

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/04/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU – IBB



Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (GENÉTICA)

DIVERSIDADE DO GENE *KIR3DL3* EM POPULAÇÕES MUNDIAIS E ASPECTOS EVOLUTIVOS

Heloísa de Souza Andrade

Botucatu - SP
2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU – IBB



Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (GENÉTICA)

DIVERSIDADE DO GENE *KIR3DL3* EM POPULAÇÕES MUNDIAIS E ASPECTOS EVOLUTIVOS

Heloísa de Souza Andrade

Orientador: Erick da Cruz Castelli

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade, Heloísa de Souza.

Diversidade do gene KIR3DL3 em populações mundiais e aspectos evolutivos / Heloísa de Souza Andrade. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Erick da Cruz Castelli
Capes: 20200005

1. Polimorfismo (Genética). 2. Haplótipos. 3. Variação genética. 4. Ciências da vida.

Palavras-chave: Ancestralidade; Evolução; Haplótipo; KIR3DL3; Polimorfismo.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hugo e Edilane.
Por todo carinho, apoio, amor. Que
sorte a minha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Hugo e Edilane, pelo amor, carinho, cuidado e apoio em todas as etapas da minha vida. Pelas acolhidas na casa azul da roça em MG, lugar que chamo de lar e que é o meu preferido do mundo. Sem vocês nada disso seria possível. Aos meus irmãos, Thaís e Daniel, pela parceria e carinho de sempre, mesmo com os 900km entre nós, e aos meus cunhados, Daniel e Juliana. Às minhas avós, Lourdes e Cidoca, por todo carinho e aconchego. Aos meus queridos sobrinhos Felipe, Clarice e Bento e ao meu afilhado João Pedro – o sorriso de uma criança traz uma leveza que cura. Amo vocês!

À toda minha família, pelo apoio e por sempre se preocuparem comigo. Em especial aos meus tios e primos de São Paulo (tia Dica, tio Carlinhos, Amanda, Lu e Vi) por terem me abrigado diversas vezes, sempre com muito amor. Obrigada madrinha Lê e prima/comadre Marina, por toda a força e torcida.

Muito obrigada prof. Erick, pela oportunidade. Sou muito grata por todos os ensinamentos, conversas, orientações e pela (muita) paciência em me ensinar bioinformática.

Amigos do GeMBio <3: as risadas, cafés e almoços no bom prato foram fundamentais para que o meu caminho em Botucatu fosse mais leve e a saudade de casa mais branda, obrigada mesmo! Vou levar cada um de vocês em meu coração com muito carinho, desejo o melhor para todos - Andréia, Emiliana, Marília, Thálitta, Nayane, Camila, Hecttor, Gabi, Arielle, Amanda.

Às minhas orientadoras de IC na UnB, Silviene e Fabíola, por todos os ensinamentos e pela oportunidade que me deram durante a graduação.

Aos meus grandes amigos – Naty, Carol, Pedro e Fernando – que continuaram ao meu lado apesar da distância, rotina doida e desencontrada e dos meus esquecimentos em responder WhatsApp. Obrigada pelas conversas e por estarem sempre perto mesmo longe.

Aos amigos Troteco, pelos ótimos momentos e risadas nas minhas breves passagens por Brasília.

Ao centro budista Caminho do Diamante. As meditações e conversas foram fundamentais para meu crescimento.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, campus Botucatu, em especial a Unipex, onde realizei todos os experimentos deste projeto.

Aos professores que participaram dessa trajetória e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – com o Processo número 2018/05863-0, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa. Obrigada pelo investimento na minha formação científica por meio da bolsa de mestrado concedida.

Aos membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite e dedicarem tempo para contribuir com a minha formação e trabalho.

Ao Yan, obrigada por tudo. Teria sido muito difícil sem você. Obrigada pela paciência durante as crises e por ter continuado ao meu lado.

Aos álbuns do Nação Zumbi, Grande Encontro, Academia da Berlinda, Novos Baianos, Seu Pereira e de toda trilha sonora que me acompanhou nesses dois anos, principalmente durante as fases de escrita e nos finais de semana.

Por fim, gostaria de agradecer minha filha de quatro patas, Lilica, infelizmente não chegamos juntas ao final dessa jornada, mas ela está todos os dias comigo em pensamento. Obrigada por ser a melhor companheira que eu poderia ter tido, é incrível como um serzinho me ensinou a ser mais forte e resiliente. Amo você Liliqueli e sei que vamos nos reencontrar.

EPÍGRAFE

“E um homem não me define

Minha casa não me define

Minha carne não me define

Eu sou meu próprio lar”

(Triste, louca ou má – Francisco, el hombre)

RESUMO

Os receptores *killer* semelhantes à imunoglobulina (KIRs) são moléculas receptoras transmembranares expressas em células *natural killer* e T citotóxicas. Esses receptores reconhecem moléculas do sistema imunológico, principalmente moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (HLA) de classe I na superfície de células somáticas. Os genes *KIR* são altamente polimórficos tanto do ponto de vista de número de cópias de cada gene quanto do conteúdo de sequência. *KIR3DL3* é um gene *KIR* considerado *framework*, pois está presente em todos os indivíduos em duas cópias. Aqui, abordamos a diversidade genética e os aspectos evolutivos do gene *KIR3DL3* em populações humanas de todo o mundo, usando uma abordagem de bioinformática desenvolvida para este estudo e que minimiza viés de mapeamento e erros de genotipagem. O conjunto de amostras compreende 2504 indivíduos de 26 populações distintas, provenientes do consórcio *1000 Genomes Project*, além de 216 amostras brasileiras do estado de São Paulo que foram sequenciadas utilizando sequenciamento de segunda geração. Marcadores informativos de ancestralidade foram utilizados na população brasileira para determinar o perfil de ancestralidade genômica de cada indivíduo e para se obter uma média da população total. A variabilidade genética do *KIR3DL3* é muito maior do que conhecemos atualmente, especialmente quando consideramos íntrons e sequências regulatórias. A diversidade de proteínas de *KIR3DL3* é fortemente influenciada pelo perfil de ancestralidade do indivíduo, com proteínas completas e resíduos de aminoácidos apresentando diferentes frequências entre africanos, europeus e outras populações. Nesse caso, as populações do leste da Ásia apresentam um padrão diferente das demais considerando frequências de alelos, proteínas, sequências regulatórias e perfil de seleção natural. Por esse motivo, qualquer estudo de associação com doenças envolvendo *KIR3DL3* deve ser realizado considerando a estratificação populacional. Alguns segmentos de *KIR3DL3* são altamente conservados, como os éxons que codificam o peptídeo líder e o domínio extracelular D2, importantes para a interação com HLA, enquanto outros segmentos, como a região promotora e o éxon 6 (domínio transmembranar) são bastante variáveis. Encontramos evidências de seleção balanceadora na região promotora, provavelmente mantendo sequências com diferentes ações regulatórias. Essa evidência é mais forte entre europeus e no leste asiático. Também encontramos evidências de seleção balanceadora em íntrons, que devem ser considerados como possíveis portadores de elementos regulatórios.

