLOBINA

** marcador: GPX1

Soluções para o processo de coloração

a) Solução Fixadora

750 ml de H₂O destilada.

144 ml de Álcool Etilico.

6,0 ml de Ácido Acético.

b) Solução Reveladora.

22,5 g de NaOH.

Completar para 1L de H₂O destilada.

c) Solução de prata 10%

1 g nitrato de prata

10 mL de água destilada

A coloração foi feita adicionando-se ao gel, primeiramente, a solução fixadora por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1mL de nitrato de prata e manteve-se em agitação por 5 minutos. O gel foi lavado com água destilada e mergulhado em solução reveladora previamente aquecida (70°C), com 500µl de formaldeído, até que as bandas se tornassem visíveis.

4.3. Análise da variação dos marcadores genéticos

Os sistemas CAT, SOD2 e GPX1 foram analisados por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), técnica que consiste em amplificar as regiões de interesse por PCR, que são então submetidas à digestão enzimática, utilizando enzimas específicas para cada marcador.

4.3.1. Variação na região promotora do gene da Catalase (21 A/T)

A análise dessa variação foi realizada por reação em cadeia de polimerase seguida de digestão enzimática (PCR-RFLP) de acordo com protocolo apresentado por Flekac *et al.* (2008). Os fragmentos gerados após a digestão enzimática (Figura 8) são:

Alelo T CAT 21: 250pb

Alelo A CAT 21: 177pb + 73pb

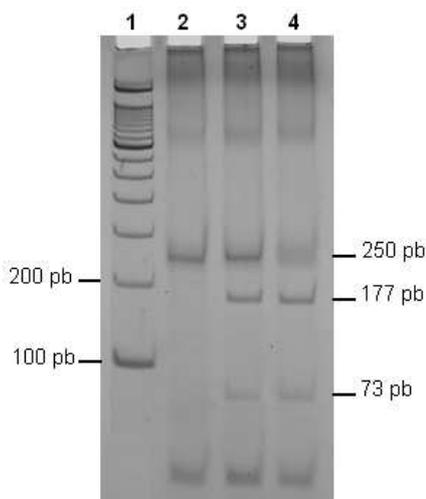


Figura 8. Perfil eletroforético do polimorfismo CAT 21A/T (ref SNP ID: rs7943316) através de gel poliacrilamida 6% não-desnaturante. 1 – Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder); 2- Homozigoto TT; 3 – Heterozigoto AT; 4 – Homozigoto AA. O tamanho dos produtos de restrição estão indicados nas laterais.

4.3.2. Variação do gene da Superóxido Dismutase 2 (Val 9-Ala)

A análise dessa variação foi realizada por reação em cadeia de polimerase seguida de digestão enzimática (PCR-RFLP) de acordo com protocolo apresentado por Akyol *et al.* (2004). De acordo com o protocolo proposto, os fragmentos gerados após a digestão enzimática (Figura 9) são:

Alelo T SOD2 Val 9 – 107pb

Alelo C SOD2 Ala 9 – 89pb + 18pb

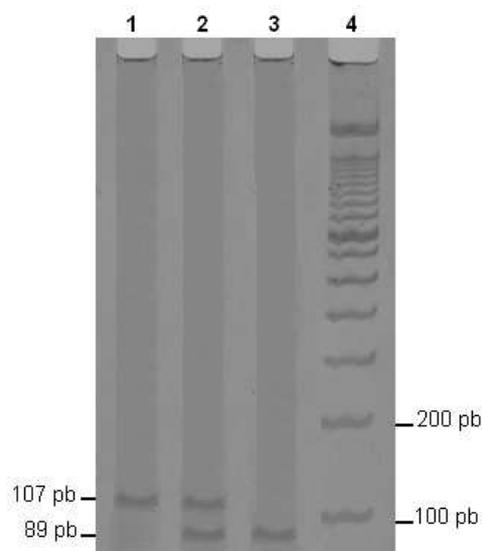


Figura 9. Perfil eletroforético do polimorfismo Val 9-Ala da Mn-SOD (ref SNP ID: rs179972) através de gel poliacrilamida 6% não-desnaturante. 1 - Homozigoto Val/Val; 2 - Heterozigoto Val/Ala; 3 - Homozigoto Ala/Ala; 4 – Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder). O tamanho dos produtos de restrição estão indicados nas laterais

4.3.3. Variação do gene da Glutathiona S-Transferase *Mu* 1

A análise dessa variação foi realizada por reação em cadeia de polimerase (PCR) de acordo com protocolo apresentado por Fryer *et al.* (1993). Os fragmentos gerados após a PCR (Figura 10) serão:

Alelo GSTM1^{*0}: 268pb (β -globina – controle interno).

Alelo GSTM1^{*+}: 132pb (GSTM1) + 268pb (β -globina – controle interno).

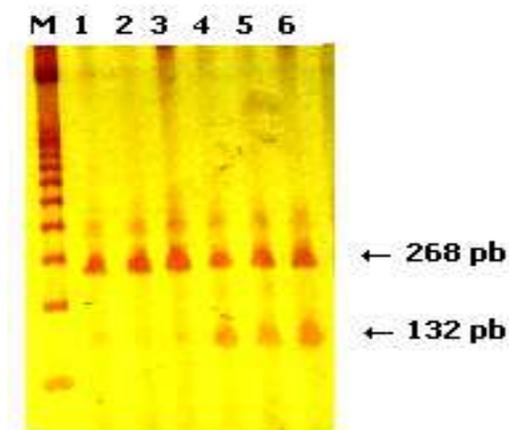


Figura 10: Gel de poliacrilamida 6% não desnaturante para detecção do polimorfismo do gene da GSTM1. Os produtos da PCR são fragmentos de 268 pb e 132 pb, que correspondem à presença do gene da β -globina e da GSTM1. M corresponde ao marcador de 100 pb, nas linhas 1, 2 e 3 estão representados indivíduos com o fenótipo nulo GSTM1^{0*/0*} e nas linhas 4, 5 e 6 os indivíduos com o fenótipo positivo GSTM1^{+/+}.

4.3.4. Variação do gene da Glutathione S-Transferase *Teta 1*

A análise dessa variação foi realizada por reação em cadeia de polimerase (PCR) de acordo com protocolo apresentado por Kempkes *et al.* (1996). Os fragmentos gerados após a PCR (Figura 11) serão:

Alelo GSTT1^{*0} : 268pb (β -globina – controle interno).

Alelo GSTT1^{*+} : 480pb (GSTT1) + 268pb (β -globina – controle interno)

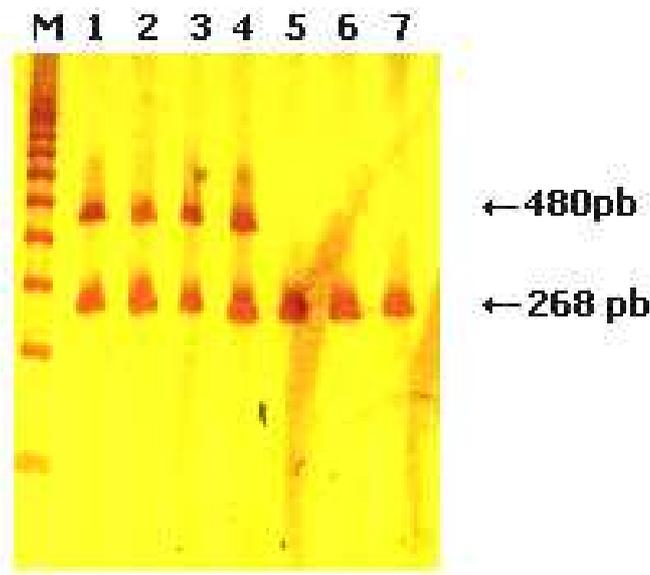


Figura 11: Gel de poliacrilamida 6% não desnaturante para detecção do polimorfismo do gene da GSTT1. Os produtos da PCR são fragmentos de 268 pb e 480 pb, que correspondem à presença do gene da β -globina e da GSTT1. M corresponde ao marcador de 100 pb, nas linhas 1, 2, 3 e 4 estão representados indivíduos com o fenótipo positivo GSTT1^{+/+}, enquanto que nas linhas 5, 6 e 7 os indivíduos com o fenótipo nulo GSTT1^{0*0*}

4.3.5. Variação do gene da Glutathione Peroxidase 1 (Pro198Leu)

A análise dessa variação foi realizada por reação em cadeia de polimerase seguida de digestão enzimática (PCR-RFLP) de acordo com protocolo apresentado por Zhao *et al.* (2005). De acordo com o protocolo proposto, os fragmentos gerados após a digestão enzimática (Figura 12) são:

Alelo C GPX1 Pro 198 – 195pb + 117pb + 88pb

Alelo T GPX1 Leu 198 – 205pb + 195pb

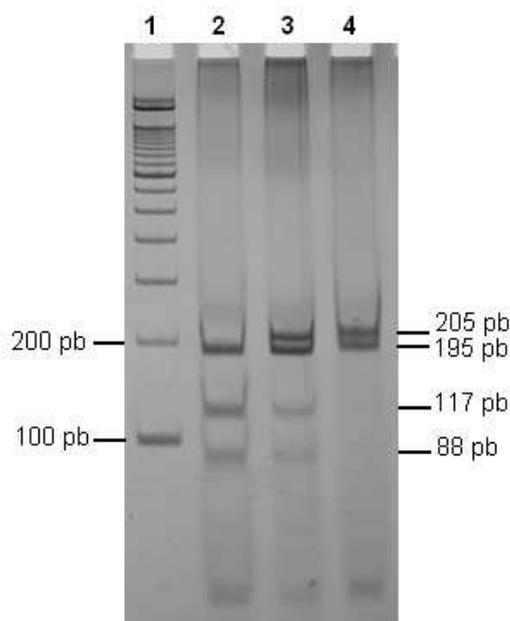


Figura 12. Perfil eletroforético do polimorfismo GPX1 (Pro198Leu) (ref SNP ID: rs1050450) através de gel poliacrilamida 10% não-desnaturante. 1 – Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder); 2- Homozigoto Pro/Pro 3 – Heterozigoto Pro/Leu; 4 – Homozigoto Leu/Leu. O tamanho dos produtos de restrição estão indicados nas laterais.

4.3.6. Polimorfismo do gene da haptoglobina

Os genótipos da haptoglobina foram determinados por PCR (Polymerase Chain Reaction) alelo-específica como descrito por Yano *et al.* (1998). Os pares de primers usados para a genotipagem e a identificação dos alelos Hp*1F, Hp*1S and Hp*2 foram analisados em sistemas independentes, onde foram usados três PCRs para cada amostra. De acordo com o protocolo proposto, os fragmentos gerados após a PCR (Figura 13) serão:

Hp^{*1F} -1,4kb

Hp^{*1S} -1,2kb

Hp^{*2} -935pb

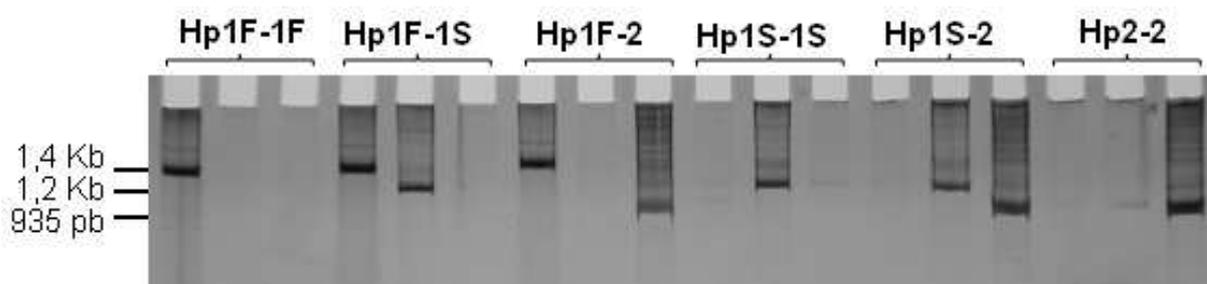


Figura 13. Perfil eletroforético do polimorfismo da cadeia α da haptoglobina através de gel poliacrilamida 6% não-desnaturante. Cada genótipo está representado em três poços do gel.

4.4. Eletroforese e análise fenotípica

Os produtos de PCR, no caso dos marcadores do tipo deleção ou duplicação (GSTM1, GSTT1 e Haptoglobina) ou das digestões, no caso dos SNPs (CAT, SOD2 e GPX1) foram analisados em negatoscópio após eletroforese vertical em gel de poliacrilamida corado com solução de nitrato de prata a 10%. A concentração do gel de poliacrilamida do tipo não desnaturante utilizado para o marcador GPX1 foi 10% e para os demais marcadores foi 6% (Tabela 5).

As determinações dos perfis alélicos e genotípicos foram realizadas por comparações visuais entre os alelos padrões e o alelo presente em cada amostra ou então com o auxílio de uma escada alélica. As leituras dos géis foram realizadas com auxílio de um transiluminador – Macro VUE UVIS-20 - com luz branca (visível).

4.5. Análise estatística

4.5.1. Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas para os genes CAT, SOD2, GPX1 e HAPTOGLOBINA foram obtidas por contagem direta utilizando o programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Para as variantes dos genes GSTM1 e GSTT1 somente as frequências alélicas foram calculadas como descrito acima. Os dados obtidos das variantes dos genes GSTM1 e GSTT1 foram dominantes, ou seja, a metodologia utilizada somente permitiu que os indivíduos fossem classificados como positivos ou nulos (deleção destes genes).

4.5.2. Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A distribuição dos fenótipos/genótipos de um dado locus segue, obedecidas a certas premissas, a expansão de polinômios (Weir, 1996), de acordo com o número de alelos desse locus. A essa situação chamamos Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e espera-se que os fenótipos/genótipos sejam assim distribuídos em situações normais. Estabelecendo como H_0 a situação de equilíbrio (distribuição aleatória dos gametas), para verificação da concordância com essa situação, foi utilizado o teste descrito por Guo e Thompson (1992) executado pelo programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) utilizando o método da cadeia de Markov.

4.5.3. Comparação das frequências gênicas e genotípicas

As frequências gênicas obtidas para Kayabi, Kalunga e Distrito Federal foram comparadas entre si pelo teste exato de Fisher, realizado pelo programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). A hipótese nula considerada é de que a distribuição alélica/genotípica é idêntica nos pares de populações analisados.

4.5.4. Diferenciação genética

O teste do Qui-Quadrado de heterogeneidade (Beiguelman, 1988) foi utilizado para testar se as frequências alélicas ou genotípicas de um locus em várias amostras são homogêneas. A H_0 considerada é de que as distribuições das frequências alélicas não diferem entre as amostras (podem ser consideradas homogêneas). A H_A considerada é de que as distribuições das frequências alélicas diferem entre as amostras (podem ser consideradas heterogêneas).

4.5.5. Estatísticas F

As estatísticas F foram calculadas usando o programa Genetic Data Analysis – GDA (Lewis e Zaykin, 1997) de acordo com o descrito por Weir (1984). O parâmetro definido como índices de fixação baseados na heterozigose média observada e esperada em cada amostra foi o F_{IS} (coeficiente de endogamia em uma população) (Weir, 1996). Para análise do parâmetro F_{ST} (mede a diferenciação das amostras) foi utilizado o programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

4.5.5.1. Definição dos intervalos de confiança e valores de p para as estatísticas F

Para determinar intervalos de confiança (IC) para essas estimativas e, assim, poder extrapolar os resultados obtidos a partir das amostras para as populações (Weir,1996), foi utilizado o Bootstrapping como metodologia de re-amostragem. Essa metodologia simula a obtenção de diferentes amostras da população amostrando vários conjuntos a partir da amostra original e analisando separadamente cada conjunto. Dessa forma, são definidos ICs em que X% das estimativas estejam inseridas, ou seja, é determina que o parâmetro real apresente probabilidade de 95% ou 99% de ser um valor presente dentro do intervalo estabelecido. No presente estudo, foram analisados ICs de 95% e 99%, mais amplos, para as estatísticas F obtidos por Bootstrapping com 1000 replicações. E nos dados utilizados no programa Arlequin versão 3.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005), a hipótese nula considerada foi a ausência de diferenciação entre as populações analisadas. Para determinar se o *Fst* foi significativo ou não, o nível de significância (α) estabelecido foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Descrição das frequências alélicas nos três grupos populacionais

A Tabela 7 mostra a distribuição da variação dos seguintes loci: GSTM1, GSTT1, haptoglobina, SOD2, CAT, GPX1 nos grupos populacionais brasileiros analisados neste estudo.

Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas de SOD2^{*C}, CAT^{*T}, GPX1^{*T}, GSTM1^{*0}, GSTT1^{*0}, Hp^I, Hp^{IS}, Hp^{IF} e Hp² nos grupos populacionais analisados nesse estudo.

	Kayabi (n=60)	Kalunga (n=72)	Distrito Federal (n=172)
SOD2 ^{*C}	0,68	0,51	0,40
CAT ^{*T}	0,26	0,52	0,38
GPX1 ^{*T}	0,03	0,18	0,33
GSTM1 ^{*0}	0,55	0,53	0,63
GSTT1 ^{*0}	0,45	0,58	0,49
Hp ^I	0,45	0,60	0,51
Hp ^{IF}	0,03	0,30	0,15
Hp ^{IS}	0,42	0,30	0,36
Hp ²	0,55	0,40	0,49

5.2. Comparação das frequências gênicas e genotípicas

As comparações das frequências alélicas (diferenciação gênica e genotípica) observadas para os marcadores codominantes nos grupos populacionais de Kayabi, Kalunga e Distrito Federal mostraram diferenças altamente significativas ($p < 0,05$) entre os três pares de populações. A Tabela 8 mostra os valores de p obtidos nesses testes.

Tabela 8. Valores de p obtidos pelo teste para diferenciação gênica e genotípica entre os pares de populações analisadas.

Grupos populacionais	Diferenciação	
	Gênica (p)	Genotípica (p)
Kayabi x Kalunga	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
Kayabi x DF	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$
Kalunga x DF	0.000000	0.000002

5.3. Teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e de heterogeneidade

A Tabela 9 apresenta a distribuição das frequências genotípicas para os marcadores estudados e os resultados do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de heterogeneidade.

A distribuição dos genótipos da CAT encontra-se em EHW nos três grupos populacionais ($p > 0,05$). Para o marcador SOD2 a distribuição dos genótipos não se encontra de acordo como esperado pelo EHW ($p < 0,05$) nos três grupos populacionais estudados. O locus da HAPTO nos grupos populacionais do Distrito Federal e Kayabi e o locus GPX1 no grupo populacional Kalunga mostraram desvios significativos ($p < 0,05$). A distribuição dos genótipos da CAT, SOD2, HAPTO e GPX1 é heterogênea entre os grupos populacionais ($p < 0,0001$) e para os marcadores GSTM1 e GSTT1 a distribuição é homogênea ($p > 0,05$).

Tabela 9. Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de heterogeneidade para os polimorfismos da CAT, SOD2, GPX1, GSTM1, GSTT1 e haptoglobina nas amostras deste estudo.

Genótipos/Fenótipos	Kayabi (n=60)		Distrito Federal (n=172)		Kalunga (n=72)		Teste de heterogeneidade
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
CAT							$\chi^2_{(gl=4)} = 47,44$ $p < 0,0001$
AA	32	32.9	25	24.9	15	16.5	
AT	25	23.2	81	81.1	39	35.9	
TT	03	3.90	66	65.9	18	19.5	
Teste de Hardy-Weinberg	$p = 0,74$		$p = 1,00$		$p = 0,64$		
SOD2							$\chi^2_{(gl=4)} = 72,48$ $p < 0,0001$
TT	2	5.90	34	61.7	12	17.1	
CT	34	26.2	138	82.6	46	35.9	
CC	24	27.9	0	27.7	14	19.1	
Teste de Hardy-Weinberg	$p^* = 0,03$		$p^* = 0$		$p^* = 0,03$		
GPX1							$\chi^2_{(gl=4)} = 45,58$ $p < 0,0001$
CC	57	56.1	80	76.2	51	48.6	
CT	2	3.9	69	76.6	16	21.3	
TT	1	0.1	23	19.2	5	2.4	
Teste de Hardy-Weinberg	$p = 0,05$		$p = 0,23$		$p^* = 0,04$		
HAPTO							$\chi^2_{(gl=10)} = 103,86$ $p < 0,0001$
1F1F	0	0.58	12	25.0	3	11.2	
1F1S	2	0.82	14	13.4	15	6.2	
1S1S	2	0.10	32	11.7	6	5.1	
1F 2	1	4.21	13	40.6	23	16.6	
1S 2	45	42.50	43	35.1	15	13.5	
2 2	10	11.78	55	43.3	9	18.3	
Teste de Hardy-Weinberg	$p^* = 0$		$p^* = 0$		$p = 0,19$		
GSTM1							$\chi^2_{(gl=2)} = 3,87$ $p = 0,14$
GSTM1 ⁺	0,55		0,47		0,37		
GSTM1 ^{*0}	0,45		0,53		0,63		
GSTT1							$\chi^2_{(gl=2)} = 3,37$ $p = 0,19$
GSTT1 ⁺	0,45		0,58		0,49		
GSTT1 ^{*0}	0,55		0,42		0,51		

* $p < 0,05$

5.4. Estatísticas F

F_{IS} – Coeficiente de endogamia

O coeficiente de endogamia – F_{IS} – encontrado para os três grupos populacionais não foi significativo, quando considerado um intervalo de confiança de 95% ou 99% (Tabela 10), visto que o intervalo incluiu o zero.

Tabela 10. Valores de F_{IS} nos grupos populacionais de Kayabi, Kalunga e Distrito Federal.

<i>Grupos populacionais</i>	F_{IS}	<i>IC 95%</i>	<i>IC 99%</i>
Kayabi	-0,293053	-0.491 a 0,003	-0,396 a 0,331
Kalunga	-0,092043	-0,226 a 0,094	-0,272 a 0,255
Distrito Federal	-0,038777	-0,486 a 0,256	-0,668 a 0,321
Todos os grupos	-0,124222	-0.379 a 0,093	-0,504 a 0,149

F_{ST} – Diversidade inter-populacional

Foram encontrados valores de F_{ST} significativos entre os três grupos populacionais e também entre os três pares de grupos populacionais: Kayabi x Kalunga, Kayabi x Distrito Federal e Kalunga x Distrito Federal (Tabela 11), considerando $p < 0.05$. Portanto, considerando os três grupos populacionais há uma diferenciação genética moderada. Para o par: Kayabi x Distrito Federal a diferenciação genética foi elevada ($F_{ST} = 0,33$).

Tabela 11. Valores de F_{ST} para os três pares dos grupos populacionais e para os três grupos populacionais em conjunto.

Pares de grupos populacionais	F_{ST}	$p (\alpha < 0.05)$
Kayabi x Kalunga	0.09	0
Kayabi x Distrito Federal	0.33	0
Kalunga x Distrito Federal	0.03	0
Kayabi x Kalunga x Distrito Federal	0.10	0

6. DISCUSSÃO

6.1. *Freqüências alélicas e genotípicas*

Populações mundiais variam consideravelmente na predisposição a doenças e nas freqüências alélicas de loci de importância farmacogenética, provavelmente como um resultado de deriva genética e também por causa da adaptação aos fatores seletivos do meio tais como clima e disponibilidade de nutrientes (Suarez-Kurtz, 2004).

A freqüência do alelo CAT^T em Kalunga foi semelhante à observada em Euro-descendentes (Goth e Vitai, 1997; Ukkola *et al.*, 2001), em Kayabi próximo ao descrito para Asiáticos (Mak *et al.*, 2006) e no Distrito Federal semelhante à de Asiáticos, Europeus e Euro-descendentes (Park *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2006; Flekac *et al.*, 2008). As freqüências dos genótipos AA e TT nos grupos populacionais Distrito Federal e Kayabi foram as menores e se aproximaram das descritas em Euro-descendentes e Asiáticos, respectivamente (Ukkola *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2006) (Tabela 12). Este é o primeiro relato deste polimorfismo em grupos populacionais brasileiros de etnia Ameríndia e Afro-descendente.

Tabela 12. Frequências alélicas e genotípicas da variação na região promotora do gene da catalase (21A/T) em diversas populações.

Polimorfismo	Frequências genotípicas (%)			Frequências alélicas (%)		Etnia	n	Referência bibliográfica
	AA	AT	TT	A	T			
CAT -21A/T	53	42	5	74	26	Kayabi	60	Presente estudo
	21	54	25	48	52	Kalunga	72	Presente estudo
	14,5	47	38,5	62	38	Distrito Federal	172	Presente estudo
	-	-	-	44	56	Euro-descendentes (Hungria)	35	Goth e Vitai, 1997
	17,62	47,95	34,43	42	58	Euro-descendentes (Finlândia)	245	Ukkola <i>et al.</i> , 2001
	47,22	40,74	12,03	68	32	Ásiáticos (Koréia)	108	Lee <i>et al.</i> , 2002
	48,1	51,9 (AT + TT)		69,3	30,7	Ásiáticos (Hong Kong)	360	Mak <i>et al.</i> , 2006
	36,5	47,5	16,0	60	40	Ásiáticos (Koréia)	200	Park <i>et al.</i> , 2006
	48	42	10	69	31	Euro-descendentes	210	Young <i>et al.</i> , 2006
37	48	15	61	39	Europeus (Europa Central)	140	Flekac <i>et al.</i> , 2008	

A frequência do alelo SOD2^C para os grupos populacionais de Kalunga e Distrito Federal foi similar a de Euro-descendentes (Mitrunen *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2002; Akyol *et al.*, 2004; Akyol *et al.*, 2005; Slinger *et al.*, 2006; Ventriglia *et al.*, 2006), inclusive a de uma amostra brasileira do Rio Grande do Sul (Bica *et al.*, 2007). Kayabi apresentou maior frequência desse alelo se comparado com as amostras desse estudo e de outras populações mundiais. Os heterozigotos tiveram frequência maior do que 50% nos três grupos populacionais, o que corrobora os relatos da descrição na literatura

(Grasbon-Frodl *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2004; Ventriglia *et al.*, 2006; Bica *et al.*, 2007) (Tabela 13). Este é o primeiro relato deste polimorfismo em um grupo populacional brasileiro de origem ameríndia.

Tabela 13. Frequências alélicas e genotípicas da variação na sequência sinal-mitocondrial do gene da SOD2 (Val9Ala) em diversas populações.

Polimorfismo	Frequências genotípicas (%)			Frequências alélicas (%)		Etnia	n	Referência bibliográfica
	Val/Val (TT)	Val/Ala (CT)	Ala/Ala (CC)	Val (T)	Ala (C)			
Mn-SOD Val9Ala	3,0	57,0	40,0	42,0	68,0	Kayabi	60	Presente estudo
	17,0	64,0	19,0	49,0	51,0	Kalunga	72	Presente estudo
	20,0	80,0	0,0	60,0	40,0	Distrito Federal	172	Presente estudo
	14,3	59,5	26,2	44,0	56,0	Europeus (Europa)	42	Grasbon-Frodl <i>et al.</i> , 1999
	31,7	47,9	20,3	56,0	44,0	Europeus (Finlândia)	514	Mitrunen <i>et al.</i> , 2001
	26,2	51,2	22,5	52,0	48,0	Europeus (Europa)	244	Stewart <i>et al.</i> , 2002
	34,2	42,3	23,5	44,0	56,0	Euro-descendentes (Turquia)	196	Akyol <i>et al.</i> , 2004; Akyol <i>et al.</i> , 2005.
	74,0	24,0	2,0	86,0	14,0	Asiáticos (Shangai)	1197	Cai <i>et al.</i> , 2004
	24,0	52,0	23,0	51,0	49,0	Euro-descendentes (Canadá)	372	Knight <i>et al.</i> , 2004
	29,0	49,0	22,0	53,0	47,0	Euro-descendentes (USA)	193	Olson <i>et al.</i> , 2004
	24,4	48,9	26,8	49,0	51,0	Euro-descendentes (Alemanha)	1121	Slanger <i>et al.</i> , 2006
	24,9	54,1	21,0	52,0	48,0	Euro-descendentes (Itália)	257	Ventriglia <i>et al.</i> , 2006
25,4	68,1	6,5	59,0	41,0	(Porto Alegre, RS)	370	Bica <i>et al.</i> , 2007	
25,5	49,7	24,8	50,4	49,6	Euro-descendentes (USA)	1360	Choi <i>et al.</i> , 2008	

A menor frequência do alelo GPX1^T foi detectada em Kayabi e se aproxima das descritas para Asiáticos (Ichimura *et al.*, 2004; Bastaki *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008). Para o grupo populacional do Distrito Federal, a frequência foi similar às descritas em Euro-descendentes (Forsberg *et al.*, 2000; Hu e Diamond, 2003; Knight *et al.*, 2004; Bastaki *et al.*, 2006; Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2009) e de uma amostra de Afro-americanos (Choi *et al.*, 2007). A frequência observada em Kalunga não se aproxima das descritas para outras populações mundiais. Segundo a literatura as maiores frequências genótípicas CC do polimorfismo Pro198Leu da GPX1 são detectadas em Asiáticos (Ichimura *et al.*, 2004; Bastaki *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008) (Tabela 14). Este é o primeiro relato deste polimorfismo em grupos populacionais brasileiros de etnia Ameríndia e Afro-descendente.

Tabela 14. Freqüências alélicas e genótípicas da variação do gene da GPX1 (Pro198Leu) em diversas populações.

<i>Polimorfismo</i>	<i>Freqüências genótípicas (%)</i>			<i>Freqüências alélicas (%)</i>		<i>Etnia</i>	<i>n</i>	<i>Referência bibliográfica</i>
	Pro/Pro (CC)	Pro/Leu (CT)	Leu/Leu (TT)	Pro (C)	Leu (T)			
GPX1 (Pro198Leu)	95,0	3,0	2,0	97,0	3,0	Kayabi	60	Presente estudo
	71,0	22,0	7,0	82,0	18,0	Kalunga	72	Presente estudo
	46,5	40,0	13,5	67,0	33,0	Distrito Federal	172	Presente estudo
	35,0	48,0	17,0	59,0	33,0	Euro-descendentes (Suécia)	214	Forsberg <i>et al.</i> , 2000
	42,0	43,0	15,0	64,0	36,0	Euro-descendentes (USA)	313	Ratnasinghe <i>et al.</i> , 2000
	47,2	40,4	12,4	67,0	33,0	Euro-descendentes (USA)	517	Hu e Diamond, 2003
	89,5	10,5	0,0	95,0	5,0	Asiáticos (Japão)	209	Ichimura <i>et al.</i> , 2004
	45,4	44,1	10,5	67,5	32,5	Euro-descendentes (Canadá)	372	Knight <i>et al.</i> , 2004
	46,0	46,0	8,0	69,0	31,0	Euro-descendentes	63	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	86,1	11,3	2,6	92,0	8,0	Asiáticos	115	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	60,0	35,0	5,0	80,0	20,0	Euro-descendentes (Espanha)	20	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	57,9	21,1	21,1	62,5	37,5	Outros	19	Bastaki <i>et al.</i> , 2006
	54,0	36,0	10,0	72,0	28,0	Euro-descendentes (Dinamarca)	377	Ravn-Haren <i>et al.</i> , 2006
	42,9	44,5	12,6	65,0	35,0	Afro-americanos	119	Choi <i>et al.</i> , 2007
	83,8	16,2	0,0	91,9	8,1	Asiáticos (China)	265	Tang <i>et al.</i> , 2008
46,3	38,2	15,4	65,4	34,6	Euro-descendentes (Macedônia)	123	Arsova-Sarafinovska <i>et al.</i> , 2009	

A frequência do Hp^1 foi maior em Kalunga do que em Kayabi e Distrito Federal, nos quais o alelo Hp^2 foi mais freqüente. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que, tal frequência observada em Kalunga foi semelhante ao descrito para o continente africano (Fowkes *et al.*, 2006; Carter e Worwood, 2007) e para algumas tribos ameríndias (Oliveira *et al.*, 1998; Salzano *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1998; Mazières *et al.*, 2007). A frequência observada em Kayabi foi semelhante ao relatado para uma população ameríndia da Venezuela (Arends *et al.*, 1970) e da população da Guiana Francesa de Kalinã (Mazières *et al.*, 2007), mas foi menor do que para outros ameríndios brasileiros (Salzano *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1998). A frequência do alelo Hp^1 do grupo populacional urbano (Distrito Federal) foi semelhante ao relatado para outras populações urbanas do estado de São Paulo (Wobeto *et al.*, 2007; Jorge *et al.*, 2009), de Porto Alegre (Tondo *et al.*, 1963) e da mesma região que foi coletada de maneira diferente (Moreira *et al.*, 2009). Diferenças foram observadas na distribuição dos subtipos Hp^{1S} e Hp^{1F} . A frequência do alelo Hp^{1F} foi maior em afro-descendentes (Kalunga) e menor no grupo indígena (Kayabi). Os resultados estão de acordo com relatos anteriores, no qual descreve que a frequência maior do alelo Hp^1 pode está relacionada com a frequência desse subtipo nas populações (Delanghe *et al.*, 2000; Carter e Worwood, 2007) (Tabela 15).

