

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências

Distribuição do polimorfismo do gene *DRD4*
(VNTR – 48pb) em três populações do centro-sul
do Brasil

Luciana Tovo Rodrigues

Professor Orientador: Dra. Sidia Maria Callegari-Jacques

Professor Co-Orientador: Dra. Mara Helena Hutz

Trabalho apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel no
Curso de Ciências Biológicas ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Porto Alegre, junho de 2008

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCIÊNCIAS

BIO
BIO
482

Distribuição do polimorfismo do gene *DRD4* (VNTR – 48pb) em três populações do centro-sul do Brasil

Luciana Tovo-Rodrigues¹, Mara H Hutz¹, Maria L Petzl-Erler², Luiza T Tsuneto³,
Francisco M Salzano¹, Sidia M Callegari-Jacques^{1,3}.

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;

Palavras-chave: *DRD4*, populações indígenas, estrutura genética, seleção natural.

Autor responsável:

Sidia Maria Callegari Jacques

E-mail: sidia.jacques@ufrgs.br

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15053, CEP 91501-970 – Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: (51) 33086719

Artigo a ser submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*.

UFRRS - BIBLIOTECA
DE BIOCIÊNCIAS

RESUMO

Foi investigada a variação do VNTR de 48 pb do éxon III do gene *DRD4* em 172 indivíduos nativos americanos das populações Guarani (subgrupos Kaiowá e Nandeva) e Kaingang do sul do Brasil. As freqüências alélicas desse *locus* foram comparadas com as de mais 20 outras populações ameríndias. A freqüência do alelo 7R foi menor do que a observada para populações amazônicas e semelhante às observadas para populações da Argentina. Os resultados da Análise da Variância Molecular (AMOVA) mostraram diferença entre a América do Norte e América do Sul quanto a este polimorfismo ($F_{CT} = 0,077$; $p = 0,014$). Considerando apenas a América do Sul, o modelo de estruturação considerando três grupos geográficos (Andes, Amazônia e Centro-sul) se adequou melhor aos dados ($F_{CT} = 0,056$; $p = 0,015$) do que o modelo de estruturação por afiliação lingüística. Foi observada uma correlação positiva entre a freqüência do alelo 7R e a latitude ($r = 0,557$; $p = 0,016$). A clara divisão das freqüências gênicas em três regiões na América do Sul pode ser explicada por forças seletivas diferenciais, deriva e/ou fatores demográficos.

INTRODUÇÃO

O gene do receptor de dopamina humano D4 (*DRD4*) é importante foco de estudos nos campos da neurologia, psiquiatria, psicologia, endocrinologia e farmacologia. Esse gene, localizado no cromossomo 11 (11p.15.5), é um dos mais variáveis no genoma, contendo diversos polimorfismos em sua extensão. Muito de sua variação está contida no éxon III, no qual são encontradas diferenças de comprimentos dos alelos devidas a um número variável de repetições em tandem (VNTR) de 48 pares de bases e substituições únicas de pares de bases (SNPs) na região das repetições (Lichter *et al.*, 1993).

O éxon III codifica um domínio rico em prolina que corresponde à terceira alça citoplasmática do receptor que medeia os níveis intracelulares de Adenosina monofosfato cíclico (Asghari *et al.*, 1994). Em humanos é descrita a variação de 2 a 11 repetições do VNTR, provavelmente com diferenças farmacológicas entre eles, além de haver 67 diferentes variantes haplotípicas se os SNPS forem considerados (Ding *et al.*, 2002; Grady *et al.*, 2003)

O alelo 7R do éxon III foi o primeiro a ser associado a dimensões de personalidade (dimensão "busca de novidades" - *novelty-seeking*, Ebstein *et al.*, 1996, Sullivan *et al.*, 1998). Além disso, foi estudada associação desse *locus* com tendências de impulsividade e/ou de hiperatividade (por exemplo, Rowe *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 1998), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Faraone *et al.*, 2001; Carrasco *et al.*, 2004; Brookes *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2005), esquizofrenia (Kohn *et al.*, 1997; Mitsuyasu *et al.*, 2007), alcoolismo (Bau *et al.*, 1999; Roman *et al.*, 1999), surtos psicóticos (Aguirre *et al.*, 2007) e transtorno bipolar e esquizofrenia (Serretti *et al.*, 2004).

Em um estudo que visou a estudar a variabilidade dessa região em 36 populações mundiais, Chang *et al.* (1996) observaram que a distribuição dos alelos não é homogênea entre populações. O único alelo que é observado em todas elas é o de quatro repetições

(4R), sendo o mais freqüente (freqüência média de 65%). Os outros alelos mais freqüentes são o 7R (19%) e o 2R (9%) enquanto os demais somam apenas 7%. O 7R varia de 0 a 78%, sendo mais comum nas populações ameríndias da América do Sul e praticamente ausente nas populações asiáticas. O alelo 2R é mais prevalente na Oceania (30 - 40%) do que nas outras populações, sendo raro, por sua vez, nas populações ameríndias (Chang *et al.*, 1996; Hutz *et al.*, 2000). A variabilidade genética foi também descrita em populações da Rússia (Borinskaya *et al.*, 2004) e da Índia (Ghosh & Seshadri, 2005), tendo-se observado gradientes geográficos nas freqüências dos alelos.