Palavras-chave: *KIR3DL3*, polimorfismo, haplótipo, NGS, ancestralidade, seleção natural, evolução

ABSTRACT

Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs) are transmembrane receptors expressed in Natural Killer cells and cytotoxic T cells. These receptors recognize molecules from the immune system, mainly molecules from the major class I histocompatibility complex on somatic cells' surface. KIR genes are highly polymorphic regarding the number of copies of each locus and their sequence content. *KIR3DL3* is a framework KIR gene present in every individual. Here we addressed *KIR3DL3* genetic diversity and evolutionary aspects in worldwide human populations, using a bioinformatics pipeline created for this study, minimizing mapping bias and genotyping errors. The samples included 2504 individuals from 26 populations (1000 Genomes Project consortium), and 216 Brazilians samples sequenced using second-generation sequencing. Ancestry informative markers were used in the Brazilian population to access the contribution of the different ancestry profiles of each individual and to obtain an average of the whole population. *KIR3DL3* genetic variability is far more significant than we currently acknowledge, especially when considering intronic segments and regulatory sequences. *KIR3DL3* protein diversity is strongly influenced by the ancestry background, with different frequencies of protein versions and amino acid residues among Africans, Europeans, and other populations. In this matter, populations from East Asia present an unusual pattern considering protein frequencies, regulatory sequences diversity, and how natural selection has shaped *KIR3DL3* diversity and haplotype frequencies. Because of that, any association study involving *KIR3DL3* should be performed concerning for population stratification. Some *KIR3DL3* segments are highly conserved, such as the exons encoding the leader peptide and the extracellular domain D2, important for HLA interaction, while other segments, such as the promoter region and exon 6 (the transmembrane domain) are highly variable. We found evidence of balancing selection in the promoter region, probably maintaining sequences with different promotion capabilities, and it is evident among Europeans and East Asians. We also find evidence of balancing selection in some large intronic segments, and they must be considered as possibly carrying regulatory elements.

Keywords: *KIR3DL3*, polymorphism, haplotype, NGS, ancestry, natural selection, evolution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação das células <i>natural killer</i> (NK) denominado <i>missing-self</i> , no qual a interação dos receptores das células NK com ligantes específicos vão induzir a uma resposta. Caso haja um predomínio de sinais inibidores (principalmente com a ligação a moléculas do complexo MHC), não há ativação das células NK. Se há um predomínio de sinais ativadores e inibição dos inibidores, a célula inicia um processo de defesa. Fonte: Hinton-Sheley, Phoebe (2019).....	3
Figura 2. Composição do Complexo Receptor Leucocitário (do inglês, Leukocyte Receptor Complex, LRC), presente na região 19q13.4. Dentre eles, em destaque, os genes KIR. Em cinza os genes framework, vermelho os ativadores, verde inibidores e amarelo o pseudogene não framework. Fonte: Single et al., (2008).....	4
Figura 3. Representação das moléculas KIR. Em azul os domínios semelhantes a imunoglobulina (dois ou três), em vermelho os motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM) nas caudas citoplasmáticas longas e em verde os motivos de ativação baseados em tirosina (ITAM) nas caudas curtas. Imagem disponível em http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images	5
Figura 4. Estrutura geral dos genes KIR. Os éxons 1 e 2 codificam o peptídeo líder, éxons 3, 4 e 5 os domínios semelhantes a Ig, éxon 6 a haste que liga o D2 ao domínio transmembranar (TM) que é codificado pelo éxon 7 e a cauda citoplasmática é codificada pelos éxons 8 e 9. Lembrando que há alguns KIR que possuem deleção em éxon.....	6
Figura 5. Nomenclatura KIR. Baseada na figura disponível em https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/alleles.html	6
Figura 6. Haplótipos A e B. Em cinza pode-se observar os genes framework, e em azul os demais genes KIR de cada haplótipo, os quais podem ou não estar presentes e em diferentes quantidades de número de cópia. Adaptado de Parham et al., 2005	7
Figure 1. Principal component analysis (PCA) considering variable sites in the KIR3DL3 locus. We pruned variants with a $r^2 < 0.2$. Each superpopulation is represented by a different color: red for Africans, blue for Americans, green for Brazilians, black for East Asians, brown for Europeans, and yellow for South Asians.....	51
Figure 2. Multidimension scaling plot of the F_{ST} values among each superpopulation.	52
Figure 3. Tajima's D across the KIR3DL3 gene in different worldwide populations, considering sliding windows of 250bp and a step size of 1. The x-axis the central position of a window. The y-axis represents the Tajima's D value	53
Figure S1. Linkage Disequilibrium (LD) between pair of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the KIR3DL3 locus, considering genomic positions from Promoter to 3'UTR. LD plot generated by Haploview 4.2, considering variable sites with a minor allele frequency (MAF) $\geq 5\%$ and the fraction of strong LD in informative comparison set to 0.9. Areas in red color indicate strong LD (LOD score ≥ 2 , D' score =1); areas in light red or pink indicate moderate LD (LOD ≥ 2 , $D' < 1$); areas in blue indicate weak LD (LOD < 2 , $D' = 1$); and areas in white indicate very weak LD (LOD < 2 , $D' < 1$)	62
Figure S2. KIR3DL3 promoter sequences and their frequency in worldwide populations.	63
Figure S3. KIR3DL3 3'UTR sequences and their frequency in worldwide populations.	64

LISTA DE TABELAS

Table 1. KIR3DL3 encoded proteins in worldwide population samples grouped by the ancestry background (superpopulations).	54
Table 2. KIR3DL3 encoded proteins and amino acid in each polymorphic residue in worldwide population samples.	55
Table 3. KIR3DL3 polymorphic residues (minor allele frequency > 1%) and their frequency in worldwide population samples.....	57
Table 4: Nucleotide diversity in each KIR3DL3 segment in worldwide populations grouped according to their ancestry background	58
Table 5: Tajima's D in each KIR3DL3 segment in worldwide populations grouped according to their ancestry background.	59
Table 06: dN/dS ratio test of the KIR3DL3 exons in worldwide population samples.	60
Table S1. List of variants and frequency of the reference allele in worldwide populations samples.	65
Table S2. KIR3DL3 encoded proteins in worldwide population samples.	82
Table S3. KIR3DL3 encoded proteins in worldwide population samples, and each amino acid exchange. Here are listed only the proteins that do not match any of the ones described in the IPD-IMGT/KIR database.....	83
Table S4. KIR3DL3 coding sequences (only exons) in worldwide population samples grouped by the ancestry background.....	85
Table S5. KIR3DL3 promoter haplotypes and their frequencies.	87
Table S6. The association between KIR3DL3 promoter lineages and genomic sequences encoding specific proteins.....	88
Table S7. The association between KIR3DL3 3'UTR haplotypes and genomic sequences encoding specific proteins.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFR	Africano, do inglês African
AIM	Marcadores Informativos de Ancestralidade, do inglês Ancestry Informative Markers
bp	Pares de base
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
CDS	Sequências codificadoras
CNV	Variação no Número de Cópias, do inglês Copy Number Variations
D0, D1 e D2	Domínio 0, 1 e 2 dos receptores KIR
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAS	Leste da Ásia, do inglês East Asian
EBV	Vírus Epstein-Barr
EUR	Europeu, do inglês European
GATK	Genome Analysis Toolkit
hg 38	Homo sapiens (human) genome assembly GRCh38
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês Human Leukocyte Antigen
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
IFN- γ	Interferon Gamma
Ig	Imunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
IPD	The Immuno Polymorphism Database
	Motivo de ativação baseado em tirosina, do inglês Immunotyrosine-based activatory
ITAM	motif
	Motivo de inibição baseado em tirosina, do inglês Immunotyrosine-based inhibitory
ITIM	motif
	Receptor de células killer semelhante à imunoglobulina, do inglês Killer-cell
KIR	Imunoglobulin-like Receptor
LD	Desequilíbrio de ligação, do inglês Linkage Disequilibrium
LRC	Complexo de receptores leucocitários, do inglês Leukocyte Receptor Complex
MAF	Frequência alélica mínima, do inglês Minor Allele Frequency
	Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês Major Histocompatibility
MHC	Complex
miRNA	microRNA