Frequências genotípicas (%)			Frequências alélicas (%)		Etnia	n	Referência Bibliográfica	Frequências genotípicas (%)					Frequências alélicas (%)		
								1F-1F	1F-1S	1S-1S	1F-2	1S-2	2-2	Hp ^{1F}	Hp ^{1S}
-	-	-	44,5	55,5	Ameríndios (Kalinã Guiana Francesa)	156	Mazières <i>et al.</i> , 2007	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	72,0	28,0	Ameríndios (Apalai'-Wayana Brasil)	136		-	-	-	-	-	-	-	-
25	43,0	32,0	46,5	53,5	Euro-descendentes (SP Brasil)	142	Wobeto <i>et al.</i> , 2007	-	-	-	-	-	-	-	-
25	42,0	33,0	46,0	54,0	(SP Brasil)	142	Jorge <i>et al.</i> , 2009	-	-	-	-	-	-	-	-
15	53,0	32,0	41,0	59,0	Brasília	61	Moreira <i>et al.</i> , 2009	4,8	3,2	6,5	14,5	38,7	32,3	13,7	27,4

As frequências de GSTM1^{*0/0*} em Kalunga e Kayabi foram próximas das relatadas para populações Afro-descendentes e Euro-descendentes do Brasil, Ameríndios e Africanos (Tabela 16). Enquanto que o Distrito Federal apresentou maior frequência desse genótipo, que é detectada em Afro-descendentes de populações urbanas brasileiras.

A menor frequência do fenótipo nulo da GSTT1 foi detectada em Kayabi e foi semelhante a Euro-descendentes de Curitiba (Maciel *et al.*, 2009) e algumas tribos indígenas brasileiras (Gaspar *et al.*, 2002). As frequências de GSTT1^{*0/0*} para os grupos populacionais Kalunga e Distrito Federal apresentam frequências que se encontram no intervalo descrito em Euro-descendentes e Europeus e Afro-descendentes (Tabela 16).

Kayabi apresentou a menor frequência do nulo para ambos os genes, semelhante ao que foi descrito para um grupo populacional urbano de São Paulo (Gattás *et al.*, 2004). A frequência observada nos outros dois grupos foi igual e próxima a um trabalho descrito em asiáticos da Mongólia (Fujihara *et al.*, 2009).

Tabela 16. Frequências fenotípicas da variação do gene da Glutathione S-Transferase M1 e T1 em diversas populações.

Etnia	N	GSTM1 ^{*0*0} (%)	GSTT1 ^{*0*0} (%)	GSTM1 ^{*0} /GSTT1 ^{*0} (%)	Referências
Kalunga	72	28,0	33,0	14,0	Presente estudo
Kayabi	60	31,0	18,0	10,0	Presente estudo
Distrito Federal	172	39,5	27,0	14,0	Presente estudo
Afro-descendentes (São Paulo)	147	33,0	26,0	9,5	Gattás <i>et al.</i> , 2004
Euro-descendentes (São Paulo)	233	55,4	22,3	9,9	Gattás <i>et al.</i> , 2004
Afro-descendentes (Porto Alegre)	100	34,0	28,0	-	Kvitko <i>et al.</i> , 2006
Euro-descendentes (Porto Alegre)	90	28,0	21,0	-	Kvitko <i>et al.</i> , 2006
Euro-descendentes (Rio de Janeiro)	132	48,0	21,0	-	Hatagima <i>et al.</i> , 2008
Afro-descendentes (Rio de Janeiro)	80	38,0	26,0	-	Hatagima <i>et al.</i> , 2008
Afro-descendentes (Curitiba)	190	37,0	24,0	-	Maciel <i>et al.</i> , 2009
Euro-descendentes (Curitiba)	115	46,0	17,0	-	Maciel <i>et al.</i> , 2009

Etnia	N	GSTM1 ^{*0*0} (%)	GSTT1 ^{*0*0} (%)	GSTM1 ^{*0} /GSTT1 ^{*0} (%)	Referências
Ameríndios (Wai Wai)	26	26,9	0	-	
Ameríndios (Ache)	67	35,8	17,9	-	
Ameríndios (Xavante)	33	18,2	30,3	-	
Ameríndios (Guarani)	51	3,9	11,8	-	
Ameríndios (Zoró)	28	14,3	14,3	-	Gaspar <i>et al.</i> , 2002
Ameríndios (Suruí)	21	43,0	0	-	
Ameríndios (Gavião)	31	12,9	6,5	-	
Ameríndios (Munduruku)	79	0	27,0	0	Klautau <i>et al.</i> , 2005a
Africanos	479 259*	26,7	16,0*	-	Garte <i>et al.</i> , 2001 *Milikan <i>et al.</i> , 2000
Afro-descendentes (Namíbia)	134	11,2	35,8	3,0	Fujihara <i>et al.</i> , 2009
Europeus		62,0/ 73,0	33,0/ 44,0	-	Rebbeck, 1997 / Garte <i>et al.</i> , 2001
Euro-descendentes (Dinamarca)	291	50,5	29,8	-	Rossi <i>et al.</i> , 2009
Asiáticos	1604	55,6	47,5	-	Lee <i>et al.</i> , 2008
Asiáticos (Mongólia)	207	46,4	25,6	12,0	Fujihara <i>et al.</i> , 2009

Kalunga

Em princípio, um remanescente de quilombo deve ter grande proporção de seus genes derivados de estoques africanos. Conseqüentemente, seriam esperadas frequências alélicas mais próximas daquelas encontradas em população do continente africano. De fato, para os fenótipos nulos da família glutathione S- Transferase (M1 e T1) e para o alelo Hp¹ as frequências foram similares às descritas para Afro-descendentes (Tondo *et al.*, 1963; Gattás *et al.*, 2004; Fowkes *et al.*, 2006; Fujihara *et al.*, 2009). Esses resultados corroboram o que foi descrito em um estudo de marcadores clássicos e polimorfismos de inserção Alu, que indicou uma maior contribuição africana na formação da população de Kalunga (Pedrosa e Oliveira, 2004).

Porém a frequência do Hp¹ e do fenótipo nulo para GSTM1 também foi semelhante às descritas para alguns grupos indígenas brasileiros (Salzano *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1998; Gaspar *et al.*, 2002). Esses resultados podem sugerir uma contribuição ameríndia na formação dessa população. Estimativas de misturas de DNA mitocondrial para Kalunga apresentou uma contribuição ameríndia de 0,133 (Ferreira, 2006). Isso também foi observado em outro estudo com duas comunidades afro-derivadas brasileiras onde foi relatada a alta contribuição do grupo parental ameríndio em suas composições genéticas (Gontijo, 2008).

A análise do fenótipo nulo da GSTT1 e a frequência das variantes dos loci CAT e SOD2 apresentaram frequências similares à de populações Euro-descendentes. Esses resultados corroboram estudo anterior que sugere mistura da população Kalunga com europeus ou euro-descendentes. Estudos com marcadores do cromossomo Y indicaram uma forte contribuição européia masculina na formação da população de Kalunga (Ribeiro *et al.*, 2009). Apesar do semi-isolamento ser uma característica de remanescentes de quilombos, sugere-se que a diversidade perdida eventualmente pelo isolamento pode ser compensada por uma miscigenação de diferentes grupos étnicos (europeus, africanos, ameríndios) no momento da formação do quilombo (Da Silva *et al.*, 1999).

Kayabi

Os povos ameríndios são uma rica fonte de diversidade cultural e genética. Várias características apresentadas por estes grupos justificam sua importância, uma delas é o aspecto demográfico, já que geralmente os grupos são pequenos, com isolamento relativo e sua ecologia é simples, o que os tornam adequados para investigações sobre a relação entre a estrutura populacional e a variabilidade genética (Salzano e Callegari-Jacques, 1998).

As frequências dos fenótipos GSTM1^{*0/*0}, GSTT1^{*0/*0} e do duplo nulo desses marcadores foram semelhantes a ameríndios do grupo Aché (Gaspar *et al.*, 2002) e de alguns grupos populacionais urbanos brasileiros (Gattás *et al.*, 2004; Kvitko *et al.*, 2006; Hatagima *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2009). As frequências das outras variantes foram próximas das descritas para Asiáticos (GPX1 e CAT) (Ichimura *et al.*, 2004; Bastaki *et al.*, 2006; Mak *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008) e euro-descendentes (SOD2) (Grasbon-Frodl *et al.*, 1999, Akyol *et al.*, 2004, Akyol *et al.*, 2005). Este dado pode estar relacionado ao fato de Kayabi estar localizada em uma área que recebeu intensa migração devido à prospecção de ouro, e que conseqüentemente possa ter ocorrido miscigenação (Klautau-Guimarães *et al.* 2005a).

É importante ressaltar que todos os marcadores aqui analisados estão associados a doenças, e que a comunidade de Kayabi que tem hábitos alimentares à base de peixe e castanha do Pará apresentou níveis de mercúrio de 14.75 ± 1.0 ppm (acima do limite aceitável estabelecido pela Organização Mundial de Saúde) (Klautau-Guimarães *et al.* 2005b). A variabilidade genética confere uma certa capacidade de se adaptar ao ambiente ao longo do tempo, por isso o papel dos fatores genéticos nessa dinâmica é importante para compreender como tais polimorfismos garantem proteção contra os danos causados pelo mercúrio.

De um modo geral, o nível de variabilidade genética dos Ameríndios é considerável quando comparada a de outros grupos, mas não pode ser facilmente explicado de acordo com a estrutura geográfica, lingüística e histórica. (Salzano, 2002).

Distrito Federal

O processo de colonização da região centro-oeste brasileira foi decisivo para a composição da população local. Os migrantes vieram de todas as regiões brasileiras,

principalmente das regiões sudeste e nordeste. Esses migrantes muitas vezes já eram produtos de miscigenação entre pelo menos dois grupos étnicos, mas tinham em sua constituição, no início da colonização, principalmente o europeu e o africano. É o que pode ser inferido de estudos com marcadores do cromossomo Y para duas populações da região centro-oeste (Barcelos, 2006). O fluxo migratório intenso modificou a realidade daquela época, em que a presença ameríndia era dominante. (Godinho *et al.*, 2008).

O grupo populacional urbano do Distrito Federal apresentou frequências dos alelos CAT^T, SOD2^C, GPX1^T e Hp^I e para o fenótipo GSTT1^{*0/*0} semelhantes ao descrito para os Euro-descendentes (Forsberg *et al.*, 2000; Mitrunen *et al.*, 2001; Gattás *et al.*, 2004; Wobeto *et al.*, 2007; Flekac *et al.*, 2008). A análise de mistura genética nesse grupo populacional com base em 14 marcadores genéticos detectou uma contribuição europeia de 61,4% (Godinho *et al.*, 2008). Para os fenótipos GSTM1^{*0/*0} e GSTT1^{*0/*0} foram observadas frequências próximas das descritas em Afro-descendentes. Estes resultados sugerem a participação de descendentes africanos no povoamento do Distrito Federal e corroboram a estimativa da contribuição genética, por meio de análises STR autossômicos, de mais de 39% sub-saariana africanos (Godinho *et al.*, 2008). Além disso, a distrib Este é o primeiro relato deste polimorfismo em grupos populacionais brasileiros de etnia Ameríndia e Afro-descendente.

uição desses polimorfismos das GST nesta amostra é reflexo da história de criação da nova capital em 1960. Uma vez que ela é formada por indivíduos provenientes todas as regiões do Brasil (Queiroz, 2006), esta origem muito diversa sugere que é a amostra mais representativa da população brasileira.

De forma geral a história da formação da população brasileira pode ter influenciado na distribuição de algumas variações em população e etnias diferentes. Sabe-se que altos níveis de diversidade genética intrapopulacional podem ser devido à miscigenação na amostra populacional. (Castelli *et al.*, 2007). Num trabalho com receptor de vitamina D foi observado diferenças nas frequências genotípicas e haplotípicas entre um grupo populacional brasileiro e populações do HapMap o que sugere que tais diferenças podem existir entre diferentes populações, especialmente as miscigenadas (Rezende *et al.*, 2007).

Em populações miscigenadas como a brasileira os critérios de auto-classificação muitas vezes utilizados em trabalhos de caso-controle, para determinação da etnia pode ser variável e gerar dados inconsistentes, principalmente porque na maioria desses

estudos a amostra não é representativa. Tal fato dificulta a comparação das frequências de variantes genéticas entre os diferentes grupos populacionais já que não há um padrão, como foi apresentado neste trabalho.

6.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Considerando-se os três grupos populacionais, o marcador SOD2 resultou em desvio significativo ($p < 0,05$). Também foi observado desvio na distribuição genotípica do marcador HAPTO grupos populacionais indígena e do Distrito federal e para GPX1 no grupo afro-derivado. Variação importante em populações humanas pode refletir, em parte, os processos distintos de seleção natural e adaptação às variáveis condições ambientais (Barreiro *et al.*, 2008).

Como a população da tribo Kayabi (cerca de 110 habitantes) é consideravelmente menor que a de Kalunga (cerca de 5.000 habitantes) e a do Distrito Federal (cerca de 2.051.146 habitantes), poderia ser esperado, a princípio, que fossem encontrados desvios do EHW na primeira, já que o pequeno tamanho é um dos fatores que deixam uma população mais suscetível aos efeitos da deriva genética (Futuyma, 1998). Apesar de pequena, a amostra de Kayabi representa cerca de 54% da população total e é, portanto, mais provável que represente a variabilidade genética total de seus habitantes e sua distribuição. Já as duas outras amostras, representam uma porcentagem menor da população. Os desvios quanto ao EHW em Kalunga e Distrito Federal podem ter sido causados por erro amostral ou pela ação de outros fatores evolutivos perturbadores da situação de equilíbrio como fluxo gênico e deriva genética.

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser explicado também pela seleção natural ou mistura étnica recente. O desvio observado no grupo urbano Distrito Federal poderia ser explicado por fluxo gênico, como indicado pela história demográfica desta população. Além disso, sabe-se que o crescimento populacional e a seleção positiva aumentam a proporção de alelos raros (ou seja, alelos com baixa frequência), enquanto a seleção de equilíbrio e subestruturação da população aumentam a proporção de alelos intermediários (Serre e Hudson, 2006).

