



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

CONTRIBUIÇÕES DO GENE *DRD4* PARA ESTUDOS DE GENÉTICA- HISTÓRICA E DE ASSOCIAÇÃO EM POPULAÇÕES NATIVAS DA AMÉRICA DO SUL

Tovo-Rodrigues, L¹; Callegari-Jacques, S M^{1,3}; Petzl-Erler, M L²; Tsuneto L³, Salzano FM¹, Hutz, M H¹

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ²Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; ³Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; Email para contato: 00128985@ufrgs.br

O *DRD4* é um dos genes mais variáveis do genoma humano. Em seu terceiro éxon há um polimorfismo do tipo VNTR de 48 pb cujas variantes apresentam uma grande diversidade em populações humanas, sendo descritos alelos de 2 a 11 repetições, provavelmente com diferenças farmacológicas entre eles. O alelo quatro repetições (4R) é o único presente em todas as populações com frequência média de 65%. Os outros alelos mais frequentes são o 7R (19%) e o 2R (9%) enquanto os demais somam apenas 7%. O alelo 7R é descrito como mais frequente em populações nativas da América do Sul e praticamente ausente nas populações asiáticas, enquanto o 2R é mais prevalente nas populações asiáticas, sendo raro, por sua vez, nas populações ameríndias (Chang *et al*, 1996). De acordo com Ding *et al* (2002), todos os alelos são derivados do ancestral 4R, muitos deles por eventos de recombinação/mutação. O alelo 7R teria se originado por um evento mutacional recente e estaria sob seleção positiva em todas as populações, porém a vantagem seletiva não seria a mesma em todas elas. Populações nativas da região amazônica foram estudadas quanto a este polimorfismo por Hutz *et al* (2000). Os autores observaram frequências elevadas do alelo 7R, além de estruturação genética entre o norte e o sul do rio Amazonas. Recentemente Marignac & Bianchi (2006) estudando populações chaquenhãs e patagônicas nativas da Argentina descreveram outro perfil de frequências alélicas, com o alelo 4R sendo mais frequente do que o encontrado por Chang *et al* (1996) e Hutz *et al* (2000). Dados relativos à variação genética existente em genes candidatos em populações de diferentes origens étnicas são importantes porque permitem tentar compreender o impacto da heterogeneidade étnica em diferentes patologias. Em estudos do tipo caso-controle é importante que os dois grupos sejam equivalentes em relação à proporção de indivíduos de diferentes origens, principalmente quando a distribuição alélica é variável e tem um padrão étnico definido, como o *DRD4*, para que o estudo não seja limitado pelo fator estratificação populacional. Como esse gene tem sido considerado candidato em diversos estudos de associação com doenças psiquiátricas, como esquizofrenia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, abuso de drogas e transtorno bipolar, é importante que a variabilidade dos nativos da América do Sul seja conhecida, uma vez que representam um dos três grupos parentais das populações atuais desse continente. Com o objetivo de estudar a variabilidade genética de populações do centro-sul da América do Sul



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

para o VNTR de 48 pb localizado no éxon III do *DRD4*, foram analisadas as populações Kaingang e Guarani do centro-sul do Brasil. Estes dados foram acrescentados aos já publicados para re-avaliar a variabilidade genética deste *locus* na América do Sul. A amostra foi constituída de 72 indivíduos da população Kaingang de Nonoai, Rio Grande do Sul, 50 da Guarani-Kaiowá das reservas indígenas de Amambaí e Limão-Verde e 50 da Guarani-Ñandeva, das reservas de Porto Lindo e Amambaí, do Estado de Mato Grosso. O DNA foi obtido do sangue periférico e extraído através da técnica de “salting out” descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). A região do gene *DRD4* estudada (éxon III contendo o VNTR de 48 pb) foi amplificada por PCR e os genótipos identificados como descrito por Roman *et al* (1999). Os dados obtidos foram reunidos aos publicados por Chang *et al* (1996), Hutz *et al* (2000) e Marignac & Bianchi (2006) para análises globais. As análises incluíram 19 populações, totalizando 568 indivíduos. A estruturação populacional foi testada por AMOVA, através do programa ARLEQUIN v. 3.11. Os valores de F_{ST} para cada região geográfica foram obtidos pelo mesmo programa. As medidas de diversidade gênica foram calculadas de acordo com Nei (1987) através do programa DISPAN. Também foi calculada a correlação bivariada de Pearson entre latitude e frequência do alelo 7R, através do programa SPSS v 12.0. As frequências dos alelos 4R e 7R obtidas nas populações estudadas foram, respectivamente 0,530 e 0,370 para a população Kaingang, 0,280 e 0,520 para a Guarani-Kaiowá e 0,480 e 0,440 para a Guarani-Ñandeva. A frequência média do alelo 7R observada (0,443) mostrou-se intermediária entre aquelas obtidas por Chang *et al* (0,628; 1996) e Hutz *et al*, (0,544; 2000) e as relatadas por Marignac & Bianchi (0,341; 2006). Os valores de heterozigosidade variaram de 0,579 (Guarani-Ñandeva) a 0,625 (Guarani-Kaiowá). Os resultados obtidos pela AMOVA mostraram que a localização geográfica é fator importante para explicar a estruturação das populações na América do Sul. Quando se considerou que a geografia gênica neste continente é representada por duas macro-regiões ($F_{CT} = 0,06$), Andes e terras baixas, obteve-se um valor $p = 0,055$. No entanto, quando se testou uma subdivisão em três grandes grupos (Andes, Centro-sul e Amazônia), verificou-se uma diferença clara entre as frequências gênicas destas três regiões ($F_{CT} = 0,06$; $p = 0,015$). Além disso, o valor obtido pela correlação de Pearson ($r = 0,557$; $p = 0,016$) indicou que a frequência do alelo 7R sofre uma redução em direção ao sul da América do Sul. A hipótese de diferença entre populações devida à afiliação linguística também foi testada pela AMOVA, não se obtendo resultado estatisticamente significativo ($F_{CT} = 0,04$; $p = 0,100$). Valores de F_{ST} calculados entre as três divisões refletiram a redução do fluxo gênico entre elas: Andes e Centro-sul (0,020; $p = 0,027$); Amazônia e Andes (0,157; $p < 0,001$) e Amazônia e Centro-sul (0,061; $p < 0,001$). Callegari-Jacques *et al* (2007), através da análise da distribuição dos haplótipos do *cluster* da globina β em 28 populações nativas da América do Sul, obtiveram resultados semelhantes aos deste trabalho. Os autores também observaram valor de F_{CT} maior para estruturação genética das populações do continente quando foi proposta a separação em três regiões. Assim, as duas hipóteses levantadas por eles podem ser usadas para explicar os padrões observados para a distribuição alélica do *DRD4*:



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

1 – Um primeiro grupo de habitantes contendo baixas frequências do alelo 7R teria entrado na América do Sul seguindo as rotas das costas leste e oeste e posteriormente seguido para o interior do continente. Um segundo grupo, com frequências maiores do alelo 7R, teria colonizado a região amazônica, forçando o movimento dos primeiros para o sul;

2 – Após a travessia do Istmo do Panamá, os primeiros migrantes se dividiram em dois grupos que se expandiram pela América: um caracterizado pela baixa frequência do alelo 7R, seguiu a rota da costa andina e depois se moveu pela região sul, em direção à Argentina e sul e leste do Brasil. O outro grupo, com altas frequências deste alelo, se distribuiu na região Amazônica.

Além dessas, uma terceira hipótese é possível, considerando o efeito da seleção natural sobre o alelo 7R. Ela é semelhante à segunda proposta por Callegari-Jacques *et al* (2007), com duas ondas, uma pelos Andes e outra pela Amazônia. A diferença está na possibilidade não de uma entrada dos andinos na região sul-sudeste do continente, mas sim de uma perda gradual da vantagem seletiva com o deslocamento das populações da região amazônica em direção ao sul. Apesar de ter sido considerado apenas um *locus*, a divisão em três regiões geográficas observadas neste trabalho oferece importantes informações para estudos associação com diferentes patologias. Dada a natureza tri-étnica da população sul-americana em geral e da brasileira em particular, o controle pela composição genética da população em estudos tipo caso-controle é mandatório. Os resultados mostram que se deve ter cautela ao considerar o VNTR do éxon III do *DRD4* nos estudos de associação envolvendo populações de diferentes regiões do Brasil. Dada a heterogeneidade observada, é importante que seja respeitada a equivalência genético-geográfica dos grupos caso e controle quando indivíduos com ascendência ameríndia estiverem envolvidos no estudo.

- Callegari-Jacques SM, Crossetti SG, Kohlrausch FB, Salzano FM, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Hill K, Hurtado AM and Hutz MH (2007) The beta-globin gene cluster distribution revisited-patterns in Native American populations. *Am J Phys Anthropol* 134(2):190-7.
- Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pkstis AJ and Kidd KK (1996) The world-wide distribution allele frequencies at human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98:91-101.
- Ding Y-C, Chi H-C, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, Zhang Y-P and Moyzis RK (2002) Evidence of positive receptor selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:309-314.
- Hutz MH, Almeida S, Coimbra JR CEA, Santos RV and Salzano FM (2000) Haplotype and allele frequencies for three genes of the dopaminergic system in South American Indians. *Am J Hum Biol* 12:638-645.
- Lahiri DK and Nurnberger JI (1991) A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Aci Res* 19:5444.
- Marignac VL and Bianchi NO (2006) Prevalence of dopamine and 5HT2C receptor polymorphisms in Amerindians and in an urban population from Argentina. *Am J Hum Biol* 18(6):822-8.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH (1999) Lack of association of the dopamine receptor D4 gene



XVI Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, de 27 à 29 de julho de 2008

polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. *Addict Biol* 4:203-207