mRNA	RNA mensageiro
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Células Natural Killer
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-SSP	Reação em Cadeia da Polimerase utilizando primer de sequência específica
PF	Pênfigo Foliáceo
ProI	Promotora Intermediária
RBP	ReadBackedPhasing
SNP	Polimorfismo de base única, do inglês Single nucleotide polymorphism
STR	Microsatélite
TCR	Receptor de Célula T
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α , do inglês Tumor Necrosis Factor- α
UTR	Região não traduzida, do inglês Untranslated Region
VCF	Variant Call Format

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Revisão de Literatura	01
1. As células Natural Killer e os receptores KIR	02
2. Receptores KIR e associação com doenças	08
3. <i>KIR3DL3</i>	09
a. Estrutura e Polimorfismo	09
b. Regiões regulatórias	11
c. Aspectos evolutivos e seleção natural atuando sobre o gene <i>KIR3DL3</i>	12
4. Ancestralidade da população brasileira e Projeto 1000 Genomes	13
Justificativa.....	15
Objetivos.....	16
Capítulo 2 – Artigo.....	25
Abstract.....	26
Introduction	26
Methods.....	28
1. Population data and samples	28
2. 1000Genomes data retrieval	29
3. <i>KIR3DL3</i> amplification and sequencing in Brazilian samples	29
4. Informative Ancestry Markers (AIMs) for the Brazilian samples.....	30
5. Raw sequencing data processing	30
6. <i>KIR3DL3</i> promoter, coding, and 3'UTR diversity	32
Results.....	32
1. <i>KIR3DL3</i> genomic diversity, population differentiation, and linkage disequilibrium	33
2. <i>KIR3DL3</i> worldwide protein diversity	33
3. <i>KIR3DL3</i> regulatory sequences: promoter and 3'UTR	34
4. <i>KIR3DL3</i> extended haplotypes: the association among promoters, coding, and 3'UTR haplotypes	35
5. <i>KIR3DL3</i> evolutionary aspects in worldwide human populations	35
Discussion.....	36
Tables and figure	51
Supplementary Material	61
Conclusão.....	91

Capítulo I

REVISÃO DE LITERATURA

1. As células Natural Killer e os receptores KIR

As células *Natural Killer* (NK) atuam principalmente na primeira linha de defesa do sistema imune, a imunidade inata. Elas participam do controle contra infecções por patógenos (vírus, bactérias, parasitas), do reconhecimento de células tumorais e de processos gestacionais. As NK atuam por meio de diversos receptores localizados em sua membrana, os quais são capazes de reconhecer padrões nas células ligantes. Estes receptores não são antígeno-específicos e não sofrem rearranjos genéticos como os receptores de células T (TCR), atuantes na resposta adaptativa (Vivier *et al.*, 2011). Os mecanismos de regulação das células NK envolvem diversas vias celulares e bioquímicas (Jager e Kuchroo, 2010).

Um conjunto de sinais são produzidos por esses receptores, os quais podem levar as células NK a desencadear uma resposta imunológica ou inibi-las, para que células em determinadas condições (como células saudáveis) não sejam alvo de ataque (Hou *et al.*, 2012). As NK possuem atividade citotóxica - eliminam uma célula alvo pela secreção de grânulos líticos contendo perforinas e granzimas que induzem a apoptose (Michelet *et al.*, 2018). Além disso, elas também estão envolvidas com a resposta adaptativa, produzindo quimiocinas e citocinas que ativam outras vias responsáveis por esta resposta. Por exemplo, a produção de interferon- γ (IFN- γ) em condições fisiológicas e patológicas, e de TNF- α e IL-10 com funções pró inflamatórias e imunossupressoras (Vivier *et al.*, 2011). Já as quimiocinas estão envolvidas na colocação com outras células hematopoiéticas, como as células dendríticas em áreas de inflamação (Moretta *et al.*, 2005). Estas diferenças em sua função podem ser observadas ao comparar células CD56^{bright}, as quais possuem atividade citotóxica limitada e estão mais relacionadas com a produção de citocinas e imunomodulação, enquanto CD56^{dim} são altamente citotóxicas, contendo uma maior quantidade de perforinas, granzimas e grânulos citolíticos (Pesce *et al.*, 2018).

Os receptores ativadores em contato com os ligantes podem detectar moléculas do próprio organismo que estão sob condição de estresse. Por outro lado, os receptores inibidores quando interagem, principalmente, com moléculas HLA de classe I em condições normais inibem a ação da NK (Bottino *et al.*, 2005; Vivier *et al.*, 2011). Este mecanismo das células NK funciona como uma balança entre os receptores ativadores e inibidores. Um dos mecanismos de funcionamento das NK é denominado *missing self* (perda do próprio) (Figura 1) (Karre *et al.*, 1986). Neste mecanismo, a perda ou diminuição da expressão de moléculas HLA de classe I e outros ligantes específicos na superfície celular da célula alvo será interpretada como uma

situação anormal, pois não haverá a interação com os receptores inibidores. Com isso, haverá mais interações com receptores ativadores do que inibidores, o que direcionará a célula NK a uma resposta mediada por estes sinais de ativação (Orr e Lanier, 2010; Vivier *et al.*, 2011). Essa situação manifesta-se quando a célula está infectada ou sofre processo neoplásico. Caso a ligação entre o ligante e os receptores inibitórios ocorra normalmente e haja um predomínio desses sinais, não há a ativação das NK. Desta forma, a ligação do receptor com os ligantes, principalmente com as moléculas HLA de classe I, é vital para o reconhecimento de antígenos não próprios e tolerância imunológica (Purdy e Campbell, 2009).