A seleção natural pode agir no nível dos genes, se genótipos específicos permitem melhor “fitness” em ambientes específicos (Barreiro *et al.*, 2008). Tem sido relatada a diminuição da eficiência da enzima SOD2 contra o estresse oxidativo quando ocorre a substituição da citocina por uma timina no gene SOD2 (Shimoda-Matsubayashi

et al., 1996; Akyol *et al.*, 2005). Nas amostras desse estudo foi verificado que o heterozigoto encontra-se numa frequência acima de 50%, sendo que no grupo populacional do Distrito Federal essa frequência foi de 80%. Um estudo realizado com atletas dessa mesma região geográfica mostrou que o heterozigoto desse polimorfismo apresentou menos danos nos tecidos e no DNA, bem como menores índices de peroxidação lipídica (Miranda-Vilela *et al.*, 2009), indicando que o heterozigoto pode favorecer a defesa contra o estresse oxidativo.

Outro fator a ser considerado é o aspecto desses marcadores genéticos estarem associados a diferentes patologias estando diretamente relacionado com as condições ambientais e de saúde de cada população. Genes sob seleção positiva têm um papel relevante na sobrevivência humana e podem afetar fenótipos complexos de importância médica. De fato, conforme relatado para a seleção negativa, SNPs não-sinônimos apresentam seleção positiva em genes envolvidos com doenças mais frequentemente do que o esperado (Barreiro *et al.*, 2008). Muitos povos indígenas na América Latina continuam a viver em ambientes isolados, onde as condições são precárias. O contato com os trabalhadores em mineração e projetos de exploração afeta a saúde da população indígena (Montenegro e Stephens, 2006).

A tuberculose constitui um grave problema de saúde entre os povos indígenas do Alto Rio Negro no Brasil (Buchillet e Gazin, 1998) e foi observado um padrão de endemicidade moderada com prevalência anterior de infecção por HBV (vírus da hepatite B) de 55,7% e 49,5% para dois grupos indígenas do Pará, Brasil (Nunes *et al.*, 2007). Da mesma forma, a população de Kalunga vive em condições muito pobres em povoados remotos nas montanhas de ambos os lados do rio Paraná. A maioria dos indivíduos tinha condies precárias de higiene, superlotação, pobre níveis de educação e socioeconmica. (Matos *et al.*, 2009). Além disso, a maioria deles vivia basicamente da agricultura de subsistência ou pecuária, e as suas casas não tinham rede de esgoto e serviço de água tratada. Taxas de 80%, 30% e 0,5% foram encontrados para infeces HAV (vírus da hepatite A), HBV (vírus da hepatite B) e HCV (vírus da hepatite C) (Matos *et al.*, 2009).

Nas condies apresentadas e sabendo-se que a SOD2 está localizada na mitocôndria e a variante do polimorfismo Ala9Val está associada a algumas doenças do sistema nervoso (Shimoda-Matsubayashi *et al.*, 1996; Van Landeghem *et al.*, 1999) pode-se esperar que em Kayabi e Kalunga o heterozigoto confira uma vantagem seletiva no aspecto global de doenças, aumentando a frequência desse genótipo nessas

populações. No entanto, é possível que esteja ocorrendo seleção em outra região do gene SOD2 ou em outro gene ligado (Akyol *et al.*, 2004).

Foi também detectado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo da GPX1 em Kalunga e Kayabi, que apresentou excesso de homozigotos CC. Isso também foi observado em outro estudo em Asiáticos/ilhas do Pacífico (Bastaki *et al.*, 2006). A presença do alelo variante Leu (GPX1^T) está associada com risco de câncer de pulmão (Ratnasinghe *et al.*, 2000) e de mama (Hu e Diamond, 2003). A presença desse alelo afeta a atividade da GPX1, que se torna menos sensível à estimulação durante o processo metabólico (Zhao *et al.*, 2005). É possível que esses resultados possam ser explicados, principalmente porque ambas as populações vivem em condições precárias, favorecendo a ação da seleção natural desse genótipo.

6.3. ESTATÍSTICA F E DIVERSIDADE INTER POPULACIONAL

Apesar do pequeno tamanho amostral e populacional, o grupo populacional de Kayabi, apresentou estimativa de F_{IS} que não mostrou existir endogamia. Os outros dois grupos populacionais (Kalunga e Distrito Federal) também apresentaram coeficiente de endogamia (F_{IS}) não significativo, o que já era esperado por ter relatos de miscigenação em ambas populações (Barcelos, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram encontrados para o remanescente de quilombo Valongo (SC) e São Gonçalo (BA), mas diferente para o remanescente de Barra (BA) (Luizon, 2007).

A maioria das populações é formada por subpopulações, dentro das quais ocorre geralmente a reprodução. Tal agrupamento é denominado estrutura populacional ou subdivisão populacional (Hartl e Clark, 2007). Os valores de F_{ST} encontrados foram significativos ($p < 00.5$) e mostraram, assim como o teste de heterogeneidade par a par, que existe diferenças significativas entre os pares de grupos populacionais analisados nesse estudos e também se considerados em apenas um conjunto. Essas diferenças eram, de fato, esperadas visto que a localização geográfica destas e a expectativa de que a história de cada comunidade fosse bastante distinta, inclusive quanto às proporções das populações parentais em sua formação. Para os marcadores GSTM1 e GSTT1 foi observada uma distribuição homogênea, provavelmente isso é devido à característica de

ambos serem marcadores dominantes e provavelmente reduzir a informação da variação genética quando analisados.

7. Conclusões

A análise de seis marcadores de importância em estudos de estresse oxidativo associado a doenças complexas em três comunidades: uma afro-derivada brasileira (Kalunga), uma indígena (Kayabi) uma população brasileira urbana trihíbrida (Distrito Federal) e outras comunidades previamente descritas na literatura permitiu concluir que:

- Não há padrão definido ou gradiente ou cline, na distribuição das frequências dos alelos avaliados nesse estudo, pois podem existir vários fatores que possivelmente estejam contribuindo para essa variação.
- Os três grupos populacionais diferiram significativamente entre si com relação às frequências gênicas e genotípicas.
- Na comparação com frequências destes grupos populacionais, somente as dos genes GSTM1 e GSTT1 apresentaram homogeneamente distribuídas.
- A distribuição da frequência da variante do gene CAT apresentou-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e desvios significativos foram observados para os outros marcadores.
- Foi observada diferença estatisticamente significativa (F_{ST}) entre as três comunidades analisadas par a par e em conjunto, confirmando dados históricos de formação das populações aqui examinadas.

O estudo de populações miscigenadas é importante para um melhor conhecimento da genética de doenças complexas. Os pré-requisitos para sua aplicação são uma compreensão das proporções de miscigenação e da dinâmica deste processo (Zembrzuski, Callegari-Jacques e Hutz, 2006). As diferenças existentes entre os grupos étnicos humanos, considerando-se as frequências alélicas dos marcadores genéticos

polimórficos permitirão o desenvolvimento de métodos para avaliar o grau de miscigenação das populações.

Enfim, os marcadores descritos neste estudo serão valiosas fontes para futuros estudos funcionais e para estudos em genética de populações projetados para explorar o papel destes polimorfismos genéticos na etiologia das doenças humanas, uma vez que é necessário caracterizar a variação genética entre os diferentes grupos populacionais para avaliar o risco da doença. As diferenças nas frequências alélicas observadas entre as amostras enfatiza a importância de conhecer a distribuição de polimorfismos de interesse farmacológico, a fim de evitar erros no planejamento de estudos epidemiológicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe-Sandes, K.; Silva Jr, W.A.S.; Zago, M.A. (2004). Heterogeneity of the Y Chromosome in Afro-Brazilian Populations. *Human Biology*. **76**(1):77-86.

Akyol, O.; Canatan, H.; Yilmaz, H. R.; Yuce, H.; Ozyurt, H.; Sogut, S.; Gulec, M.; Elyas, H. (2004). PCR/RFLPbased cost-effective identification of SOD2 signal (leader) sequence polymorphism (Ala-9Val) using NgoM IV: a detailed methodological approach. *Clinica Chimica Acta* **345**(1-2):151–159.

Akyol, O.; Yanik, M.; Elyas, H.; Namli, M.; Canatan, H.; Akin, H.; Yuce, H.; Yilmaz, H. R.; Tutkun, H.; Sogut, S.; Herken, H.; Ozyurt, H.; Savas, H. A.; Zoroglu, S. S. (2005). Association between ALA-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **29**:123-131.

Albuquerque, T. K. (2004). Identificação humana através de marcadores moleculares. Caderno La Salle XI, Canoas, **2**(1):265 – 270.

Altshuler, D.; Daly, M. J.; Lander, E. S. (2008). Genetic Mapping in Human Disease. *Science* **322**(5903): 881–888.

Alves-Silva, J.; Santos, M. S.; Guimarães, P. E. M.; Ferreira, A. C. S.; Bandelt, H.; Pena, S. D. J.; Prado, V. F. (2000). The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *The American Journal of Human Genetics* **67**:444–461.

Arends, T.; Weitkamp, L. R.; Gallango, M. L.; Neel, J. V.; Schultz, J. (1970). Gene frequencies and microdifferentiation among the Makiritare Indians. II. Seven serum protein systems. *The American Journal of Human Genetics* **22**:526-532.

Arsova-Sarafinovska, Z.; Matevska, N.; Eken, A.; Petrovski, D.; Banev, S.; Dzikova, S.; Georgiev, V.; Sikole, A.; Erdem, O.; Sayal, A.; Aydin, A.; Dimovski, A. J. (2009). Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *International of Urology and Nephrology* **41**:63–70.

Autrup, H. (2000). Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Reserach* **464**:65-76.

Awadallah, S. M. (2003). Haptoglobin 2-2 phenotype is associated with decreased ferroxidase activity in smokers. *Clinica Chimica Acta* **334** :71–76.

Barcelos, R.S.S. (2006). Contribuição genética de duas populações urbanas da região Centro-Oeste brasileiro estimada por marcadores uniparentais. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília.

Barreiro, L. B.; Laval, G.; Quach, H.; Patin, E.; Quintana-Murci, L. (2008). Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nature Genetics* **40**: 340-345.

Bastaki, M.; Huena, K.; Manzanilloa, P.; Chandea, N.; Chena, C.; Balmesa, J. R.; Tagerb, I. B.; Hollanda, N. (2006). Genotype–activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenetics and Genomics* **16**:279–286.

Beiguelman, B. (1988). Curso Prático de Bioestatística. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP.

Beiguelman , B. (2008). Genética de populações humanas. SBG, Ribeirão Preto, 1p/235p.

Bernard, D.; Christophe, A.; Delanghe, J.; Langlois, M.; De Buyzere, M.; Comhaire, F. (2003). The effect of supplementation with an antioxidant preparation on LDL-oxidation is determined by haptoglobin polymorphism. *Redox Report* **8**(1):41-46.

Bhatti, P.; Stewart, P. A.; Hutchinson, A.; Rothman, N., M. S.; Inskip, P.D; Rajaraman, P. (2009). Lead Exposure, Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress, and Risk of Adult Brain Tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **18**(6):1841–1848.

Bica, C. G.; da Cruz, I. B. M.; Silva, L. L. M.; Toscani, N. T.; Zettler, C. G.; Graudenz, M. S. (2007). Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism

(Ala-9Val) and breast cancer in males and females. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **43**(3):219-225.

Black, J. A.; Dixon, G. H. (1968) Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobins. *Nature* 218:736-741.

Bowman, B.H. (1993). Haptoglobin. In: Hepatic plasma proteins. San Diego: Academic Press, p. 159-167.

Brown, T. (2002). Genomes. Manchester. BIOS scientific.

Buchillet, D.; Gazin, P. (1998). A situação da tuberculose na população indígena do alto rio Negro (Estado do Amazonas, Brasil) *Caderno de Saúde Pública* **14**(1):181-185.

Butler, J. M.; Coble, M. D.; Vallone, P. M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science Medicine and Pathology* **3**:200–205.

Cai, Q.; Shu, X.; Wen, W.; Cheng, J-R.; Dai, Q.; Gao, Y-T.; Zheng, W.(2004). Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Research* **6**:R647–55.

Carter, K.; Worwood, M. (2007). Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and the association with diseases. *International Journal of Laboratory Hematology* **29**: 92-110.

Castelli, E. C.; Mendes-Junior, C. T.; Donadi, E. A. (2007). HLA-G alleles and HLA-G 14 bp polymorphisms in a Brazilian population.. *Tissue Antigens* **70**(1):62-68.

Censo (2000). Site:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/tabelagrandes_regioes211.shtm (visitado em 10/12/2009).

Chambers, I.; Harrison, P. (1988) in *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, pp. 289-300, Alan R. Liss Inc., New York.

Choi, J-Y.; Neuhouser, M. L.; Barnett, M.; Hudson, M.; Kristal, A. R.; Thornquist, M.; King, I. B.; Goodman, G. E.; Ambrosone, C. B. (2007). Polymorphisms in Oxidative Stress-Related Genes Are Not Associated with Prostate Cancer Risk in Heavy Smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **16**(6):1116-1120.

Choi, J-Y.; Neuhouser, M.L.; Barnett, M. J.; Hong, C-C.; Kristal, A. R.; Thornquist, M. D.; King, I. B. Goodman, G. E.; Ambrosone, C. B. (2008). Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis* **29**(5):964-970.

Clair, D. K.; Oberley, T. D.; Muse, K. E.; St Clair, W. H. (1994). Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radical Biology & Medicine* **16**:275-282.

Company GE. (2006). Illustra blood genomicPrep Mini Spin kit. Buckinghamshire (UK): GE Healthcare; p. 14-18.

Connell, G.E.; Dixon, G.H.; Smithies, O. (1962). Subdivision of the three common haptoglobin types based on "hidden" differences. *Nature* **193**:505-506.

Connell, G.E.; Smithies, O.; Dixon, G.H. (1966). Gene action in the human haptoglobins. II. Isolation and physical characterization of alpha polypeptide chains. *Journal of Molecular Biology* **21**:225-229.

Conrad, D. F; Hurles, M. E. (2007). The population genetics of structural variation. *Nature Genetics*. **39**(7 Suppl):S30-S36.

Cooke, M. S.; Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB JOURNAL* **17**:1195-1214.

Córdova, J. H.; Sandoval, J.; Velásquez, M.; Távara, C.; Cotos, D.; Vásquez, J.; Barletta C.; Fujita, R.; Descailleaux, J. (2008). Poblamiento del continente americano y del Perú sugerido de un análisis filogeográfico de haplogrupos del mtDNA en etnias nativas. I: Inferencias primarias. *Archivos del Instituto de Biología Andina*. **14**(1):23-39.

Da Silva, W. A.; Bortolini, M. C.; Meyer, D.; Salzano, F. M.; Elion, J.; Krishnamoorthy, R.; Schneider, M. P.; De Guerra, D. C.; Layrisse, Z.; Castellano, H.

M.; Weimer, T. D.; Zago, M. A. (1999). Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. *American Journal of Physical Anthropology* **109**(4):425-37.

Delanghe, J. R.; Langlois, M. R.; De Buyzere, M. L. (1998). Congenital anhaptoalbuminemia versus acquired hypohaptoalbuminemia. *Blood* **91**:3524.

Delanghe, J.; Langlois, M.; Esquivel, C. A.; Haene, H. (2000). Haptoalbumin 1F allele frequency is high among indigenous populations in the State of Durango, Mexico. *Human Heredity* **50**:263-265.

Dutt, A.; Beroukhi, R. (2007). Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer. *Current Opinion in Oncology* **19**:43-49.

Eichler, E. E.; Nickerson, D. A.; Altshuler, D.; Bowcock, A. M.; Brooks, L. D.; Carter, N. P.; Church, D. M.; Felsenfeld, A.; Guyer, M.; Lee, C.; Lupski, J. R.; Mullikin, J. C.; Pritchard, J. K.; Sebat, J.; Sherry, S. T.; Smith, D.; Valle, D.; Waterston, R. H. (2007). Completing the map of human genetic variation. *Nature* **447**(7141):161-165.

Elahi, E.; Kumm, J.; Ronaghi, M. (2004). Global genetic analysis. *Journal of Biochemical and Molecular Biology* **37**:11-27.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. Berne: University of Berne.

Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* **43**(1):61-68.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220p.