Todos os alelos relativos a esse polimorfismo do gene *DRD4* 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 - o que explicaria a sua alta freqüência - porém a vantagem seletiva não seria a mesma em todas as populações - o que explicaria a diferença de freqüência em diferentes populações do mundo (Ding *et al.*, 2002).

Hutz *et al.* (2000) estudaram cinco populações amazônicas quanto a esse polimorfismo e confirmaram os resultados de Chang *et al.* (1996) relativos às freqüências elevadas do alelo 7R e observaram estruturação genética entre o norte e o sul do rio Amazonas. Baseados nesses resultados, sugeriram que possivelmente esse alelo, por estar associado ao traço de personalidade de busca de novidades, teria um papel diferencial nos nativos americanos, e possivelmente estaria relacionado ao seu hábito de vida caçador-coletor. Chen *et al.*, (1999) objetivando propor um significado biológico para o perfil 7R dos ameríndios, obtiveram uma correlação positiva entre a freqüência do alelo 7R e a distância percorrida pelas populações estudadas por Chang *et al.*, (1996) durante sua migração na pré-história, justificando as altas freqüências observadas nas populações ameríndias.

Recentemente Marignac & Bianchi (2006) estudando populações nativas chaquenhas e patagônicas da Argentina descreveram outro perfil de freqüências alélicas, com o alelo 4R sendo mais freqüente 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. Além disso, servem de base para elucidação da sua possível associação com o traço fenotípico estudado caso a metodologia envolva a comparação entre grupos caso e controle (Ghosh & Seshadri, 2005). Nesse tipo de estudo é importante que os grupos caso e controle sejam equivalentes em relação à proporção de indivíduos de diferentes origens étnicas, 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.

A grande diversidade cultural, lingüística e biológica das populações ameríndias tem levado diversos pesquisadores a estudá-las do ponto de vista genético tanto para esclarecer questões históricas, quanto para usar a informação para controle da estrutura populacional em estudos de associação genética-doença. Como o *DRD4* tem sido considerado gene candidato em diversos estudos de associação realizados com populações da América do Sul, é importante que a variabilidade dos nativos desse continente seja conhecida, uma vez que representam um dos três grupos parentais das populações atuais.

Considerando o elevado número de grupos indígenas do Brasil, a quantidade de informação sobre o gene *DRD4* nesses grupos é escassa e, quando considerada a região centro-sul, é inexistente.

Neste trabalho, serão apresentados novos dados referentes a 172 indivíduos das populações Kaingang e Guarani, do sul do Brasil, quanto ao éxon III do gene *DRD4*. Estes dados serão acrescidos aos já publicados, para reavaliar a variabilidade genética deste *locus* em populações da América do Su.

Os nossos resultados fornecem informações importantes para esclarecer questões evolutivas de populações ameríndias e têm implicações diretas e práticas para estudos de associação.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações

Duas populações nativas americanas foram estudadas: Kaingang e Guarani (subgrupos Ñandeva e Kaiowá). Elas são as maiores tribos de ameríndios do sul do Brasil, pertencendo, respectivamente aos estoques lingüísticos Je e Tupi (Campbell, 1997). Ambas as tribos encontram-se em estágio avançado de aculturação mas ainda conservam sua linguagem e vivem em reservas indígenas, mantendo um relativo isolamento em relação aos não-indígenas. Apesar de viverem próximas geograficamente por muito tempo, estas tribos ainda conservam características biológicas e culturais diferentes entre si (Petz-Erler *et al.*, 1993). Os indivíduos que constituem a amostra de Kaingangs (N=72) são de Nonoai, Rio Grande do Sul, enquanto os Guarani-Kaiowá (N=50) são das reservas indígenas de Amambaí e Limão-Verde, e os Guarani-Ñandeva (N=50), das de Porto Lindo e Amambaí, do Estado de Mato Grosso.

Os dados obtidos foram reunidos aos publicados por Chang *et al.* (1996), Hutz *et al.* (2000) e Marignac & Bianchi (2006) para análises globais. A tabela 1 apresenta as principais informações sobre as tribos estudadas e a figura 1 apresenta um mapa com a localização geográfica destas populações.

Análise laboratorial

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).

Análise estatística

As freqüências alélicas foram obtidas através de contagem direta dos alelos. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pelo teste exato de Guo & Thompson (1992), por meio do programa ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). As medidas de diversidade gênica (heterozigosidade, G_{ST} e G'_{ST}) foram calculadas de acordo com Nei (1987) através do programa DISPAN (Ota, 1993).