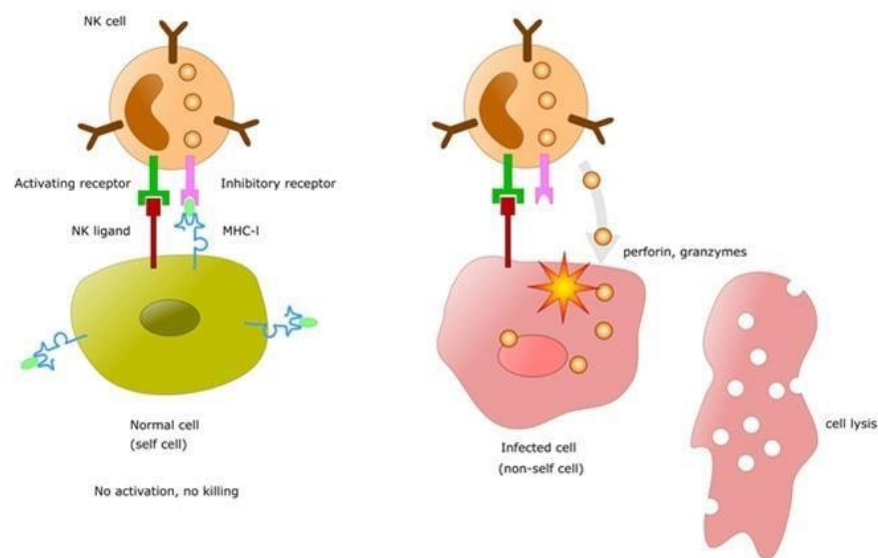


Figura 1. Mecanismo de ação das células *natural killer* (NK) denominado *missing-self*, no qual a interação dos receptores das células NK com ligantes específicos vão induzir a uma resposta. Caso haja um predomínio de sinais inibidores (principalmente com a ligação a moléculas do complexo MHC), não há ativação das células NK. Se há um predomínio de sinais ativadores e inibição dos inibidores, a célula inicia um processo de defesa. Fonte: Hinton-Sheley, Phoebe (2019).

Dentre os receptores presentes nas células NK, há os receptores KIR (receptores *killer* semelhantes à imunoglobulina, do inglês *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*, KIR), que também são expressos em células T citotóxicas (Dupont *et al.*, 1997; Single *et al.*, 2008). Os genes *KIR* constituem uma família gênica composta por 16 genes, sendo 2 pseudogenes (Figura 2), localizados no cromossomo 19 na região chamada Complexo Receptor Leucocitário (do inglês *Leukocyte Receptor Complex*, LRC). Dentre os genes *KIR*, quatro estão presentes em praticamente todos os indivíduos e são considerados genes *framework* – *KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR2DL4* e *KIR3DP1*.

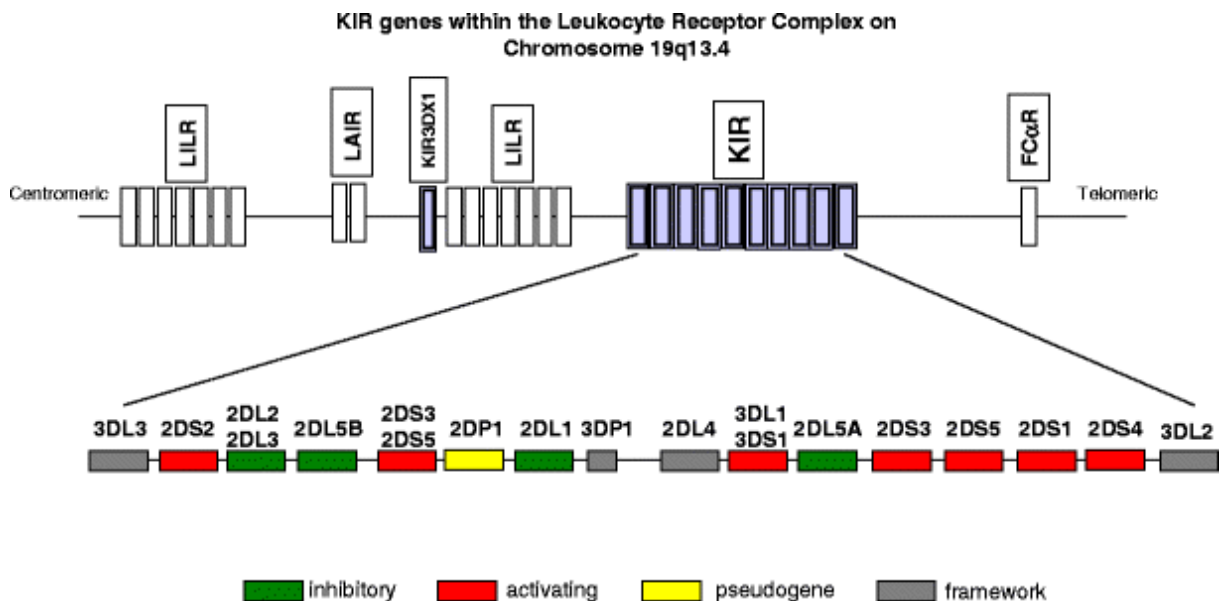


Figura 2. Composição do Complexo Receptor Leucocitário (do inglês, Leukocyte Receptor Complex, LRC), presente na região 19q13.4. Dentre eles, em destaque, os genes KIR. Em cinza os genes *framework*, vermelho os ativadores, verde inibidores e amarelo o pseudogene não *framework*. Fonte: Single et al., (2008).

Os principais ligantes dos receptores KIR são as moléculas do antígeno leucocitário humano de classe I, ou HLA de classe I, presentes na superfície da maioria das células somáticas (Campbell e Purdy, 2011). Os genes HLA localizam-se no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), no braço curto do cromossomo seis. Os genes de classe I codificam proteínas que atuam na apresentação de antígenos intracelulares aos linfócitos T citotóxicos ou CD8⁺ na resposta imune adaptativa (Norman *et al.*, 2016). Além disso, as proteínas produzidas pelos genes não clássicos (*HLA-G*, *-E*, *-F*) estão envolvidos com a modulação do sistema imune (Geraghty *et al.*, 1992).

Os receptores KIR podem ter função ativadora ou inibidora, o que vai depender da formação da sua cauda citoplasmática. Os receptores de inibição possuem cauda citoplasmática longa com motivo de inibição baseado em tirosina (ITIM) e são muito variáveis em termos de polimorfismos (Boudreau e Hsu, 2018a). Os receptores de ativação possuem cauda curta com motivo de ativação baseado em tirosina (ITAM) e tendem a ser menos variáveis (Humphrey *et al.*, 2005). Até o momento, são conhecidos 1110 alelos (ou sequências distintas) de genes KIR (*The Immuno Polymorphism Database*, v. 2.9.0), porém boa parte dessas sequências estão incompletas, principalmente em relação a íntrons ou regiões regulatórias.

A classificação dos genes *KIR* é feita por meio dos seguintes critérios: número de domínios Ig extracelulares que o gene codifica, podendo ser dois (KIR2D) ou três (KIR3D); tamanho da cauda citoplasmática, sendo a inibidora longa (*L - long*) e a ativadora curta (*S -*

short); e sua similaridade com outras sequências e ordem de descrição, o que é indicado pelo número final da nomenclatura, após S ou L, como indicado na figura 3 (Bashirova *et al.*, 2006).