Ferreira, L. B. (2006). Diversidade do DNA mitocondrial de populações brasileiras Ameríndias e Afrodescendentes. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, área de concentração: Genética.

Flekac, M.; Skrha, J.; Hilgertova, J.; Lacinova, Z.; Jarolimkova, M. (2008) Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Medical Genetics* **9**:1-9.

Forsberg, L.; de Faire, U.; Morgenstern, R. (1999). Low yield of polymorphisms from EST blast searching: Analysis of genes related to oxidative stress and verification of the P197L polymorphism in GPX1. *Human Mutation* **13**(4):294-300.

Forsberg, L.; de Faire, U.; Marklund, S. L.; Andersson, P. M.; Stegmayr, B.; Morgenstern, R. (2000). Phenotype Determination of a Common Pro-Leu Polymorphism in Human Glutathione Peroxidase 1. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **26**(5):423-426.

Fowkes, F. J. I.; Imrie, H.; Migot-Nabias, F.; Michon, P.; Justice, A.; Deloron, P.; Luty, A. J. F.; Day, K. P. (2006). association of haptoglobin levels with age, parasite density, and haptoglobin genotype in a malaria-endemic area of Gabon. *American Journal of Tropical. Medicine and Hygiene* **74**(1):26-30.

Fryer, A. A.; Zhao, L.; Alldersea, J.; Pearson, W. R. And Strange, R. C. (1993). Use of site-directed mutagenesis of allele-specific PCR primers to identify the GSTM1 A, GSTM1 B, GSTM1 A,B and GSTM1 null polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTM1 locus. *Biochemistry Journal* **295**:313-315.

Fujihara, J.; Yasuda, T.; Iida, R.; Takatsuka, H.; Fujii, H.; Takeshita, H. (2009). Cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphisms in Ovambos and Mongolians. *Legal Medicine* **11**:S408-S41.

Fujii, J.; Iuchi, Y.; Okada, F. (2005). Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3**:43.

Futuyma, D. J. (1998). *Evolutionary Biology*. 3. Ed. Sinauer, Sunderland, MA. 751 pp.

Garte, S.; Gaspari, L.; Alexandrie, A. K.; Ambrosone, C.; Autrup, H.; Autrup, J. L.; Baranova, H.; Bathum, L.; Benhamou, S.; Boffetta, P.; *et al.* (2001). Metabolic Gene

polymorphism Frequencies in Control Populations. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **10**:1239-1248.

Gaspar, P. A.; Hutz, M. H.; Salzano, F. M.; Hill, K.; Hurtado, A. M.; Petzl-Erler, M. L.; Tsuneto, L. T.; Weimer, T. A. (2002). Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *American Journal of Physical Anthropology* **19**(3):249-56.

Gattás, G. J. F.; Kato, M.; Soares-Vieira, J. A.; Siraque, M. S.; Kohler, P.; Gomes, L.; Rego, M. A. V.; Bydlowski, S. P. (2004). Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **37**(4): 451-458.

Geerdink, R. A.; Bartstra, H. A.; Van Veen, J. M. S. (1974). Serum proteins and red cell enzymes in Trio and Wajana Indians from Surinam. *The American Journal of Human Genetics* **26**(5): 581–587.

Gloria-Bottinia, F.; Magrinia, A.; Amantea, A.; Nicotrab, M.; Bottinia, E. (2009). Haptoglobin phenotype and reproductive success in repeated spontaneous abortion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **144**(2):153-156.

Godinho, N.M.O. (2008) O Impacto das migrações na constituição genética de populações latino-americanas. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília. Brasília – DF.

Godinho, N. M. O.; Gontijo, C. C.; Diniz, M. E. C. G.; Falcão-Alencar, G.; Dalton, G. C.; Amorim, C. E. G.; Barcelos, R. S. S.; Klautau-Guimarães, M. N.; Oliveira, S. F. (2008). Regional patterns of genetic admixture in South América. *Forensic Science International: Genetics Supplement* **1**:329–330.

Góth, L.; Vitai, M. (1997). Polymorphism of 5' oh the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia. *Electrophoresis* **18**:1105-1108.

Goth, L.; Rass, P.; Pay, A. (2004) Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis Mol. Diagn.* **8**:141–149.

Grasbon-Frodl, E. M.; Kosel, S.; Riess, O.; Muller, U.; Mehraein, P. Graeber, M. B.. (1999). Analysis of Mitochondrial Targeting Sequence and Coding Region Polymorphisms of the Manganese Superoxide Dismutase Gene in German Parkinson Disease Patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**: 749–752.

Guo, S. W.; Thompson, E. A. (1992) Performing the exact test of Hardy- Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**:361-372.

Gutteridge, J. M. C. (1987). The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* **917**:219–223.

Hajibabaei, M.; Singer, G. A. C.; Hebert, P. D. N.; Donal, A. H. (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* (**23**)4:167-172.

Hartl, D.L.; Clark, A.G. (1997). Principles of Poppulation Genetics. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.

Hatagima, A.; Costa, E. C. B.; Marques, C. F. S.; Koifman, R. J.; Boffetta, P. Koifman. S. (2008).Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncology* **44**(2) 200-207.

Hayes, D. J.; Strange, R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **61**:154-166.

Hayes, J. D.; Flangan J. U.; Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology* **45**:51–88.

Hermes-Lima, M. (2004). Oxigen in biology and biochemistry: Role of free radicals. Edited by Kenneth B. Storey . Copyright.

Hill, D. K.; Bowden, J.; Flint, D. B.; Whitehouse, D. A.; Hopkinson, S. J.; Oppenheimer, S. W.; Serjeantson, J. B.; Clegg, A. V. (1986). A population genetic survey of the haptoglobin polymorphism in Melanesians by DNA analysis. *The American Journal of Human Genetics* **38**(3): 382–389.

Hiragi, C. O.; Oliveira, S. F.; Hatagima, A.; Ferreira, L. B.; Grisolia, C. K.; Klautau-Guimarães, M. N. (2007). Glutathione S-Transferase M1 and T1 Polymorphisms in Brazilian African Descendants. *Human Biology* **79**(1):131-140.

Honma, H. N.; De Capitani, E. M.; Perroud, M. W. J.; Barbeiro, A. S.; Toro, I. F.; Costa, D. B.; Lima, C. S.; Zambon, L. (2008). Influence of p53 codon 72 exon 4, GSTM1, GSTT1 and GSTP1*B polymorphisms in lung cancer risk in a Brazilian population. *Lung Cancer* **61**(2):152-62.

Hu, Y. J.; Diamond, A. M. (2003). Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer: Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium. *Cancer Research* **63**:3347–3351.

Hwang, E. S.; Bowen, P. E. (2007). DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47**(1): 27-50.

Hwang, E-S.; Kim, G-H. (2007). RETRACTED: Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology* **229**(1-2):1-10.

IBGE –CENSO 2000. Site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível na Internet via: [www. URL: www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em dezembro de 2008.

Ichimura, Y.; Habuchi, T.; Tsuchiya, N.; Wang, L.; Oyama, C.; Sato, K.; Nishiyama, H.; Ogawa, O.; Kato, T. (2004). Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *The journal of urology* **172**:728–732.

Imlay, J. A.; S. Linn DNA damage and oxygen radical toxicity *Science* **240**(4857):1302 – 1309.

Janaydeh, M.; Hamad, M.; Awadallah, S. (2004). The relationship between haptoglobin polymorphism and serum ceruloplasmin ferroxidase activity. *Clinical and Experimental Medicine* **3**:219–223.

Jorge, S.D.E.C.; Abreu, C. F.; Guariento, M. E.; Sonati, M. F. (2009). Haptoglobin genotypes in Chagas' disease. *Clinical Biochemistry* in press.

Josephy, Pd. (1997). *Molecular Toxicology*. Oxford University Press.

Kempkes, M.; Golka, K.; Reich, S.; Reckwitz, T And Bolt, H. M. (1996). Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder. *Archives of Toxicology* **71**:123-126.

Khoury, M. J.; Wacholder, S. (2009). Invited Commentary: From Genome-Wide Association Studies to Gene-Environment-Wide Interaction Studies—Challenges and Opportunities. *American Journal of Epidemiology* **169**(2):227-230.

Kimura, K.; Isashiki, Y.; Sonoda, S.; Kakiuchi-Matsumoto, T.; Ohba, N. (2000) Genetic Association of Manganese Superoxide Dismutase With Exudative Age-related Macular Degeneration. *American Journal Of Ophthalmology* **130**(6) 769:773.

Klautau-Guimarães, M. N. ; Hiragi, C. O. ; D' Ascençao, R. F. ; Oliveira, S. F. ; Grisolia, C. K. ; Hatagina, A. And Ferrari, I. [a] (2005). Distribution of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null phenotype in Brazilian Amerindians. *Genetics and Molecular Biology* **28**(1):32-35.

Klautau-Guimarães, M. N. ; D'Ascençao, R. F. ; Caldart, F. A. ; Grisolia, C. K. ; Souza, J. R. ; Barbosa, A. C. ; Cordeiro, C. M. T. And Ferrari, I. [b] (2005). Analysis of genetic susceptibility to mercury contamination evaluated through molecular biomarkers in at-risk Amazon Amerindian populations. *Genetics and Molecular Biology* **28**(4):827-832.

Knight, J. A.; Onay, U. V.; Wells, S.; Li, H.; Shi, E. J. Q.; Andrulis, I. L.; Ozcelik, H. (2004). Genetic Variants of GPX1 and SOD2 and Breast Cancer Risk at the Ontario Site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. **13**:146–149.

Koch, W.; Latz, W.; Eichinger, M.; Roguin, A.; Levy, A. P.; Schömig, A.; Kastrat, A. (2002). Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clinical Chemistry* **48**:1377-1382.

Koch, W.; Latz, W.; Eichinger, M.; Gschwendner, C.; Teige, B.; Schömig, A.; Kastrati, A. (2003). Haptoglobin gene subtyping restriction enzyme analysis. *Clinical Chemical* **49**:1937-1940..

Koda, Y.; Soejima, M.; Yoshioka, N.; Kimura, H. (1998). The Haptoglobin-Gene Deletion Responsible for Anhaptoglobinemia. *The American Journal of Human Genetics* **62**:245-252.

Koda, Y.; Watanabe, Y.; Soejima, M.; Shimada, E.; Nishimura, M.; Morishita, K.; Moriya, S.; Mitsunaga, S.; Tadokoro, K.; Kimura, H. (2000). Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaptoglobinemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood* **95**:1138–1143.

Kruglyak, L.; Nickerson, D.A. (2001). Variation is the spice of life. *Nature Genetics* **27**:234-236.

Kvitko, K.; Gaspar, P. A.; Torres, A. R.; Hutz, M. (2006). CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in an Afro-brazilian group. *Genetics and Molecular Biology* **29**:613-616.

Kvitko, K.; Rohr, P.; Zucchetti, G.; Silla, L. M. R. (2009). Aspectos Ambientais e Genéticos no Desenvolvimento de Leucemias. *Revista Brasileira de Biociências* **6**(4):369-373.

Lai, L. Y. C.; Constans, J.; Archer, G. T. (1986). Isoelectric focusing studies of transferrin and haptoglobin subtypes in an Australian white population. *Annals of Human Biology* **13**(6):555-561.

Landi, S. (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutation Research* **463**:247–283.

Langlois, M. R.; Delanghe, J. R. (1996). Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistry* **42**(10):1589-1600.

Langlois, M. R.; Delanghe, J. R.; Dupraz, D. A.; De Buyzere, M. L. (1998). Oxidative Stress is Genetically Influenced by the Haptoglobin Polymorphism. *JAAC* 1064-1072.

Langlois, M. R.; De Buyzere, M. L.; Van Vlierberghe, H.; Delanghe, J. R. (2004). Haptoglobin polymorphism and serum ferritin concentration in ageing subjects. *British Journal of Haematology* **124**:555–563.

Lee, J. H.; Park, R. Y.; Lee, C. S. *et al.* (2002). No Association between Catalase Gene Polymorphism and Gastric Carcinoma and Hepatocellular Carcinoma in Koreans. *Cancer research and treatment* **34**(6):432-435.

Lee, K-M.; Kang, D.; Clapper, M. L.; Ingelman-Sundberg, M.; Ono-Kihara, M.; *et al.* (2008). CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 Polymorphisms, Smoking, and Lung Cancer Risk in a Pooled Analysis among Asian Populations. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **17**(5):1120-1126.

Levy, A.P. (2004). Haptoglobin: a major susceptibility gene for diabetic cardiovascular disease. *Israel Medical Association Journal* **6**:308-310.

Lewis, P. O.; Zaykin, D. (1997). Genetic data analysis: software for the analysis of discrete genetic data. Version 1.0.

Li, J. Z.; Devin, M.; Absher, H. T.; Suthwick, A. M.; Casto A. M., Ramachandran, S.; Cann, H. M.; Barsh, G. S.; Feldman, M.; Cavalli-Sforza, L. L.; Myers, R. M. (2008). Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation. *Science* 319(5866):1100 – 1104.

López, O.; Hernández, A. F.; Rodrigo, L.; Gila, F.; Penab, G.; Serranoc, J. L.; Parrón, T.; Villanuevaa, E.; Plaa, A. (2007). Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides *Toxicology Letters* **171**(3):146-153.

Losi-Guembarovski, R.; Cólus, I. M. S.; Menezes, R. P.; Polisel, F.; Chaves, V. N.; Kuasne, H.; Leichsenring, A.; Guembarovski, A. L.; Oliveira, B. W.; Ramos, G.; Cavalcanti, T. C. S.; Mizuno, L. T.; Cavalli, I. J.; Ribeiro, E. M. S. F. (2008). Lack of Association among Polymorphic Xenobiotic-metabolizing Enzyme Genotypes and the Occurrence and Progression of Oral Carcinoma in a Brazilian Population. *Anticancer Research* **28**:1023-1028.

Luizon, M. R. (2007) Dinâmica da Mistura Étnica em Comunidades Remanescentes de Quilombo Brasileiras. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. USP. Ribeirão Preto – SP.

Maciel, M. E.; Oliveira, F. K.; Propst, G. B.; Bicalho, M. G.; Cavalli, I. J.; Ribeiro, E. M. S. F. (2009). Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants. *Genetics and Molecular Biology* **32**(4): 723-728.

Maeda, N.; Yang, F.; Barnett, D. R.; Bowman, B. H.; Smithies, O. (1984). Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature* **309**:131-135.

Magno, L. A. V.; Talbot, J.; Talbot, T.; Borges, S. A. M.; Souza, R. P.; Marin, L. J.; Moreli, M. L.; de Melo, P. R. S.; Corrêa, R. X.; Rios, S. F.; Di Pietro, G. (2009). Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. *Pharmacology* **83**:231-236.

Mak, J. C. W.; Leung, H. C. M.; Ho, S. P.; Kow, F. W. S.; Cheung, A. H. K.; Ip, M. S.M.; Chan-Yeung, M. M. W. (2006). Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clinical and Experimental Allergy* **36**:440–447.

Manfredi, S.; Calvi, D.; del Fiandra, M.; Botto, N.; Biagini, A.; Andreassi, M. G. (2009). Glutathione S-transferase T1- and M1-null genotypes and coronary artery disease risk in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Pharmacogenomics* **10**(1):29-34.

Martin, R. C.G.; Li, Y.; Liu, Q.; Jensen, N. S.; Barker, D. F.; Doll, M. A.; Hein, D. W. (2009). Manganese Superoxide Dismutase V16A Single-Nucleotide Polymorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence Is Associated with Reduced Enzymatic Activity in Cryopreserved Human Hepatocytes. *DNA and Cell Biology* **28**(1): 3-7.

Matos, M. A. D.; Reis, N. R. S.; Kozłowski, A. G.; Teles, A. S.; Motta-Castro, A. R. C.; Mello, F. C. A.; Gomes, A. S.; Martins, R. M. B. (2009). Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**: 899-905.

Mazières, S.; Sevin, A.; Bonnet, F.; Crubézy, E.; Salzano, F. Larrouy, G. (2007). Genetic studies in French Guiana populations: Synthesis. *American Journal of Physical Anthropology* **132**:292-300.