Com a finalidade de testar estruturação populacional, foram realizadas análises de variância molecular (AMOVA) (Weir & Cocherham, 1984; Excoffier *et al.*, 1992; Weir, 1996), usando língua e geografia como critérios de subdivisão de grupos. Essa análise foi realizada através do programa ARLEQUIN v. 3.11. Os valores de F_{ST} foram obtidas pelo mesmo programa.

A fim de verificar a possibilidade da existência de um padrão na distribuição do alelo 7R nas populações da América do Sul, foi calculada a correlação bivariada de Pearson entre latitude e freqüência alélica, através do programa SPSS v 12.0 (SPSS Inc, 1998).

A representação da localização geográfica das populações nos mapas e as isolinhas referentes à distribuição das freqüências dos alelos de 4 e 7 repetições foram produzidas pelo programa IDSRISI© v.32.02 (Eastman, 2000).

RESULTADOS

As freqüências alélicas obtidas nas amostras de Kaingang, Guarani-Kaiowá e Guarani-Ñandeva, assim como das demais populações estudadas previamente são apresentadas na tabela 2. Os alelos 4R e 7R foram os mais observados em todas as populações. O 4R é o mais freqüente nos Kaingangs (53%) e nos Guaranis-Ñandeva (48%) enquanto o 7R o é nos Guarani-Kaiowá (52%). A freqüência 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 Maignac & Bianchi (0,341; 2006) para os ameríndios da América do Sul.

Considerando a variabilidade genética intrapopulacional estimada através do número de alelos por *locus*, a população Kaingang se apresenta mais variável que as demais sendo nela observadas três variantes (3R, 8R e 9R) ausentes nos subgrupos Guaranis. O teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que a população Kaingang apresenta deficiência de heterozigotos (valor- $p=0,042$), enquanto as demais estão em equilíbrio. A deficiência de heterozigotos e a presença de variantes raras pode ser explicada pela miscigenação com outros grupos étnicos e com outras populações da região centro-sul, uma vez que esses alelos são observados nessas populações. A miscigenação na população Kaingang também é relatada em Kohlrausch *et al.* (2005).

A tabela 2 apresenta ainda os valores da heterozigosidade das 23 populações das três Américas investigadas para o *locus DRD4*. Os menores valores para a América do Sul são observados nas populações Ticuna (0,354), Mapuche (0,398), Suruí (0,445 e 0,484) e Gavião (0,452), enquanto os maiores valores são relativos às populações Tehuelche (0,725) e Xavante (0,698). Nos Kaingang e Guaranis, os valores de heterozigosidade foram intermediários a estes, variando de 0,579 (Guarani-Ñandeva) a 0,625 (Guarani-Kaiowá).

Na tabela 3 são apresentados os valores de diversidade relativos às Américas do Norte/Central e do Sul. A América do Sul apresenta valor de G'_{ST} maior que o relativo à América do Norte/Central, evidenciando o maior isolamento e o maior efeito da deriva genética nas populações deste continente, assim como observado para o cromossomo Y por Bortolini *et al.* (2002).

A figura 2 mostra a distribuição dos alelos 7R (a) e 4R (b) na América do Sul. Observa-se uma clara relação entre a frequência destes alelos e a localização geográfica das tribos.

A fim de verificar se dentro da América do Sul a distribuição do alelo 7R segue um

padrão norte-sul, foi estimada uma correlação entre latitude e frequência do alelo 7R nas 18 populações. A correlação foi positiva (figura 3; $r = 0,557$; $p = 0,016$), indicando que a frequência deste alelo sofre uma redução em direção ao sul da América do Sul. É interessante salientar que as populações do extremo sul apresentam frequências semelhantes às observadas nos nativos da América do Norte (tabela 2).

Buscando testar estatisticamente hipóteses de estruturações populacionais quanto à geografia e língua, foram realizadas análises de variância molecular. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4. O valor mais alto de variação molecular entre as diferentes divisões sugeridas ($F_{CT} = 0,077$) corresponde à separação entre as populações da América do Norte/Central e as da América do Sul ($p = 0,014$). Esta análise mostrou também que a localização geográfica é fator importante para explicar para a estruturação das populações na América do Sul. Quando se considerou que a geografia gênica neste continente é representada por duas macro regiões, 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 ($p = 0,015$).

A hipótese de diferença entre populações devida à afiliação lingüística também foi testada pela AMOVA, não se obtendo resultado estatisticamente significativo ($p = 0,100$).

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 ($0,061$; $p < 0,001$).