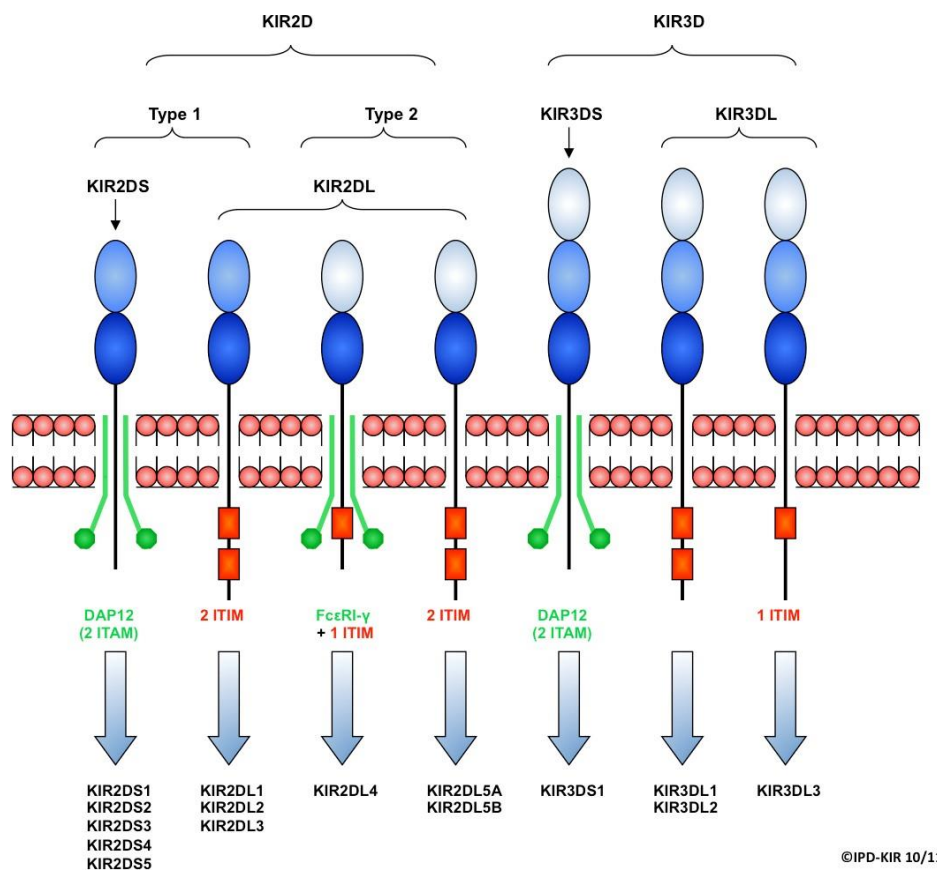


Figura 3. Representação das moléculas KIR. Em azul os domínios semelhantes a imunoglobulina (dois ou três), em vermelho os motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM) nas caudas citoplasmáticas longas e em verde os motivos de ativação baseados em tirosina (ITAM) nas caudas curtas. Imagem disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/images>.

A maioria dos genes *KIR* apresenta em sua estrutura nove éxons e oito íntrons, com tamanho variando entre 4 e 16 mil pares de base (Figura 4). Os éxons 1 e 2 codificam o peptídeo líder; éxons 3, 4 e 5 os domínios semelhantes à imunoglobulina, chamados de D0, D1 e D2, respectivamente; o éxon 6 codifica uma haste que liga o que está no meio extracelular ao intracelular; éxon 7 codifica o domínio transmembrana e os éxons 8 e 9 a cauda citoplasmática. Alguns genes *KIR* possuem deleção de éxons inteiros quando comparado à estrutura comum dos genes *KIR*, como o gene *KIR3DL3* que não possui o éxon 6 e o *KIR2DL4* que não possui o éxon 4 (Torkar *et al.*, 1998).

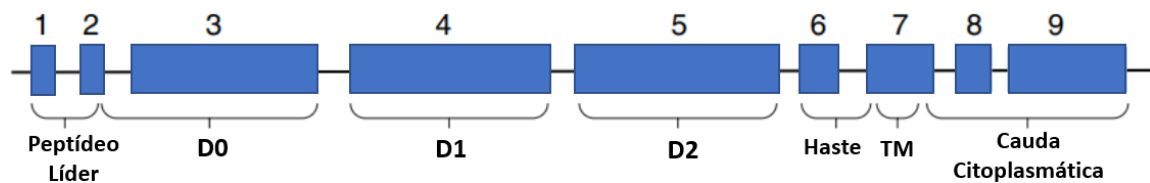


Figura 4. Estrutura geral dos genes *KIR*. Os éxons 1 e 2 codificam o peptídeo líder, éxons 3, 4 e 5 os domínios semelhantes a Ig, éxon 6 a haste que liga o D2 ao domínio transmembranar (TM) que é codificado pelo éxon 7 e a cauda citoplasmática é codificada pelos éxons 8 e 9. Lembrando que há alguns *KIR* que possuem deleção em éxon.

A nomenclatura dos genes *KIR* se dá de forma semelhante à dos HLA (Figura 5). O nome do gene é separado por um asterisco (*), os três primeiros dígitos indicam variações não sinônimas em éxons, os dois seguintes variações sinônimas em éxons e os dois últimos variações na região intrônica, promotora ou não codificante (Marsh *et al.*, 2003).

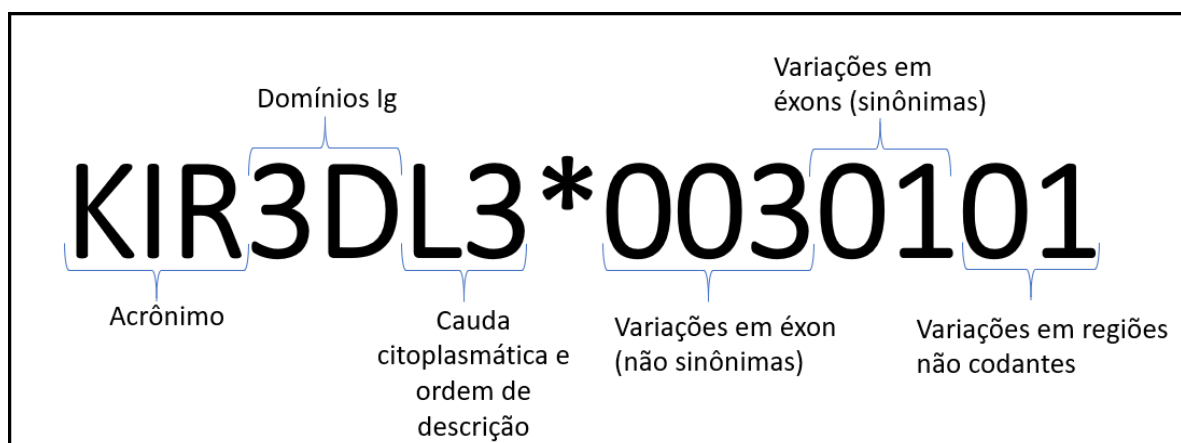


Figura 5. Nomenclatura *KIR*. Baseada na figura disponível em <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/alleles.html>.

Assim como seus principais ligantes, os genes HLA, a variabilidade dos *KIR* varia conforme o gene estudado. Há genes com um menor número de polimorfismos e outros com muitas variantes (Guethlein *et al.*, 2015). Embora haja diferenças no número de haplótipos e de variantes polimórficas, além de diferenças na estrutura do gene, como já discutido (Suto *et al.*, 1996; Bashirova *et al.*, 2006), os genes *KIR* compartilham uma alta similaridade de sequência (85-99%), fazendo com que recombinações possam ocorrer com frequência, resultando em expansão e contração de haplótipos e rearranjos na ordem dos genes ao longo do haplótipo (Single *et al.*, 2008). Esta variabilidade (que inclui SNPs e variação no número de cópias) influencia na resposta e no funcionamento das células NK, pois a diversidade alélica está relacionada com os níveis de expressão dos receptores e podem influenciar a interação com os

ligantes (Parham, 2005). Além disso, a formação do haplótipo de um indivíduo está associada a especificidade da modulação da resposta imune, se há ou não a presença de determinado gene KIR o perfil de expressão será diferente (Vilches e Parham, 2002).