Meegen-Silva, A. (1999). Kalunga: Identidade Étnica de uma Comunidade Remanescente de Quilombos. Dissertação de Mestrado em Antropologia Cultural Vrije Universiteit. Amsterdã. Holanda.

Melamed-Frank, M.; Lanche, O.; Enav, B. I.; Szafranek, T.; Levy, N. S.; Ricklis, R. M.; Levy, A. P. (2001). Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* **98**(13):3693-3698.

Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**(3):1215.

Millikan, R. C. (2000). NAT1*10 and NAT1*11 polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. **9**: 217-219.

Miranda-Vilela, A. L.; Akimoto, A. K.; Alves, P. C. Z.; Hiragi, C. O.; Penalva, G. C.; Oliveira, S. F.; Grisolia, C. K.; Klautau-Guimarães, M. N. (2009). Haptoglobin gene subtypes in three Brazilian population groups of different ethnicities. *Genetics and Molecular Biology* **32**(3): 456-461.

Mitrunen, K.; Sillanpaa, P.; Kataja, V.; Eskelinen, M.; Kosma, V.M.; Benhamou, S.; Uusitupa, M.; Hirvonen, A. (2001). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* **22**:827– 829.

Montenegro, R. A.; Stephens, C. (2006). Indigenous health in Latin America and the Caribbean. *Lancet* **367**:1859–1869.

Morais, L. M. T. S.; Cardoso, F. C.; Lourenço, G. J.; Shinzato, J. Y.; Zeferino, L. C.; Lima, C. S. P.; Gurgel, M. S. C. (2008) Características mamográficas do câncer de mama associadas aos polimorfismos GSTM1 e GSTT1. *Revista da Associação Médica Brasileira* **54**(1):61-66.

Moreira, L. R. S.; Miranda-Vilela, A. L.; Silva, I. C. R.; Akimoto, A.K.; Klautau-Guimarães, M. N.; Grisolia, C. K. (2009). Antioxidant effect of haptoglobin phenotypes against DNA damage induced by hydrogen peroxide in human leukocytes. *Genetics and Molecular Research* **8**(1):284-290.

Nunes, H. M.; Monteiro, M. R. C. C.; Soares, M. C. P. (2007). Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatites B e D na área indígena Apyterewa, do grupo Parakanã, Pará, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* **23**(11):2756-2766.

Oliveira, S. F.; Lopes, D. E. B.; Santos, S. E. B.; Guerreiro, J. F. (1998). The Awa'-Guaja' Indians of the Brazilian Amazon Demographic Data, Serum Protein Markers and Blood Groups. *Human Heredity* **48**:163-168

Olson, S. H.; Carlson, M. D. A.; Ostrer, H.; Harlap, S.; Stone, A.; Winters, M.; Ambrosone, C. B. (2004). Genetic variants in SOD2, MPO, and NQO1, and risk of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* **93**:615-620.

Park, H-H.; Ha, E.; Uhm, Y. K.; Jin, S-Y.; Kim, Y-J.; Chung, J-H.; Lee, M-H. (2006). Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Experimental Dermatology* **15**:377-380.

Parker, W. C.; Bearn, A. G. (1963). Control gene mutation as a possible explanation of certain haptoglobin phenotypes. *The American Journal Human Genetics* **15**:159-181.

Parra, F. C.; Amado, R. C.; Lambertucci, J. R.; Rocha, J.; Antunes, C. M. And Pena, S. D. J. (2002). Color and genomic ancestry in Brazilians. *Genetics* **100**(1):177-182.

Pearce, N.; Foliaki, S.; Sporle, A. And Cunningham, C. (2005). Genetics, race, ethnicity, and health. *British Medical Journal B.M.J.* **328**:1070-1072.

Pedrosa, M.A.F. & Oliveira, S.F. (2004). *Mixtura étnica en poblaciones afrodescendientes semi-aisladas de Brasil*. Caracas. Anais do VIII Congresso de la Asociacion Latino americana de Antropología Biológica.

Pemble, S.; Schroeder, Kr.; Spencer, S.; Meyer, D. J.; Hallier, E.; Bolt, H. M.; Ketterer, B.; Taylor, J. B. (1994). Human glutathione S-transferase theta (GSTT1):cDNA

cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochemical Journal* **300**:271-276.

Polonikova, V.; Ivanov, V. P.; Solodilova, M. A.; Kozhuhov, M. A.; Panfilov, V. I. (2009). Tobacco Smoking, Fruit and Vegetable Intake Modify Association Between -21A>T Polymorphism of Catalase Gene and Risk of Bronchial. *Asthma* **46**(3):217-224.

Quan, F.; Korneluk, R.G.; Tropak, M. B. Gravell, R.A. (1986). Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research* **14**(13):5321-5335.

Quaye, I. K.; Ababio, G.; Amoah, A. G. (2006). Haptoglobin 2-2 phenotype is a risk factor for type 2 diabetes in Ghana. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **13**:90–94.

Quaye, I.K. (2008). Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**(8):735-742.

Queiroz EP (2006) A migração intrametropolitana no Distrito Federal e Entorno: o conseqüente fluxo pendular e o uso dos equipamentos urbanos de saúde e educação. http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2006/docspdf/ABEP2006_724.pdf (january 12, 2009).

Ratnasinghe, D.; Tangrea, J. A.; Andersen, M. R.; Barrett, M. J.; Virtamo, J.; Taylor, P. R.; Albanes, D. (2000). Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Research* **60**:6381-6383.

Raugei, G.; Bensi, G.; Colantuoni, V.; Romano, V.; Santoro, C.; Costanzo, F.; Cortese, R. (1983). Sequence of human haptoglobin cDNA: evidence that the alpha and beta subunits are coded by the same mRNA. *Nucleic Acids Research* **11**(17):5811-5819.

Ravn-Haren, G.; Olsen, A.; Tjønneland, A.; Dragsted, L. O.; Nexø, B. O.; Wallin, H. K.; Overvad, K.; Raaschou-Nielsen, O.; Vogel, U. (2006). Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* **27**(4):820-25.

Raymond, M.; Rousset, F. (1995). Genepop Version 3.3: A Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**:248–249.

Rebbeck, T. (1997). Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **6**(9):733-743.

Rezende, V. B.; Barbosa, F. J.; Montenegro, M. F.; Sandrim, V. C.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. (2007). An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clinica Chimica Acta* **384**(1-2):155-159.

Ribeiro, D. (1995). O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil. Companhia das Letras São Paulo.

Ribeiro, G. G.; De Lima, R. R.; Wiezel, C. E.; Ferreira, L. B.; Sousa, S. M.; Rocha, D. M.; Canas, M. C.; Nardelli-Costa, J. Klautau-Guimarães, M. N.; Simões, A. L.; Oliveira, S. F. (2009). Afro-derived Brazilian populations: male genetic constitution estimated by Y-chromosomes STRs and AluYAP element polymorphisms. *American Journal of Human Biology* **21**(3):354-356.

Rohr, P.; Veit, T. D.; Scheibe, I.; Xavier, R. M.; Breno, J. C.; Chies, J. A.; Kvitko, K. (2008). GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* **26**(1):151-155.

Robinson, I. P. (1998). Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa, MG: UFV p. 329-368.

Rodrigues, A. D. (1994) Línguas Brasileiras: Para o Conhecimento das Línguas Indígenas. Loyola, São Paulo, 136 pp.

Rossi, A. M.; Hansteen, I. L.; Skjelbred, C. F.; Ballardín, M.; Maggini, V.; Murgia, E.; Tomei, A.; Viarengo, P.; Knudsen, L. E.; Barale, R.; Norppa, H.; Bonassi, S. (2009). Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1. *Environmental Health* **117**(2):203-208.

Rosset, A.; Conforti-Froes, N. D. T. (2000). Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia* **3**:26-30.

Sadrzadeh, S. M.; Bozorgmehr, J. H. (2004). Haptoglobin phenotypes in health disorders. *American Journal of Clinical Pathology* **121** (suppl 1): S 97-S104.

Saitou, N. (1995). A genetic affinity analysis of human populations. *Human Evolution* **10**(1):17-33.

Salzano, MF; Callegari-Jacques, SM. (1988). South americans indians – a case study in evolution. Oxford University Press, New York.

Salzano, F.; Franco, M. H. L. P.; Weimer, T.A.; Callegari-Jacques, S. M.; Mestriner, M. A.; Hutz, M.H.; Flowers, N. M.; Santos, R. V.; Coimbra Jr, C. E. A. (1997). The Brazilian Xavante Indians revisited: New protein genetic studies.. *American Journal of Physical Anthropology* **104**(1):23-34.

Salzano, F. M.; Weimer, T. A.; Franco, M. H. L. P.; Callegari-Jacques, S. M.; Mestriner, M. A.; Hutz, M. H.; Santos, R. V.; Coimbra Jr, C. E. A. (1998). Protein genetic studies among the Tupi-Mondé Indians of the Brazilian Amazonia. *American Journal of Human Biology* **10**:711-722.

Salzano, F. M. (2002). Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *Academia Brasileira de Ciências* **74**: 223–263.

Salzano, F.M.; Hutz, M. H. (2005). Genética, genômica e populações nativas brasileiras. História e biomedicina. *Revista de Estudos e Pesquisas, FUNAI*, **2**(1):175-197.

Santos, S. E. B.; Ribeiro-dos-Santos, A. K. C.; Guerreiro, J. F.; Santos, E. J. M.; Weimer, T. A.; Callegari-Jacques, S. M.; Mestriner, M. A.; Franco, M. H. L. P.; Hutz, M. H.; Salzano, F. M. (1998). New protein genetic studies in six Amazonian Indian populations. *Annual Human Biology* **25**:505-522.

Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* **30**(11):1191-1212.

Schultze, H. E.; Heremans, J. F. (1996). Molecular biology of human proteins: Nature and metabolism of extracellular proteins. *Amsterdam: Elsevier* 384-402.

Seidegard, J.; Vorachek, W. R.; Pero, R. W.; Pearson, W. R. (1988). Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**(19):7293–7297.

Serre, D.; Hudson, T. J. (2006). Resources for Genetic Variation Studies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **7**:443-457.

Sharp, A. J.; Cheng, Z; Eichler, E. E. (2006). Structural Variation of the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **7**:407–442.

Sherry, S.T.; Ward, M. H.; Kholodov, M.; Baker, J.; Phan, L.; Smigielski, E. M.; Sirotkin, K. (2001). db SNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research* **29**(1):308-311.

Shim, B. S.; Bearn, A. G. (1964). Immunological And Biochemical Studies On Serum Haptoglobin. *The Journal of Experimental Medicine* **120**:611–628.

Shimoda-Matsubayashi, S.; Kobayashi, M. H. T.; Nakagawa-Hattori, Y.; Shimizu, Y.; Mizuno, Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **226**:561–565.

Shinkai, T.; Muller, D. J.; Luca, V. D.; Shaikh, S.; Matsumoto, C.; Hwang, R.; King, N.; Trakalo, J.; Potapova, N.; Zai, G.; Hori, H.; Ohmori, O.; Meltzer, H. Y.; Nakamura, J.; Kennedy, J. L. (2006). Genetic association analysis of the glutathione peroxidase (GPX1) gene polymorphism (Pro197Leu) with tardive dyskinesia. *Psychiatry Research* **141**:123-128.

Singh, H.; Sachan, R.; Devi, S.; Pandey, S. N.; Mittal, B. (2008). Association of GSTM1, GSTT1, and GSTM3 gene polymorphisms and susceptibility to cervical cancer in a North Indian population. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **198**(3):303.

Slanger, T. E.; Chang-Claude, J.; Wang-Gohrke, S. (2006). Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism, environmental modifiers, and risk of breast cancer in a German population. *Cancer Causes Control* **17**:1025–1031.

Smithies, O.; Connell, G. E.; Dixon, G. H. (1962). Inheritance of haptoglobina subtypes. *The American Journal of Human Genetics* **14**:14-21.

Smithies, O.; Walker, N. F. (1955). Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature* **176**:1265-1266.

Soares, A. A. (1995). Kalunga: O direito de Existir. (Questões Antropológicas e Jurídicas Sobre Remanescentes de Quilombo). Goiânia. MinC/Fundação Cultural Palmares. 253 p.

Souza, C. L.; Barbosa, C. G.; Neto, J. S. M.; Barreto, J. H.; Reis, M. G.; Gonçalves, M. S. (2008). Polymorphisms in the glutathione S-transferase theta and mu genes and susceptibility to myeloid leukemia in Brazilian patients. *Genetics and Molecular Biology* **31**(1):39-41.

Sprenger, R.; Schlagenhauer, R.; Kerb, R.; Bruhn, C.; Brockmoller, J.; Roots, I.; Brinkmann, U. (2000). Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* **10**:557–565.

Stephens, J. C.; Schneider, J. A.; Tanguay, D. A.; Choi, J.; Acharya, T.; Stanley, S. E. (2001). Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* **293**:489-493.

Stewart, S. F.; Leathart, J. B.; Chen, Y.; Daly, A. K.; Rolla, R.; Vay, D.; Mottaran, E.; Vidali, M.; Albano, E.; Day, C. P. (2002). Valine-Alanine Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism Is Not Associated With Alcohol-Induced Oxidative Stress or Liver Fibrosis. *Hepatology* **1355**:1360.

Stoneking, M. (2001). Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past. *Nature* **409**:821-822.

Strachan, T.; Read, A.P. (1997). *Human Molecular Genetics*. Reino Unido, Editora Wiley-Liss.

Strange, R. C.; Fryer, A.A. (1999). The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Science Publications* **148**:231-49.

Strange, R. C.; Jones, P. W.; Fryer, A. A. (2000) Glutathione S-transferases: genetics and role in toxicology. *Toxicological Letters* **112**: 357-363.

Suarez-Kurtz, G. (2004). Pharmacogenomics in admixed populations: the Brazilian pharmacogenetics/pharmacogenomics network—REFARGEN. *The Pharmacogenomics Journal* **4**:347–348.

Suarez-Kurtz, G.; Pena, S. D. J. (2006) Pharmacogenomics in the Americas: impact of genetic admixture. *Current Drug Targets* **7**: 1649-1658.

Sun, Y.; Goodison, S.; Li, J.; Liu, L.; Farmerie, W. (2007). Improved breast cancer prognosis through the combination of clinical and genetic markers. *Bioinformatics* **23**(1):30-37.

Tang, N-P.; Wang, L-S.; Yang, L.; Gu, H-J.; Sun, Q-M.; Cong, R-H.; Zhou, B.; Zhu, H-J.; Wang, B. (2008). Genetic variant in glutathione peroxidase 1 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Clinica Chimica Acta* **395**:89–93.

Tondo, C. V.; Mundt, C.; Salzano, F. M. (1963). Haptoglobin types in Brazilian negroes. *Annals of Human Genetics* **26**:325-331.

Torresan, C.; Oliveira, M. M.; Torrezan, G. T.; de Oliveira, S. F.; Abuázar, C. S.; Losi-Guembarovski, R.; Lima, R. S.; Urban, C. A.; Cavalli, I. J.; Ribeiro, E. M. (2008). Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. *Clinical and Experimental Medicine* **8**(2):65-71.

Tseng, C. F.; Lin, C. C.; Huang, H. Y.; Liu, H. C. And Mao, S. J. T. (2004). Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* **4**:2221-2228.

Ukkola, O.; Erkkilä, P. H.; Savolainen, M. J.; Kesäniemi, Y. A. (2001). Lack of association between polymorphisms of catalase, copper/zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* **249**: 451-459.

Vainfas, R. (2000). História indígena: 500 anos de despovoamento. In Brasil 500 anos de povoamento, IBGE, Rio de Janeiro, p 35-59.

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **39**:44-84.

Van Der Straten, A.; Herzog, A.; Cabezo N, T.; Bollen, A.(1984). Characterization of human haptoglobin cDNAs coding for $\alpha 2\text{FS}\beta$ and $\alpha 1\text{S}\beta$ variants. *FEBS Letter* **168**:103-107.