Os índices de diversidade gênica calculados para as três divisões propostas são apresentados na tabela 3. A região Centro-sul apresentou a maior variabilidade intrapopulacional (oito alelos e heterozigosidade média de $0,588$) e muito baixa variabilidade interpopulacional ($G'_{ST}=0,074$). Por outro lado, na região amazônica se observa a menor variabilidade dentro das populações, sendo encontrados 6 variantes e heterozigosidade média igual a $0,480$. Nesta região, ocorre o segundo maior valor de variabilidade interpopulacional ($G'_{ST}=0,103$).

DISCUSSÃO

Implicações para estudos históricos

Um importante aspecto a ser considerado neste trabalho é a distribuição dos alelos do gene *DRD4* na América do Sul. A geografia parece ser o fator determinante para isso e não a língua, como demonstram os valores das AMOVAS. Os resultados são condizentes com os modelos de dispersão e crescimento populacional estudados por Lanata et al. (2008), nos quais a diferenciação genética obedece às três grandes divisões de nichos ecológicos na América do Sul existentes durante o Holoceno: Região montanhosa (região andina), Floresta Tropical (região amazônica) e Floresta Temperada e semideserto (região centro-sul).

Uma possível explicação para este resultado é a associação de fatores demográficos e evolutivos agindo sobre o éxon III do gene *DRD4*. De acordo com Ding et al., (2002), o alelo 7R está sujeito à seleção positiva nas populações da América do Sul, sendo um alelo muito freqüente, porém a sua distribuição aqui como nos outros continentes, não é homogênea. A estruturação em três grandes regiões, observada no presente estudo, reflete a heterogeneidade indicada por estes autores.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Callegari-Jacques et al. (2007), que analisaram a distribuição dos haplótipos do *cluster* da globina β em 28 populações nativas da América do Sul. Os autores também observaram valor de F_{CT} maior para estruturação genética das populações do continente quando foi proposta a separação em três regiões geográficas que para a separação em Andes e terras baixas.

A figura 2a mostra como a região amazônica destaca-se das demais quando é considerada a freqüência do alelo 7R. Esse alelo apresenta freqüência elevada nas populações dessa região, exceto nos Wai Wai, quando comparada às outras regiões da América, nas quais a freqüência desse alelo é mais baixa. A figura 2b mostra a distribuição das freqüências do alelo 4R, mais prevalente nas populações não-

amazônicas. A diferença entre as frequências do alelo 7R explicam o valor significativo observado na AMOVA quando considerada a divisão entre três regiões. Os valores obtidos pelo F_{ST} par-a-par entre as três regiões corroboram os resultados da AMOVA. Os maiores valores de F_{ST} são observados entre a região amazônica e as demais, evidenciando menor fluxo gênico entre essas regiões do que entre as regiões Andina e Centro-sul, que apresentam valor menor de F_{ST} .

Callegari-Jacques *et al.* (2007), com dados de globina- β em 28 populações da América do Sul, também observaram que as regiões andina e centro-sul são geneticamente mais próximas entre si do que ambas com a região amazônica. As duas hipóteses levantadas por Callegari-Jacques *et al.* (2007) podem ser usadas para explicar os padrões observados para a distribuição alélica do *DRD4*:

1 – Um primeiro grupo de habitantes contendo baixas frequências do alelo 7R teria entrado na América do Sul seguindo as rotas das costas este 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 moveu-se 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 alternativa é possível, levando em conta o efeito da seleção natural sobre o alelo 7R. Essa hipótese 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 da linha do equador em direção ao sul. Neste processo, haveria uma perda deste alelo nas populações, explicando o perfil genético

observado no estudo. Essa hipótese foi apresentada por Rodriguez-Delfin *et al.*, (2001) para explicar o cline dos haplótipos A e D do mtDNA.

Quanto aos valores e diversidade gênica, o padrão observado na região amazônica pode ser indicativo da ação da seleção em conjunto com fatores demográficos, deriva genética e diversidade de nichos e de culturas. A alta taxa de crescimento populacional durante o Holoceno não necessariamente produziu conectividade entre as populações (Lanata *et al.*, 2008). Por outro lado, os altos valores de variabilidade intra e baixa interpopulacional nas regiões andina e Centro-sul podem evidenciar o relaxamento da seleção, assim como o maior fluxo gênico e possivelmente um maior grau de miscigenação com populações de outras etnias.

Com os dados que se tem no momento e considerando que o alelo 7R esteja sujeito à seleção positiva, pode-se sugerir que a América do Sul apresenta regiões com diferentes forças seletivas atuando sobre o *locus*. Estudos futuros com DNA antigo e com um maior número de populações podem fornecer uma melhor interpretação da variabilidade genética das populações ameríndias e esclarecer melhor os padrões evolutivos deste gene na América do Sul.

Implicações para estudos de associação

Em estudos de associação do tipo caso e controle é conhecida a importância de se considerar a origem étnica dos indivíduos estudados nos dois grupos. A fim de evitar o viés da estratificação populacional e a obtenção de resultados espúrios, deve ser buscada uma heterogeneidade genética mínima entre os grupos caso e controle.