Há dois principais haplogrupos descritos para os genes *KIR* – A e B, como ilustrado na figura 6 (Single *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2012). O haplótipo A possui apenas um gene de ativação (*KIR2DS4*), cinco de inibição (*KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*), um com dupla função (*KIR2DL4*) e os dois pseudogenes. O haplótipo B possui diferentes combinações, já foram descritos mais de 20 haplótipos diferentes, e há vários genes de ativação. Os *framework*, representados em cinza (*KIR3DL3*, *KIR3DL2*, *KIR2DL4* e *KIR3DP1*) estão presentes em todos os haplótipos, apesar de haver estudos em que há ausência de algum gene *framework*, mas em frequência muito baixa (Hsu, Liu, *et al.*, 2002). No geral, a frequência de genes KIR inibidores é maior e mais homogênea do que os ativadores (Augusto, Zehnder-Alves, *et al.*, 2012). A distribuição dos haplótipos de *KIR* varia entre populações de localizações geográficas distintas (Nemat-Gorgani *et al.*, 2019). Por exemplo, entre indivíduos caucasianos a frequência dos haplótipos A e B é balanceada (Hsu, Chida, *et al.*, 2002). No entanto, o haplótipo A é menos frequente em aborígenes australianos (13%) (Toneva *et al.*, 2001). Os genes KIR possuem potencial para servirem como marcadores de ancestralidade, mas, para isso, é preciso uma melhor descrição da sua diversidade alélica (Augusto, Zehnder-Alves, *et al.*, 2012).

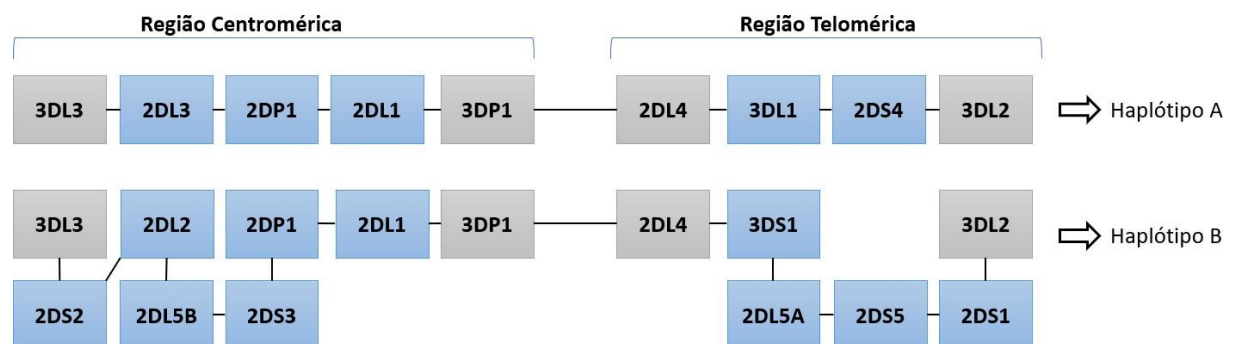


Figura 6. Haplótipos A e B. Em cinza pode-se observar os genes *framework*, e em azul os demais genes *KIR* de cada haplótipo, os quais podem ou não estar presentes e em diferentes quantidades de número de cópia. Baseado na figura de Parham *et al.*, 2005.

2. Receptores KIR e associação com doenças

Há diversos estudos relacionando a variabilidade de alelos, haplótipos e a interação HLA/KIR com diferentes doenças e a resistência a infecções virais (Augusto, Zehnder-Alves, *et al.*, 2012). A grande maioria dos estudos de associação utiliza metodologias de PCR-SSP (Ordonez *et al.*, 2012; Bossi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018), que permitem uma análise da composição haplotípica dos genes *KIR* dos indivíduos - quais KIR estão presentes ou ausentes e sua frequência em um grupo caso e um controle. Em geral, haplótipos com maior presença de genes *KIR* ativadores são importantes para combater infecções virais, como HIV e citomegalovírus, pois com o reconhecimento das células infectadas, os genótipos ativadores codificam moléculas que iniciam uma resposta nas células levando à morte celular (Qi *et al.*, 2006).

Em relação à predisposição a respostas autoimunes, os receptores ativadores vêm sendo considerados como um fator de susceptibilidade para algumas doenças, como diabetes tipo I e esclerose múltipla (Kulkarni *et al.*, 2008). Outro exemplo é a artrite reativa, uma doença autoimune com mecanismos pouco conhecidos. Foi observado que altos níveis de expressão de receptores ativadores e baixos níveis de inibidores podem afetar o funcionamento das células NK, contribuindo para a patogênese desta doença, devido superprodução de citocinas locais (Sun *et al.*, 2019). Em outros estudos observou-se que a interação KIR ativador/HLA e sua taxa de expressão podem ter papel de proteção em algumas doenças, se assemelhando ao mecanismo observados em doenças infecciosas, como é o caso do Pênfigo Foliáceo (PF) (Kulkarni *et al.*, 2008; Augusto, Lobo-Alves, *et al.*, 2012). Também em relação ao PF, foi encontrada uma relação de predisposição em um haplótipo composto por dois SNPs localizados a jusante do pseudogene *LILRP2* e um no éxon 3 do gene *KIR3DL3* (Farias *et al.*, 2019).

Em tumores, a baixa ou ausência de expressão de moléculas HLA de classe I leva a eliminação de células transformadas por meio da ação das NK. Foi observado que genótipos compostos por muitos KIR inibidores podem facilitar a evasão das células tumorais, mas não é uma regra, já que há grande variação de acordo com a neoplasia estudada (Verheyden *et al.*, 2004; Besson *et al.*, 2007; Kulkarni *et al.*, 2008). Por exemplo, um estudo sobre câncer colorretal mostrou uma maior frequência de *KIR2DS3* no grupo caso (Diaz-Pena *et al.*, 2020), já em um estudo familiar sobre Linfoma de Hodgkin, indivíduos com o vírus Epstein-Barr (EBV) detectável no sangue apresentaram um fator de proteção mais alto com a presença de genes KIR ativadores, comparado aos que não possuem EBV (Besson *et al.*, 2007). Portanto cada tipo de câncer deve ser analisado em relação aos receptores/ligantes e a sua patogênese,

para que seja possível perceber se há ou não influência desses genes no desenvolvimento ou proteção a neoplasias.

Os genes *KIR* também estão relacionados a gestação. HLA de classe I (*HLA-G*, *-C* e *-E*) estão presentes no trofoblasto extraviloso e há uma alta concentração de células NK ($CD56^{\text{bright}}$) na decídua que expressam receptores KIR, fazendo com que eles sejam críticos para uma placentação apropriada (Trowsdale e Moffett, 2008). A pré-eclâmpsia ocorre quando há uma baixa perfuração da placenta na decídua por parte do trofoblasto extraviloso. Foi estudado que uma maior frequência de homozigose para o haplótipo A materno em combinação com HLA-C2 no feto está associada com o aumento de risco desta condição, pois há uma alta inibição de células NK da decídua, por meio da interação *KIR2DL1* e *HLA-C2*, que prejudica a remodelação dos vasos sanguíneos (Kulkarni *et al.*, 2008; Trowsdale e Moffett, 2008; Huhn *et al.*, 2018). Também foi observado em um estudo recente que o gene *KIR3DL2* possui um fator de proteção e os genes ativadores *KIR2DS2* e *KIR2DS3* são fatores de risco para o aborto espontâneo recorrente (Akbari *et al.*, 2020).