Van Landeghem, G. F.; Tabatabaie, P.; Beckman, G.; Beckman, L.; Andersen, P.M. (1999). Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neurone disease. *European Journal of Neurology* **6**:639–644.

Venter, J. C. *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* **251**(5507):1304:1351.

Ventriglia, M.; Scassellati, C.; Bonvicini, C.; Squitti, R.; Bevacqua, M. G.; Foresti, G.; Tura, G. B.; Gennarelli, M. (2006). No association between Ala9Val functional polymorphism of MnSOD gene and schizophrenia in a representative Italian sample. *Neuroscience Letters* **410**:208–211.

Wang, Y.; Kinzie, E.; Berger, F. G.; Lim, S. K.; Baumann, H. (1993) Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox Report* **6**:379-385.

Wassel, J. (2000). Haptoglobin: Function and polymorphism. *Clinical Laboratory* **46**: 547-552.

Weir, B. S. (1996). Genetic data analysis II. Sunderland, MA: Sinauer.

- Weir, B. S.; Anderson, A. D.; Hepler, A. B. (2006). Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Review Genetics* **7**:771–780.
- Weir, B. S.; Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**(6):1358-1370.
- Westen, A. A.; Matai, A. S.; Laros, J. F. J.; Meiland, H. C.; Jasper, M.; De Leeuw, W. J. F.; de Knijff, P.; Sijen, T. (2009). Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples. *Forensic Science International: Genetics* **3**(4):233-241.
- Wispe, J. R.; Warner, B. B.; Clark, J. C.; Day, C. R.; Neuman, J.; Glasser, S. W.; Crapo, J. D.; Chang, L.-Y.; Whitsett, J. A. (1992). Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *The Journal of Biology Chemistry* **267**:23937–23941.
- Wobeto, V. P.A.; Rosim, E. T.; Melo, M. B.; Calliari, L. E. P.; Sonati, M. F. (2007). Haptoglobin polymorphism and diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* **77**:385-388.
- Won, H-H.; Kim H-J.; Lee K-A.; Kim J-W. (2008). Cataloging Coding Sequence Variations in Human Genome Databases. *PLOS ONE* **3**(10): e3575.
- Yano, A.; Yamamoto, Y.; Miyaishi, S. And Ishizu, H. (1998). Haptoglobin Genotyping by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification. *Acta Medica* **52**(4):173–181.
- Young, R. P.; Hopkins, R.; Black, P. N.; Eddy, C.; Wu, L.; Gamble, G. D.; Mills, G. D.; Garrett, J. E.; Eaton, T. E.; Rees, M. I. (2006). Functional variants of antioxidant genes in smokers with COPD and in those with normal lung function. *Thorax* **61**:394–399.
- Zembruski, V. M.; Callegari-Jacques, S. M.; Hutz, M. H. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Annals of Human Genetics* **70**:822-828.
- Zhao, H.; Liang, D.; Grossman, B.; Wu, X. (2005). Glutathione peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology* **66**:769-774.

9. ANEXO I

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA
PROJETO BRASÍLIA

Nome:		No.
Endereço:		Telefone:
E-mail:		Estado civil:
Data de nascimento:		Sexo: <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M
Classificação fenotípica : () Br () Ng () Am (Ind) () Am (Asia) () Misto Se misto () Traços de Caucasoíde () Traços de Negroíde () Traços de Indígena () Traços de Asiático () Outros (especificar)		Foto 3 X 4
Ascendência materna: Ascendência paterna:		
Peso :	Pressão arterial 1 :	
Altura :	Pressão arterial 2 :	
Grau de Instrução:		Profissão:
Local de residência dos pais na data do nascimento:		
Filiação		
Pai :		Mãe :
Local de nascimento :		LN :
Avó paterna :		Avó materna :
LN :		LN :
Avó paterno :		Avó materno :
LN:		LN:
Tempo em Brasília (dos pais) :		Motivo da mudança :
Irmãos ? () Masc () Fem. Gêmeos ? () Não () Gêmeo Uni. () Masc. () Fem. () Gêmeo Bi. () Masc. () Fem. () Irmão Gêmeo Uni. () Masc. () Fem. () Irmão Gêmeo Bi. () Masc. () Fem. Outro:		
Alguma doença genética na família:		Qual (is):
Afetados:		
Nome do cônjuge:		Data de nascimento:
Consangüinidade entre os cônjuges		
LN:		Obs : Se nascido em Brasília, fazer ficha à parte
No. de filhos :	Gêmeos?	No. de abortos espontâneos:
No. de natimortos :		Causa:
No. de filhos mortos:		Causa:
Nome:		Sexo: () masc. () fem.
LN:		Idade:
Nome:		Sexo: () masc. () fem.
LN:		Idade:
Nome:		Sexo: () masc. () fem.
LN:		Idade:
OBS:		

10. ANEXO II



Genetics and Molecular Biology, 32, 3, 456-461 (2009)
Copyright © 2009, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil
www.sbg.org.br

Research Article

Haptoglobin gene subtypes in three Brazilian population groups of different ethnicities

Ana L. Miranda-Vilela, Arthur K. Akimoto, Penha C.Z. Alves, Cássia O. Hiragi, Guilherme C. Penalva, Silviene F. Oliveira, Cesar K. Grisolia and Maria N. Klautau-Guimarães

Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Abstract

Haptoglobin is a plasma hemoglobin-binding protein that limits iron loss during normal erythrocyte turnover and hemolysis, thereby preventing oxidative damage mediated by iron excess in the circulation. Haptoglobin polymorphism in humans, characterized by the Hp^1 and Hp^2 alleles, results in distinct phenotypes known as Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2, whose frequencies vary according to the ethnic origin of the population. The Hp^1 allele has two subtypes, Hp^{1f} and Hp^{1s} , that also vary in their frequencies among populations worldwide. In this work, we examined the distribution frequencies of haptoglobin subtypes in three Brazilian population groups of different ethnicities. The haptoglobin genotypes of Kayabi Amerindians ($n = 56$), Kalunga Afro-descendants ($n = 70$) and an urban population ($n = 132$) were determined by allele-specific PCR. The Hp^{1f} allele frequency was highest in Kalunga (29.3%) and lowest in Kayabi (2.6%). The Hp^{1f}/Hp^{1s} allele frequency ratios were 0.6, 1.0 and 0.26 for the Kayabi, Kalunga and urban populations, respectively. This variation was attributable largely to the Hp^{1f} allele. However, despite the large variation in Hp^{1f} frequencies, results of F_{ST} (0.0291) indicated slight genetic differentiation among subpopulations of the general Brazilian population studied here. This is the first Brazilian report of variations in the Hp^{1f} and Hp^{1s} frequencies among non-Amerindian Brazilians.

Key words: Brazilian ethnicities, haptoglobin, polymorphism, subtypes.

Received: October 22, 2008; Accepted: February 17, 2009.

Introduction

Molecular variation in human haptoglobin (Hp) was described by Smithies (1955), who identified three major phenotypes, Hp1-1, Hp2-1, and Hp2-2, by starch gel electrophoresis. These phenotypes are controlled by two autosomal codominant alleles, Hp^1 and Hp^2 (Smithies and Walker, 1956). Two subtypes of the Hp^1 allele, Hp^{1f} and Hp^{1s} , were subsequently identified in urea-containing starch gels (Smithies *et al.*, 1962). Despite populational differences in the distribution of haptoglobin phenotypes, these alleles have been found in every human population examined so far. The Hp^{1f} allele frequency is lower in South-East Asia and higher in South America (Langlois and Delanghe, 1996). There is also a significant difference in the frequency distribution of Hp^{1f} and Hp^{1s} alleles among populations worldwide (Carter and Worwood, 2007). An extreme case of populational variation was reported for the Hp^{1f} allele in which a geographical cline of this allele increased in the same direction as the Hp^1 allele,

whereas the Hp^{1s} frequency showed no variation (Delanghe *et al.*, 2000).

The Hp phenotypes determine the serum levels of Hp-glycoprotein but differ in their number of protein components, electrophoretic mobility, plasma concentration of Hp, and antioxidant and antiinflammatory activities, often with divergent clinical consequences (Langlois and Delanghe, 1996; Yano *et al.*, 1998; Wassel, 2000; Koch *et al.*, 2003; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004; Tseng *et al.*, 2004; Carter and Worwood, 2007). Many clinical studies have demonstrated a link between Hp polymorphism and a broad range of pathological conditions, and such associations probably reflect functional differences among the phenotypes (Langlois and Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004; Levy, 2006; Zvi and Levy, 2006). In contrast, other studies have reported no such associations, despite the wide range of Hp^{1f} and Hp^{1s} gene frequencies throughout the world (Carter and Worwood, 2007). These apparently divergent findings can only be understood through additional characterization of the distribution of Hp subtype polymorphisms.

The Brazilian population is very mixed, primarily as a result of five centuries of interethnic crosses among Europeans, Africans and Amerindians. This three-hybrid ge-

Sendo correspondência to Ana Luisa Miranda-Vilela. Laboratório de Genética, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil. E-mail: mirandavilela@unb.br.

netic admixture has been demonstrated by genetic and historical studies (Callegari-Jacques and Salzano, 1999; Alves-Silva et al., 2000; Carvalho-Silva et al., 2001; Mendes-Junior and Simões, 2001; Callegari-Jacques et al., 2003; Barcelos et al., 2006a,b; Suarez-Kurtz et al., 2007; Godinho et al., 2008). Haptoglobin is one of the genetic markers used to describe the genetic constitution of populations. However, there are few data on the haptoglobin gene subtypes in the general Brazilian population, although several reports on Hp subtypes (phenotypes) and types have been published, mostly for indigenous populations (reviewed by Salzano and Callegari-Jacques, 1988; Simões et al., 1989; Salzano et al., 1991, 1997a,b, 1998; Santos et al., 1998; Beiguelman et al., 2003; Calderoni et al., 2006; Zaccariotto et al., 2006). The aim of this work was to examine the frequencies of the Hp gene subtypes in three Brazilian population groups of different ethnic origins (Kayabi Amerindians, Kalunga Afro-descendants and inhabitants of the Federal District).

Subjects and Methods

Populations

1) The Kayabi are a Tupi-Guarani Amerindian tribe (Rodrigues, 1994) with a population of about 1,000 found mainly in the Xingu Indigenous National Park (Mato Grosso state). The Kayabi village sampled consisted of 110 individuals living on the margins of the Teles Pires River (11° 37' 0" S and 55° 40' 60" W) (Dórea et al., 2005; Klautau-Guimarães et al., 2005a,b). More details about this tribe can be found in Dórea et al. (2005). The sample ($n = 56$) used here was collected in 2000 and consisted of 29 males and 27 females, with a median age of 24.5 years and no first-degree (parent-offspring) relationship.

2) The Kalunga are an Afro-derived Brazilian group with an estimated population of 5,300. This group lives in midwestern Brazil, in a rural area of northeastern Goiás State (15° 30' S to 16° 03' S; 47° 25' W to 48° 12' W) (Oliveira et al., 2002). Historically and numerically, the Kalunga are one of the most important Brazilian Afro-derived populations known as quilombos. The Kalunga are organized into several subregions with different degrees of isolation. The sample ($n = 70$) used here was collected in 2001 and 2002 and consisted of 29 males and 41 females from the Vão das Almas and Vão de Muleque subregions, with a median age of 42.9 years and a relationship coefficient of up to 1/16.

3) The Federal District (15° 30' S to 16° 03' S and 47° 25' W to 48° 12' W) was founded in 1960 and in 2007 had an urban population of 2,455,903 (2007 IBGE census). Most of the Federal District population initially consisted of migrants from other regions of Brazil (Queiroz 2006), and currently almost half of the Districts inhabitants are migrants (www.districtofederal.df.gov.br). The sample used here ($n = 132$) was collected in 2002 and consisted of 54

males and 78 females and with a median age of 21.1 years. Based on the subjects self-declared skin color, 68.5% were racially mixed, 24.7% were white, 1.7% was black and 5.1% did not declare their color.

In each of the communities sampled, the aims of this study were explained and the voluntary nature of the donation of biological material was emphasized. Informed consent was obtained in all cases and oral informed consent was obtained in the Kayabi village.

Haptoglobin (Hp) genotyping

About 5 mL of peripheral blood was collected by venipuncture using Vacutainer tubes with EDTA as anticoagulant, and then cooled as quickly as possible. DNA was isolated from the buffy-coat layer by using a purification kit GFX (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) and the samples were stored below -20 °C until analysis.

Hp genotypes were determined by allele-specific PCR (polymerase chain reaction) as described by Yano et al. (1998). The identification of alleles Hp^{*02} , Hp^{*15} and Hp^{*2} was based on three independent PCR reaction product analyses. PCR products were separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide gels under non-denaturing conditions and then detected by staining with silver nitrate.

Data management and statistical analysis

Allelic and genotypic frequencies were estimated by gene counting and the goodness of fit of the genotype distribution to the Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the chi-square (χ^2) test. Values of $p > 0.05$ indicated Hardy-Weinberg equilibrium. Haptoglobin genetic diversity was assessed by comparing the observed and expected heterozygosities and the F-statistics. Probability (p) values for heterozygote excess were generated by the Genepop web statistical program version 3.4 (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Comparisons between the different ethnic groups (heterogeneity test) were based on contingency tables analyzed by χ^2 tests.

Results

Table 1 summarizes the distribution of the Hp allele frequencies in the populations studied. The Hp^{*2} allele frequency varied from 58.6% in the Afro-descendant Kalunga population to 43.7% in the indigenous Kayabi population. Based on the F-statistics (Table 1), the Brazilian population showed low genetic differentiation among subpopulations (F_{ST}) for Hp polymorphism, despite the large variation in Hp^{*15} frequencies.

Table 2 shows the Hp genotype frequencies in the Kayabi, Kalunga and Federal District populations and the results of the Hardy-Weinberg equilibrium test. The genotypic distributions indicated Hardy-Weinberg equilibrium, except for the Kayabi population, in which there was a heterozygote excess ($F_{IS} = -0.5876$), as shown in Table 1.

Table 1 - Distribution of haptoglobin allele frequencies and F-statistics in the Kayabi, Kalunga and Federal District populations.

Populations	Hp ^s alleles			Hp ^u allele	Heterozygosity observed (H _o)	Heterozygosity expected (H _e)	F _{IS} (inbreeding coefficient)	F _{ST}	F _{IT}	
	Hp ^{s1}	Hp ^{s2}	Total							
Kayabi (n = 56)	0.481	0.026	0.437	0.568	0.8214*	0.5174*	-0.5876	-0.1592	0.0291	-0.1255
Kalunga (n = 70)	0.293	0.293	0.586	0.414	0.7429	0.6570	-0.1308			
Federal District (n = 132)	0.394	0.102	0.496	0.504	0.4697	0.5800	0.1902			
Mean	0.366	0.140	-	0.494	0.6779	0.5849				

*p < 0.05. P-values data for heterozygote excess were generated using statistical program Genepopweb version 3.4.

Heterogeneity tests for all pairwise comparisons among the three populations revealed significant differences (Table 2).

Discussion

In this study, there were significant differences in Hp allele frequencies among the three Brazilian populations of different ethnicities. The Hp^s allele frequency was higher in the Kalunga (Afrodescendants) and lower in the Kayabi (Amerindian), in which the Hp^u allele was most frequent. These results agreed with literature (reviewed by Carter and Worwood 2007), since they showed geographical differences in the Hp^s and Hp^u frequencies, depending on the ethnic origin of the group. We also observed significant differences in the distribution of the Hp^{s1} and Hp^{s2} alleles. The results for the Kalunga, Kayabi and Federal District agree, respectively, with the Hp^s allele frequencies described for Brazilian Afro-descendants (55%) (Tondo *et*

al., 1963), Içana River Indians (43%) (Simões *et al.*, 1989) and an urban group from São Paulo (46.5%) (Wobeto *et al.*, 2007). The Hp^u allele frequency in the Kalunga (58%) was also similar to that described for the African continent (0.56) and North America (0.55), but higher than in Asia (0.27) (Carter and Worwood, 2007), probably because of the contribution of Afro-descendants that formed the quilombo. For the Kayabi, the frequency of the Hp^u allele (44%) was similar to that reported for three South American Amerindian populations, viz., the Makiritare (42%), Kubenokre (49%) (Arends *et al.*, 1970; Santos *et al.*, 1998) and the French Guiana population of Kalifá (44.5%) (Mazières *et al.*, 2007), but was lower than for other Brazilian Amerindians (Salzano *et al.*, 1974, 1991, 1997a,b, 1998; Oliveira *et al.*, 1998).