Com essa finalidade, Price *et al.* (2008) avaliaram o uso de um painel de 300 marcadores para a diferenciação entre populações americanas miscigenadas com populações de diferentes regiões da Europa. Este estudo demonstrou a importância de se considerar a origem étnica de indivíduos classificados de maneira geral como

americanos descendentes de europeus. É sabido que há diferenças históricas de migrações de europeus de diferentes regiões da Europa para regiões específicas da América. Entretanto, em muitos estudos de associação usando o delineamento caso-controle, as populações euro-descendentes são consideradas uma unidade homogênea, o que não é real. Os autores demonstraram que, para estudos de associação, estas diferenças regionais devem ser consideradas para que não se obtenham associações espúrias.

Foi observada, no presente estudo, a existência de três diferentes perfis genéticos na América do Sul, correspondentes à localização geográfica. Apesar de ter sido considerado apenas um *locus*, essa divisão em três regiões oferece importantes informações para estudos de associação com diferentes patologias. Dada a natureza tri-híbrida 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.

Nossos 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 genética-geográfica dos grupos caso e controle quando indivíduos com ascendência ameríndia estejam envolvidos no estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às populações nativo-americanas pelo consentimento para a realização deste estudo. Agradecemos também o apoio financeiro do CNPq, FAPERGS, PRONEX e Institutos do Milênio. Este projeto foi aprovado pelo CONEP (resolução no. 123/98)

REFERÊNCIAS

- Aguirre AJ, Apiquián R, Fresán A, Cruz-Fuentes C (2007) Association analysis of exon III and exon I polymorphisms of the dopamine D4 receptor locus in Mexican psychotic patients. *Psychiatry Res.* 153(3):209-15.
- Asghari V, Schoots O, Van Kats S, Ohara K, Jovanovic V, Guan HC, Bunzow JR, Petronis A and Van Tol HH (1994) Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. *Mol Pharmacol* 46(2):364-73.
- Bau CH, Roman T, Almeida S, Hutz MH (1999) Dopamine D4 receptor gene and personality dimensions in Brazilian male alcoholics. *Psychiatr Genet.* 9(3):139-43.
- Borinskaia SA, Kozhekbaeva ZhM, Gorbunova EV, Sokolova MV, Iur'ev EB, Tiazhelova TV, Grechanina Ela, Khusnutdinova EK, Iankovskiĩ NK (2004) Analysis of the DRD4 gene polymorphism in populations of Russia and neighboring countries. *Genetika* 40(6):835-40.
- Bortolini MC, Salzano FM, Bau CH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Hill K, Hurtado AM, Castro-De-Guerra D, Bedoya G and Ruiz-Linares A (2002) Y-chromosome biallelic polymorphisms and Native American population structure. *Ann Hum Genet* 66:255-9.
- Brookes KJ, Xu X, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P (2005) No evidence for the association of DRD4 with ADHD in a Taiwanese population within-family study. *BMC Med Genet.* 6:31.
- 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.
- Campbell L (1997) American Indian languages: the historical linguistics of Native America. Oxford University Press. Oxford, 189pp.
- Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, Henríquez H, Aboitiz F, Rothhammer F (2004) Presence of DRD4/7R and DAT1/10R allele in Chilean family members with attention

- deficit hyperactivity disorder. *Rev Med Chil.* 132(9):1047-52.
- Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pkstis AJ and Kidd KK (1996) The world-wide distribution of allele frequencies at human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98:91-101.
- Chen C, Burton M, Greenberger E and Dmitrieva J (1999) Population Migration and the Variation of Dopamine D4 Receptor (DRD4) Allele Frequencies Around the Globe. *Evolution and Human Behavior* 20(5): 309 – 324.
- 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.
- Eastman JR (2000) IDRISI software. Clark Labs, Clark University, Worcester MA. Software disponível em <http://www.clarklabs.org/>.
- Ebstein RP, Novik O and Umansky R (1996) Dopamine D4 Receptor (DRD4) Exon III Polymorphism Associated with the Human Personality Trait of Novelty Seeking. *Nat. Genet* 12:78–80.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin ver.3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinformatics Online* 1:47-50. Software disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>.
- Faraone SV, Doyle AE, Mick E and Biederman J (2001) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158:1052–1057.
- Ghosh A and Seshadri M (2005) Indian ethnic populations characterized by dopamine (D4) receptor VNTR polymorphism. *Ann Hum Biol* 32(5):574-84.
- Grady DL, Chi H-C, Ding Y-C, Smith M, Wang E and Schuck S (2003) High prevalence of rare dopamine receptor D4 alleles in children diagnosed with attention-deficit

- hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 8:536-545.
- Guo SW and Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48(2):361-72.
- 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.
- Kohn Y, Ebstein RP, Heresco-Levy U, Shapira B, Nemanov L, Gritsenko I, Avnon M, Lerer B (1997) Dopamine D4 receptor gene polymorphisms: relation to ethnicity, no association with schizophrenia and response to clozapine in Israeli subjects. *Eur Neuropsychopharmacol.* 7(1):39-43.
- Kohlrausch FB, Callegari-Jacques SM, Tsuneto LT, Petzl-Erler ML, Hill K, Hurtado AM, Salzano FM and Hutz MH (2005) Geography influences microsatellite polymorphism diversity in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 126(4):463-70.
- 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.
- Lanata JL, Martino L, Osella A and Garcia-Herbst A (2008) The Distinctiveness of Human Dispersal: The South America case (submetido).
- Leung PW, Lee CC, Hung SF, Ho TP, Tang CP, Kwong SL, Leung SY, Yuen ST, Lieh-Mak F, Oosterlaan J, Grady D, Harxhi A, Ding YC, Chi HC, Flodman P, Schuck S, Spence MA, Moyzis R, Swanson J (2005) Dopamine receptor D4 (DRD4) gene in Han Chinese children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): increased prevalence of the 2-repeat allele. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 133B(1):54-6.
- Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK and Livak KJ (1993) A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* 2(6):767-73.
- 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.

Mitsuyasu H, Kawasaki H, Ninomiya H, Kinukawa N, Yamanaka T, Tahira T, Stanton VP Jr, Springett GM, Hayashi K, Tashiro N, Kanba S (2007) Genetic structure of the dopamine receptor D4 gene (DRD4) and lack of association with schizophrenia in Japanese patients. *J Psychiatr Res.* 41(9):763-75.

Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.

Petzl-Erler ML, Luz R and Sotomaior VS (1993) The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: the Kaingang and the Guarani. *Tissue Antigens* 41(5):227-37.

Ota T (1993) *DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis*. Pennsylvania State University Park, PA.

Price AL, Butler J, Patterson N, Capelli C, Pascali VL, Scarnicci F, Ruiz-Linares A, Groop L, Saetta AA, Korkolopoulou P, Seligsohn U, Waliszewska A, Schirmer C, Ardlie K, Ramos A, Nemesh J, Arbeitman L, Goldstein DB, Reich D and Hirschhorn JN (2008) Discerning the ancestry of European Americans in genetic association studies. *PLoS Genet* 4(1):e236.

Rodriguez-Delfin LA, Rubin-de-Celis VE and Zago MA (2001) Genetic Diversity in an Andean Population from Peru and Regional Migration Patterns of Amerindians in South America: Data from Y Chromosome and Mitochondrial DNA. *Hum Hered* 51:97-106

Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH (1999) Lack of association of the dopamine receptor D4 gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. *Addict Biol* 4:203-207.

Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID (1998) Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 3(5):419-26.

Serretti A, Lorenzi C, Mandelli L, Cichon S, Schumacher J, Nöthen MM, Rietschel M, Tullius M, Ohlraun S (2004) DRD4 exon 3 variants are not associated with

symptomatology of major psychoses in a German population. *Neurosci Lett.* 368(3):269-73.

SPSS INC (1998) SPSS Base 8.0 for windows. SPSS Inc., Chicago, USA

Sullivan PF, Fifeild WJ, Kennedy MA, Mulder RT, Sellman JD, Joyce PR (1998) No association between novelty seeking and the type 4 dopamine receptor gene (DRD4) in two New Zealand samples. *Am J Psychiatry.* 155(1):98-101.

Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wigal T, Lerner M, Williams L, LaHoste GJ, Wigal S (1998) Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Mol Psychiatry* 3(1):38-41.

Weir BS (1996) *Genetics analysis II: methods for discrete population genetic data.* Sunderland, MA: Sinauer.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

LEGENDA DAS FIGURAS

FIGURA 1: Localização geográfica das populações analisadas.

FIGURA 2: Mapa com isolinhas relativas à frequência do alelo 7R (a) e 4R (b) nas populações analisadas.

FIGURA 3: Relação entre frequência do alelo 7R e latitude em 18 populações nativas sul-americanas ($r = 0,557$; $p = 0,016$)

TABELA 1: Número amostral, afiliação lingüística e localização geográfica das populações analisadas.