Os receptores KIR possuem um importante papel na regulação da resposta imune e podem desempenhar papel de proteção e susceptibilidade em diversas doenças, de acordo com suas patogêneses e especificidades. Ter uma melhor compreensão a respeito da estrutura e diversidade alélica de cada gene poderia contribuir para que estudos de associação sejam mais realizados nesta escala. Além disso, ter estudos em populações com diferentes ancestralidades e background genético, pois pode haver variações de acordo com a população estudada.

3. *KIR3DL3*

❖ Estrutura e Polimorfismo genético

O gene *KIR3DL3* possui apenas oito éxons e 11.561 pares de base. O éxon 6, que codifica a haste que liga os domínios semelhantes à imunoglobulina a região transmembranar, está ausente nesse gene, provavelmente por processos de recombinação no íntron 5 (Torkar *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2006). Assim como nos demais genes da família *KIR*, os éxons 1 e 2 codificam os peptídeos líderes, os éxons 3, 4 e 5 os domínios semelhantes a imunoglobulinas (D0, D1 e D2), éxon 7 o domínio transmembrana e os éxons 8 e 9 a cauda citoplasmática.

A molécula de *KIR3DL3* possui um único domínio de ITIM, devido truncamento que ocorre antes da posição do segundo ITIM (Trundley *et al.*, 2006). Estas características estruturais podem indicar diferenças na ligação e especificidade em relação aos ligantes, sugerindo uma função diferenciada em relação aos outros KIR. Os receptores KIR possuem

expressão variada nas células NK, alguns podem ser expressos em algumas células e outros não e há variação na intensidade de expressão (Kulkarni *et al.*, 2008).

O *KIR3DL3* possui expressão baixa ou indetectável em células NK no sangue periférico e os transcritos foram detectados em maiores níveis em células NK CD56^{bright}, encontradas no sangue e no sítio de implantação do embrião (Trundley *et al.*, 2006). Este gene provavelmente está envolvido com um importante processo de modulação do sistema imune materno na relação mãe-feto, pois há uma maior expressão na gravidez, no sangue periférico e na decídua materna. Acredita-se que ele pode induzir uma sinalização inibitória específica para esta relação em células NK uterinas, para evitar um conflito com células do embrião e permitir uma infiltração efetiva das células do trofoblasto na parede uterina (Wilson *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2006; Leaton *et al.*, 2019). Também foi encontrado RNAm do gene *KIR3DL3*, mas ausência de expressão celular em células NK92 (Nutalai *et al.*, 2019).

Mesmo com esta baixa expressão, o gene é funcional e codifica proteínas expressas na membrana celular na ausência de proteínas acessórias (Trundley *et al.*, 2006). No geral, o receptor *KIR3DL3* está mais presente nas células NK circulantes de mulheres do que de homens (Wilson *et al.*, 2000). Ainda não se sabe qual é o seu ligante principal, mas há evidências que sugerem que seja uma molécula com a estrutura similar a HLA de classe I clássico, mas com polimorfismo limitado (Leaton *et al.*, 2019).

O alto polimorfismo encontrado em outros genes desta família também é visto em *KIR3DL3*, que atualmente conta com 165 alelos e 92 variantes proteicas catalogadas. O *KIR3DL3* é o gene *KIR* com maior número de alelos descritos até o momento (IPD-KIR, acesso em 12/05/2020). Esta alta diversidade alélica pode estar relacionada a eventos de recombinação que ocorrem principalmente no íntron 5, os quais podem influenciar na ligação com o ligante e nos níveis de expressão (Jones *et al.*, 2006). Ele apresenta elevada heterozigose alélica, com exceção de populações da América do Sul e leste da Ásia (Leaton *et al.*, 2019). A região do gene com maior variabilidade é a que codifica os domínios extracelulares (éxons 3 a 5), enquanto que o segmento intracelular (éxon 7 e 8) são mais conservados (Hou *et al.*, 2012).

Apesar de existirem quatro genes considerados *framework*, apenas o *KIR3DL3* é realmente encontrado em todos os indivíduos, taxa de ocorrência dos demais é de cerca de 99% nas populações mundiais. Ele está na posição 5' terminal do complexo *KIR*, provavelmente sendo protegido de remoções em eventos de recombinação desbalanceada. Há um *hotspot* de recombinação localizado no íntron 5, o qual possui mais de cinco mil pares de base (Leaton *et al.*, 2019). Devido à falta de informações sobre o gene em questão, não se sabe ao certo como

é a relação entre o *KIR3DL3* e a molécula ligante, qual é a diversidade real deste gene em diferentes populações humanas e quais os aspectos funcionais dessa molécula.

❖ Regiões regulatórias do gene *KIR3DL3*

As células *NK* possuem padrões de expressão variado, em número e identidade. Estes receptores expressos geram subconjuntos de células *NK* que reconhecem expressão alterada das moléculas HLA de classe I (Li *et al.*, 2016b). No caso dos receptores KIR, a regulação gênica ocorre de forma independente, apesar da alta similaridade de sequência, inclusive na região promotora, entre os genes desta família (Chan *et al.*, 2003). A região promotora de *KIR3DL3* e *KIR2DL4* são as que apresentam menor homologia em relação aos demais genes e se diferem em questão funcional (fatores de transcrição, expressão) (Van Bergen *et al.*, 2005). A variação na expressão de genes *KIR* pode ser explicada pela hipótese do estado de metilação de alelos ativos e inativos. KIR não expressos encontram-se metilados e quando tratados com agentes desmetilantes apresentam uma expressão *de novo* (Stulberg *et al.*, 2007).

A baixa expressão de *KIR3DL3* está relacionada a silenciamento epigenético por meio de forte metilação do promotor proximal (Trompeter *et al.*, 2005), de forma que as poucas moléculas de RNAm de *KIR3DL3* encontradas em algumas amostras devem ser resultado da transcrição de um pequeno número de promotores desmetilados, portanto a maioria fica em um estado inativo de transcrição. Apesar da baixa expressão, é o KIR com atividade promotora mais forte, em especial na região -225, diferentes dos demais em que a região -65 que é a que apresenta uma maior atividade (posição de acordo com o IPD-KIR). A presença de um fator de transcrição (AML) na região proximal também influencia na atividade da região promotora, podendo atuar na desmetilação do promotor (Trompeter *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2014). O silenciamento do gene *KIR3DL3* é, então, associado à hipótese de que sua expressão é condicionada a estímulos relacionados ao desenvolvimento do organismo ou a contextos patológicos, por meio de uma maior regulação da transcrição ou por mecanismos pós-transcricionais (Trundley *et al.*, 2006).