The Hp^s allele frequency (49.6%) of the Federal District urban population was similar to that reported for other Brazilian urban populations from São Paulo state (46%)

Table 2 - Frequencies of the haptoglobin genotypes and the Hardy-Weinberg (HW) and heterogeneity test in the Kayabi, Kalunga and Federal District populations.

Populations	Genotypes	N	Genotype frequencies	HW test (p-values)	Heterogeneity test (p-values)	
Kayabi (n = 56)	1-1	Hp ^{s1} Hp ^{s1}	0	0	0.000	Kayabi x Kalunga < 0.0001
		Hp ^{s1} Hp ^{s2}	3	0.05		
		Hp ^{s2} Hp ^{s2}	0	0		
	2-1	Hp ^{s1} Hp ^u	43	0.77		
		Hp ^{s2} Hp ^u	0	0		
	2-2	Hp ^u Hp ^u	10	0.18		
Kalunga (n = 70)	1-1	Hp ^{s1} Hp ^{s1}	6	0.09	0.130	Kalunga x Federal District < 0.0001
		Hp ^{s1} Hp ^{s2}	14	0.20		
		Hp ^{s2} Hp ^{s2}	2	0.03		
	2-1	Hp ^{s1} Hp ^u	15	0.21		
		Hp ^{s2} Hp ^u	23	0.33		
	2-2	Hp ^u Hp ^u	10	0.14		
Federal District (n = 132)	1-1	Hp ^{s1} Hp ^{s1}	26	0.20	0.051	Federal District x Kayabi < 0.0001
		Hp ^{s1} Hp ^{s2}	13	0.10		
		Hp ^{s2} Hp ^{s2}	2	0.02		
	2-1	Hp ^{s1} Hp ^u	39	0.30		
		Hp ^{s2} Hp ^u	10	0.08		
	2-2	Hp ^u Hp ^u	42	0.30		

(Wobeto *et al.*, 2007) and Euro-descendants from Porto Alegre (41.4%) (Tondo *et al.*, 1963). The distribution of the Hp alleles in the Federal District population probably reflects the history of the creation of Brasília, the new Brazilian capital, in the late 1950s. Unlike most Brazilian cities, Brasília and the accompanying Federal District were completely new projects in which settlement of the Federal Capital was driven by government benefits. The construction of Brasília (1956-1960) was the main attraction for migrants, who came from northern, southeastern and southern Brazil (Queiroz, 2006). As a result, the population of Brasília and the Federal District was formed by a wide-ranging mixture of migrants from all regions of Brazil (Queiroz, 2006) that reflected five centuries of interethnic crosses among people of European, African and Amerindian descent (Alves-Silva *et al.*, 2000; Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Mendes-Junior and Simões, 2001; Vargas *et al.*, 2006; Suarez-Kurtz *et al.*, 2007; Godinho *et al.*, 2008). This very diverse origin of the Federal District population has made it the most representative sample-group of the Brazilian population.

The present study provides the first report of variations in the Hp^{*19} and Hp^{*15} frequencies in non-Amerindian Brazilians. The frequency of the Hp^{*19} allele was highest in the Afro-descendant Kalunga (29.3%) and lowest in the indigenous population of Kayabi (2.6%). This finding agrees with reports in which a higher Hp^{*19} frequency has been linked to a higher Hp^{*15} frequency (Delanghe *et al.*, 2000; Carter and Worwood, 2007). In addition, the Hp frequency distribution in the populations studied was not homogenous ($p < 0.0001$ in the heterogeneity test) and probably reflected selection or recent ethnic admixture. The Hp^{*19}/Hp^{*15} allele frequency ratios among these populations were 0.06 for the Kayabi, 1.0 for the Kalunga and 0.26 for the Federal District. This variation was attributable essentially to the Hp^{*19} allele since variation in the Hp^{*15} allele frequency was very low among these populations (no marked geographical differences). Similar variation in the Hp^{*19} allele has been reported for Central American populations (Delanghe *et al.*, 2000), although the ratios were different from those seen here.

The Kayabi population had Hp genotype frequencies that were not in Hardy-Weinberg equilibrium, with an excess of heterozygotes ($F_{IS} = -0.5876$). Factors that could account for this finding include the following: (i) the Kayabi live in an area that has experienced intense migration as a result of gold prospecting, and they have consequently become somewhat mixed (Klautau-Guimarães *et al.*, 2005b), (ii) the Hp phenotypes are associated with several disorders such as diabetes and cardiovascular and infectious diseases (Langlois and Delanghe, 1996; Sadrzadeh and Bozorgmehr, 2004; Carter and Worwood, 2007) that may have subjected the population to some form of natural selection and (iii) the Kayabi population consumes freshwater fish contaminated by monomethyl mercury, and is also exposed

to endemic infectious diseases such as malaria, for which they lack basic medical services (Dórea *et al.*, 2005; Klautau-Guimarães *et al.*, 2005a); the latter two hypotheses suggest selection in favor of heterozygotes.

Since F_{IT} and F_{IS} represent the correlations between the two uniting gametes that produce individuals in the total population and subpopulations, respectively (Nei 1977), and since our results for these parameters were negative in both cases, this implies an excess of heterozygotes in both situations. However, these results were affected by the Kayabi population. In addition, given that F_{ST} is the correlation between two gametes drawn at random from each subpopulation and measures the degree of genetic differentiation of subpopulations (Nei 1977), our results ($F_{ST} = 0.0291$) showed that there was a slight genetic differentiation among subpopulations of the general Brazilian population studied.

In conclusion, we have provided the first description of the distribution frequencies of the Hp subtypes Hp^{*19} and Hp^{*15} in three Brazilian populations of different ethnic origins. For haptoglobin polymorphism, despite the large variation in Hp^{*19} frequencies, results of F_{ST} (0.0291) indicated slight genetic differentiation among subpopulations of the general Brazilian population studied. This polymorphism has proven to be an interesting biomarker for understanding human migrations around the world and for identifying associations with diseases. Additional studies are required to map the distribution of these Hp subtypes in other ethnicities, and to gain a better understanding of the biological significance of this marker for anthropogenic studies.

Acknowledgments

This study was supported by the University of Brasília and the Brazilian National Council for Technological and Scientific Development (CNPq).

References

- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandedt HU, Pena SDJ and Prado VF (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444-461.
- Arends T, Weikamp LR, Gallango ML, Neel JV and Schultz J (1970) Gene frequencies and microdifferentiation among the Makiritare Indians. II. Seven serum protein systems. *Am J Hum Genet* 22:526-532.
- Barcelos RSS, Ribeiro GGBL, Silva-Junior WA, Abe-Sandes K, Marinho-Neto F, Gigenzas MAD, Klautau-Guimarães MN and Oliveira SF (2006a) Male contribution in the constitution of the Brazilian Centro-Oeste population estimated by Y-chromosome binary markers. In: *International Society of Forensic Genetics (eds) Progress in Forensic Genetics*, v. 11, 11th edition. Elsevier Science, Amsterdam, pp 228-230.
- Barcelos RSS, Silva-Junior WA, Abe-Sandes K, Godinho NMO and Oliveira SF (2006b) Contribución parental en la constitución de poblaciones del Brasil Central estimada por el cromosoma Y y marcadores del mtADN. In: *Sociedade Espanhola de Antropologia Física (ed) Diversidade Bioló-*

- gica e Saúde Humana. 1a edição, Quaderia Editorial, Múrcia, pp 55-60.
- Beiguelman B, Alves FP, Moura MM, Engracia V, Nunes ACS, Heckmann MIO, Ferreira RGM, Pereira da Silva LH, Camargo EP and Krieger H (2003) The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian Western Amazonian region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:455-460.
- Cakkeroti DR, Andrade TD and Grotto HZW (2006) Haptoglobin phenotype appears to affect the pathogenesis of American trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 100:213-221.
- Callegari-Jacques SM and Salzano FM (1999) Brazilian Indian/non-Indian interactions and their effects. *Ciênc Cult* 51:166-174.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME and Hutz MH (2003) Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol* 15:824-834.
- Carter K and Werwood M (2007) Haptoglobin: A review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hem* 29:92-110.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J and Pena SDJ (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 68:281-286.
- Delanghe J, Langlois M, Esquivel CA and Haene H (2000) Haptoglobin IF allele frequency is high among indigenous populations in the State of Durango, Mexico. *Hum Hered* 50:263-265.
- Dórea JG, Souza JR, Rodrigues P, Ferrari I and Barbosa AC (2005) Hair mercury (signature of fish consumption) and cardiovascular risk in Mundurucu and Kayabi Indians of Amazonia. *Environ Res* 97:209-219.
- Godinho NMO, Gontijo CC, Diniz MECG, Falção-Alencar G, Dalton GC, Amorim CEG, Barcelos RSS, Klautau-Guimarães MN and Oliveira SF (2008) Regional patterns of genetic admixture in South America. *PLoS Genet* 4:e329-330.
- Klautau-Guimarães MN, D'Ascenção R, Cakkeroti FA, Grisolia CK, Souza JR, Barbosa AC, Cordeiro CMT and Ferrari I (2005a) Analysis of genetic susceptibility to mercury contamination evaluated through molecular biomarkers in at-risk Amazon Amerindian populations. *Genet Mol Biol* 28:827-832.
- Klautau-Guimarães MN, Hiragi CO, D'Ascenção RF, Oliveira SF, Grisolia CK, Hatagima AH and Ferrari I (2005b) Distribution of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null phenotypes in Brazilian Amerindians. *Genet Mol Biol* 28:32-35.
- Koch W, Latz W, Eichinger M, Gschwendner C, Teige B, Schömig A and Kastani A (2003) Haptoglobin gene subtyping restriction enzyme analysis. *Clin Chem* 49:1937-1940.
- Langlois MR and Delanghe JR (1996) Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 42:1589-1600.
- Levy AP (2006) Application of pharmacogenomics in the prevention of diabetic cardiovascular disease: Mechanistic basis and clinical evidence for utilization of the haptoglobin genotype in determining benefit from antioxidant therapy. *Pharmacol Ther* 112:501-512.
- Mazères S, Sevin A, Borriet F, Crubéry E, Salzano F and Larrouy G (2007) Genetic studies in French Guiana populations: Synthesis. *Am J Phys Anthropol* 132:292-300.
- Mendes-Junior CT and Simões AL (2001) Alu insertions and ethnic composition in a Brazilian population sample. *Int J Hum Genet* 1:249-254.
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum Genet* 41:225-233.
- Oliveira SF, Lopes DEBL, Santos SEB and Guerreiro JF (1998) The Awá-Guajá Indians of the Brazilian Amazon: Demographic data, serum protein markers and blood groups. *Hum Hered* 48:163-168.
- Oliveira SF, Pedrosa MAF, Souza SMB, Mingroni-neto R, Sandes KA, Ferrari I, Barbosa AAL, Auricchio MTBM and Klautau-Guimarães MN (2002) Heterogeneous distribution on HbS and HbC alleles in Afro-derived Brazilian populations. *Int J Hum Genet* 2:153-160.
- Rodrigues AD (1994) *Línguas Brasileiras: Pam o Conhecimento das Línguas Indígenas*. Loyola, São Paulo, 136 pp.
- Sadrzadeh SMH and Bozorgmehr J (2004) Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Pathol* 121:S97-S104.
- Salzano FM and Callegari-Jacques SM (1988) South American Indians: A Case Study in Evolution. Clarendon Press, Oxford, 259 pp.
- Salzano F, Woodall JP, Black FL, Weikamp LR and Franco MHL P (1974). Blood groups, serum proteins and hemoglobins of Brazilian Tiriyo Indians. *Hum Biol* 46:81-87.
- Salzano FM, Black FL, Callegari-Jacques SM, Santos SEB, Weimer TA, Mestriner MA, Kubo RR, Pandey JP and Hutz MH (1991) Blood genetic systems in four Amazonian Tribes. *Am J Phys Anthropol* 85:51-60.
- Salzano F, Callegari-Jacques SM, Weimer TA, Franco MHL P, Hutz MH and Petzl-Erler ML (1997a) Electrophoretic protein polymorphisms in Kaingang and Guaraní Indians of southern Brazil. *Am J Hum Biol* 9:505-512.
- Salzano F, Franco MHL P, Weimer TA, Callegari-Jacques SM, Mestriner MA, Hutz MH, Flowers NM, Santos RV and Coimbra Jr CEA (1997b) The Brazilian Xavante Indians revisited: New protein genetic studies. *Am J Phys Anthropol* 104:23-34.
- Salzano FM, Weimer TA, Franco MHL P, Callegari-Jacques SM, Mestriner MA, Hutz MH, Santos RV and Coimbra Jr CEA (1998) Protein genetic studies among the Tupi-Mondé Indians of the Brazilian Amazonia. *Am J Hum Biol* 10:711-722.
- Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC, Guerreiro JF, Santos EJM, Weimer TA, Callegari-Jacques SM, Mestriner MA, Franco MHL P, Hutz MH and Salzano FM (1998) New protein genetic studies in six Amazonian Indian populations. *Am Hum Biol* 25:505-522.
- Simões AL, Kömpf J, Ritter H, Luckenbach C, Zischler H and Salzano FM (1989) Electrophoretic and isoelectric focusing studies in Brazilian Indians: Data on four systems. *Hum Biol* 61:427-438.
- Smithies O (1955) Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal adults. *Biochem J* 61:629-641.
- Smithies O and Walker NF (1956) Notation for a serum-protein group and the genes controlling their inheritance. *Nature* 178:694-695.
- Smithies O, Connell GE and Dixon GH (1962) Inheritance of haptoglobin subtypes. *Am J Hum Genet* 14:14-21.
- Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Strachiner CJ, Bastos-Rodrigues L and Pena SDJ (2007) Self-reported skin color, genomic an-

- cestry and the distribution of GST polymorphisms. *Pharmacogenet Genom* 17:765-771.
- Tondo CV, Mundi C and Salzano FM (1963) Haptoglobin types in Brazilian negroes. *Ann Hum Genet* 26:325-331.
- Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Lin HC and Mao SJT (2004) Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* 4:2221-2228.
- Vargas AE, Marreto AR, Salzano FM, Bortolini MC and Chies JAB (2006) Frequency of CCR5Δ32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 39:321-325.
- Wassel J (2000) Haptoglobin: Function and polymorphism. *Clin Lab* 46:547-552.
- Wobeto VPA, Rosim ET, Melo MB, Calliani LEP and Sonati MF (2007) Haptoglobin polymorphism and diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Diabetes Res Clin Pract* 77:385-388.
- Yano A, Yamamoto Y, Miyaiishi S and Ishizu H (1998) Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Med* 52:173-181.
- Zaccarotto TR, Rosim ET, Melo D, Garcia PMD, Munhoz RR, Aoki FH and Sonati MF (2006) Haptoglobin polymorphism in a HIV-1 seropositive Brazilian population. *J Clin Pathol* 59:550-553.
- Zvi B and Levy AP (2006) Haptoglobin phenotypes, which one is better and when? *Clin Lab* 52:29-35.

Internet Resources

- Queiroz EP (2006) A migração intrametropolitana no Distrito Federal e Entorno: O conseqüente fluxo pendular e o uso dos equipamentos urbanos de saúde e educação. http://www.abep.nepo.unicamp.br/encontro2006/docs/pdf/ABEP2006_724.pdf (January 12, 2009).

Associate Editor: Francisco Mauro Salzano

License Information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.