Numeração das populações	Populações	Nº de cromossomos	Grupo lingüístico	Localização geográfica		Referências
				Latitude	Longitude	
América do Sul						
1	Ayoreo	8	Zamuco	19° 00' S	60° 30' W	3
2	Gavião	58	Tupi-Mondé	10° 10' S	61° 08' W	2
3	Guahibo	26	Arawak	6° 00' N	70° 00' W	1
4	Guarani-Kaiowá	100	Tupi-Guarani	23° 00' S	55° 00' W	4
5	Guarani-Ñandeva	100	Tupi-Guarani	23° 00' S	54° 30' W	4
6	Kaingang	144	Je	27° 00' S	52° 00' W	4
7	Karitiana	108	Tupi-Arikém	9° 30' S	64° 15' W	1
8	Lengua	16	Mascov	22° 27' S	58° 00' W	3
9	Mapuche	44	Mapudungu	41° 00' S	69° 00' W	3
10	Mataco	42	Mataco-Mataguayo	24° 00' S	62° 00' W	3
11	Quechua	44	Quecha	12° 00' S	77° 00' W	1
12	Surui I	90	Tupi-Mondé	10° 50' S	61° 10' W	1
13	Surui II	44	Tupi-Mondé	11° 00' S	62° 00' W	2
14	Tehuelche	16	Chon	45° 00' S	70° 00' W	3
15	Ticuna	128	Ticuna	3° 00' S	70° 00' W	1
16	Xavante	56	Je	13° 20' S	51° 40' W	2
17	Zoró	56	Tupi-Mondé	10° 20' S	60° 20' W	2
18	Wai Wai	56	Caribe	0° 40' S	57° 55' W	2
América Central						
19	Maya	100	Penutian	19° 00' N	91° 00' W	1

(continua)

TABELA 1 (continuação)

Numeração das populações	Populações	Nº de cromossomos	Grupo lingüístico	Localização geográfica		Referências
				Latitude	Longitude	
América do Norte						
20	Cheyenne	96	Alonquian	35° 00' N	99° 00' W	1
21	Jemez Pueblo	86	Jemez	35° 50' N	106° 70' W	1
22	Muskoke	24	Muskogean	33° 00' N	84° 00' W	1
23	Pima	70	Uto-Asteca	33° 00' N	112° 00' W	1

¹ Chang *et al.* (1996)

² Hutz *et al.* (2000)

³ Marnac & Bianchi (2006)

⁴ Presente estudo

TABELA 2: Frequências alélicas e estimativas de variabilidade genética (heterozigidade e número de alelos) para o locus VNTR de 48pb do éxon III de DRD4 em populações nativas americanas

Populações	Nº de cromossomos	ALELOS								Heterozigidade (H)	Nº de alelos
		2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R		
América do Sul											
Ayoreo	8	0,000	0,000	0,375	0,000	0,000	0,625	0,000	0,000	0,536	2
Gavião	58	0,030	0,000	0,280	0,000	0,000	0,690	0,000	0,000	0,452	3
Guahibo	26	0,000	0,000	0,230	0,000	0,150	0,620	0,000	0,000	0,562	3
Guarani-Kaiowá	100	0,010	0,000	0,280	0,010	0,180	0,520	0,000	0,000	0,625	5
Guarani-Ñandeva	100	0,040	0,000	0,480	0,000	0,040	0,440	0,000	0,000	0,579	4
Kaingang	144	0,040	0,010	0,530	0,000	0,020	0,370	0,020	0,010	0,584	7
Karitiana	108	0,000	0,000	0,390	0,000	0,000	0,600	0,010	0,000	0,492	3
Lengua	16	0,250	0,000	0,563	0,000	0,000	0,187	0,000	0,000	0,625	3
Mapuche	44	0,045	0,023	0,773	0,023	0,023	0,113	0,000	0,000	0,398	6
Mataco	42	0,000	0,024	0,476	0,024	0,071	0,405	0,000	0,000	0,618	5
Quechua	44	0,000	0,000	0,410	0,000	0,140	0,450	0,000	0,000	0,624	3
Surui I	90	0,140	0,000	0,160	0,010	0,000	0,690	0,000	0,000	0,484	4
Surui II	44	0,110	0,000	0,140	0,020	0,000	0,730	0,000	0,000	0,445	4
Tehuelche	16	0,188	0,062	0,375	0,000	0,000	0,375	0,000	0,000	0,725	4
Ticuna	128	0,020	0,000	0,200	0,000	0,000	0,780	0,000	0,000	0,354	3
Xavante	56	0,000	0,000	0,320	0,030	0,040	0,430	0,180	0,000	0,698	5
Zoró	56	0,000	0,000	0,360	0,000	0,000	0,640	0,000	0,000	0,469	2
Wai Wai	56	0,020	0,000	0,520	0,050	0,180	0,230	0,000	0,000	0,653	5

(continua)

TABELA 2 (continuação)

Populações	Nº de cromossomos	ALELOS								Heterozigosidade (H)	Nº de alelos
		2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R		
América Central											
Maya	100	0,010	0,000	0,570	0,000	0,030	0,390	0,000	0,000	0,527	4
América do Norte											
Cheyenne	96	0,010	0,000	0,520	0,020	0,110	0,340	0,000	0,000	0,608	5
Jemez Pueblo	86	0,040	0,010	0,700	0,020	0,030	0,190	0,010	0,000	0,476	7
Muskoke	24	0,040	0,090	0,540	0,040	0,000	0,290	0,000	0,000	0,640	5
Pima	70	0,010	0,000	0,740	0,030	0,000	0,220	0,000	0,000	0,409	4

TABELA 3 : *Diversidade gênica no continente americano, nas Américas do Norte/Central, América do Sul e nas divisões propostas dentro da América do Sul.*

	Nº de populações	Nº de alelos	Medidas de diversidade gênica			
			H _T	H _S	G _{ST}	G _{ST} '
América	23	8	0,608	0,532	0,125	0,130
Américas do Norte e Central	5	7	0,539	0,522	0,031	0,038
América do Sul	18	8	0,606	0,535	0,117	0,123
Região Amazônica	8	6	0,528	0,480	0,091	0,103
Região Andina	3	6	0,623	0,560	0,102	0,147
Região Centro-sul	7	8	0,628	0,588	0,064	0,074

TABELA 4: Testes de estrutura populacional por análise de variância molecular (AMOVA) para a frequência de alelos do sistema DRD4 na América do Sul.

Divisões (e número de populações) testadas	Número de grupos	Número de populações	Porcentagem da variação			Valor-p entre regiões
			Dentro das populações ¹	Entre populações da mesma divisão ¹	Entre divisões	
América do Norte/Central (5) vs América do Sul (18)	2	23	84,30	7,97	7,73	0,014 ± 0,004
Região Andina (3) vs Terras baixas (15)	2	18	85,50	8,52	5,98	0,055 ± 0,007
Regiões andina (3) vs amazônica (8) vs centro-sul (7)	3	18	88,01	6,39	5,61	0,015 ± 0,003
Tupi (7) vs Je (2)	2	9	91,16	4,82	4,02	0,100 ± 0,010

¹ Em todos os casos, $p < 0,001$

FIGURA 1



FIGURA 1

FIGURA 2

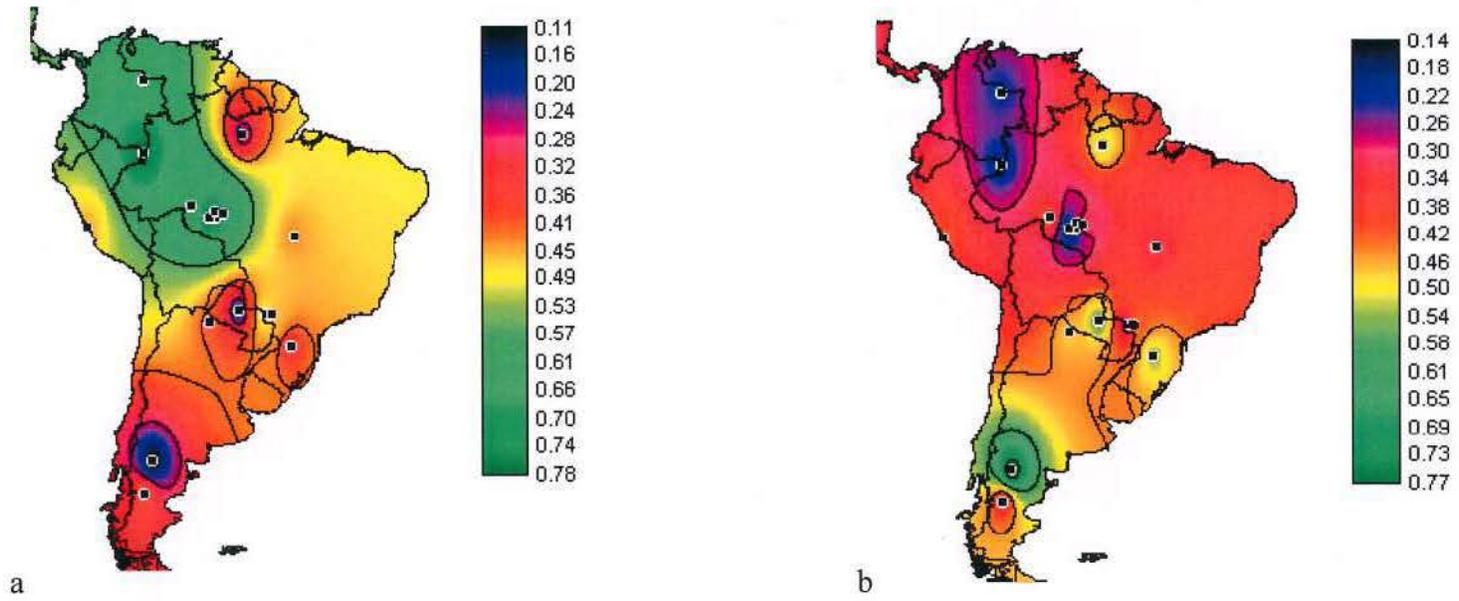


FIGURA 3