A região promotora intermediária (ProI) influencia na expressão de proteínas por células *NK* maduras. Foi observado em *KIR2DL1* que, uma deleção nesta região diminuiu a atividade da promotora e os níveis de expressão proteica. *KIR3DL3* é o gene menos conservado nesta região dentre os genes KIR (Wright *et al.*, 2014). Estudos sobre a promotora distal e intermediária mostram que a região intergênica do complexo KIR possui um papel importante na regulação dos transcritos dessa família gênica (Li *et al.*, 2016a). Existe a hipótese de que elementos da promotora intermediária controlam a expressão de KIR, enquanto a promotora

proximal leva a expressões variadas dos KIRs por meio do silenciamento epigenético e coopera com o ProI, possibilitando ou não a expressão – se ele estiver metilado, não há produção de transcritos (Li *et al.*, 2016b).

Os miRNAs são microRNA dentro da família de *small non-coding* RNA (pequenos RNA não codificadores de proteínas) que se liga a região 3'UTR de mRNA, eles podem alterar a estabilidade do RNAm e limitar processos da tradução de proteínas, sendo um importante mecanismo de regulação celular pós-transcricional (Bartel, 2009; Pesce *et al.*, 2018). Um estudo recente mostrou evidências que miRNAs - miR-26a-5p, miR-26b-5p e miR-185-5p - podem interagir com a região 3'UTR de *KIR3DL3*. Foi observado que, além da regulação por meio da metilação da região promotora, a expressão de proteínas na superfície celular é induzida quando há o silenciamento dos miRNAs (Nutalai *et al.*, 2019).

Outro ponto atuante na regulação e expressão de *KIR3DL3* é o íntron 1, o qual possui uma região de VNTR (variação no número de repetições em tandem, do inglês “variable number of tandem repeats”) em uma região rica em GC. Esta combinação pode levar a consequências na expressão gênica de *KIR3DL3*, *imprinting*, eventos de recombinação e *splicing* de RNAm (Trompeter *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006).

❖ Aspectos evolutivos e seleção natural atuando sobre o gene *KIR3DL3*

O gene *KIR3DL3* está presente em todos os haplótipos humanos e é uma característica conservada dos Hominoidea (Khakoo *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 2011). Ele é o único gene que prevaleceu em todos os primatas Catarrhini, mesmo após a rápida evolução desses genes. É observado um considerável nível de conservação de sequências entre os grandes primatas e evidências evolutivas sugerem que é um membro antigo desta família gênica (Jones *et al.*, 2006). É possível que ele tenha sido conservado para agir como uma reserva de sequências para recombinação ou como um elemento estrutural para auxiliar o alinhamento do cromossomo durante a meiose (Trundley *et al.*, 2006). Os genes *KIR* ativadores são mais recentes na escala evolutiva e provavelmente surgiram a partir dos genes inibidores homólogos (Abi-Rached e Parham, 2005).

Os genes *KIR* são divididos em cinco linhagens. A linhagem I se liga a moléculas MHC não polimórficas, como a *HLA-G*. As linhagens II e III possuem ligantes bem estabelecidos e se ligam a motivos polimórficos (*HLA-A, B, C*). A linhagem IV é como a linhagem dois, mas é específica de *Macaca*. No entanto, esta designação não é mais utilizada visto que foi observado que eles se enquadram na linhagem II. A linhagem V não possui ligante definido em nenhuma espécie e apresentam domínios de sinalização pertencentes à linhagem III, este é o caso do gene

KIR3DL3. A linhagem V é a mais conservada ao longo do processo evolutivo (Guethlein *et al.*, 2015).

Em estudo realizado por Leaton e colaboradores (2019), foi realizada uma análise filogenética em cada um dos domínios de *KIR3DL3* em primatas Catarrhini (humanos, gorilas, chimpanzés, orangotango, gibão, macaca) e em seis espécies de macacos do velho mundo (OWM). Foi constatado que, para os domínios semelhantes a Ig, há a presença da linhagem V para a maioria das espécies (exceto D2 de orangotango). Nenhum homínídeo (chimpanzé, gorila, humano) apresentou o domínio citoplasmático de linhagem V, apenas na linhagem III.

Em uma análise populacional é possível avaliar se há algum tipo de seleção natural atuando em uma região gênica. Esta seleção pode favorecer o aumento da frequência de alelos que aumentam o fitness (seleção positiva ou balanceadora) ou diminuir a frequência e até mesmo eliminar variantes que reduzam o fitness do indivíduo (seleção negativa ou purificadora) (Fu e Akey, 2013). Regiões sob seleção balanceadora tendem a acumular um maior número de polimorfismos, em frequências intermediárias, aumentando o grau de variabilidade e a heterozigose se comparado aos outros tipos de seleção (Key *et al.*, 2014).

Esta família gênica possui grande importância na resposta imune e na reprodução, por esse motivo a variabilidade desses genes estão sob pressão seletiva (Augusto *et al.*, 2015). Em uma análise dos domínios semelhantes a imunoglobulina de *KIR3DL3*, foi sugerida a presença de seleção purificadora, com valores baixos de dN/dS (mutações não sinônimas/ mutações sinônimas), e seleção positiva atuando no éxon 6 (região transmembrana) (Jones *et al.*, 2006). Em estudo mais recente, foi observado uma alta taxa de mutações não sinônimas no domínio D2 e a indicação de seleção positiva no éxon 6 (Leaton *et al.*, 2019).

4. Ancestralidade da população brasileira e Projeto 1000 genomas

A composição genética da população brasileira é reflexo de mais de cinco séculos de mistura inter-étnica entre europeus, africanos e ameríndios, tornando-a uma das populações mais heterogêneas do mundo. Portanto, a população brasileira é um modelo tri-híbrido, formada pela miscigenação entre três principais grupos étnicos – europeus, africanos e ameríndios. Por conta disso, ela possui elevada taxa de miscigenação. Tal heterogeneidade étnica se reflete na alta diversidade fenotípica observada entre os brasileiros (Pena *et al.*, 2011). Dessa forma, pode-se considerar os brasileiros como uma população que permite a identificação de novos alelos e haplótipos em qualquer gene, principalmente os considerados muito variáveis.

O estado de São Paulo, alvo do presente estudo, é o mais populoso do Brasil e contém uma considerável miscigenação entre os grupos citados acima. Para essa região do país a maior

contribuição é Europeia (79%), seguida da Africana (14%) e Ameríndia (7%) (Ferreira et al., 2006). Embora dezenas de alelos diferentes de KIR3DL3 tenham sido descritos, não se sabe a respeito da variabilidade inerente desse gene em populações humanas miscigenadas como a brasileira.

Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs, do inglês Ancestry Informative Markers) são muito utilizados para análises de ancestralidade em indivíduos. Estes marcadores utilizam tipos de variabilidade genética (SNPs, STRs, inserções/ deleções, entre outros) que apresentam alelos com frequências significativamente diferente entre populações provenientes de localidades geográficas distintas (Martinez-Fierro et al., 2009; Pereira et al., 2012). Um painel com 34 AIMs não relacionados foi desenvolvido com SNPs que diferenciam perfis europeus, africanos e do leste asiático (Phillips et al., 2007; Fondevila et al., 2013). A busca por marcadores indicativos de ancestralidade ameríndia é desafiadora, devido ao pouco espaço de tempo da separação deste grupo com o pertencente ao leste asiático, além da mistura com europeus (Phillips et al., 2007). Por esse motivo utilizamos esses marcadores neste grupo amostral.

O projeto 1000 genomas utilizou diversas metodologias de sequenciamento para avaliar o genoma de 2.504 indivíduos de 26 populações ao redor do mundo. As 26 populações estão divididas cinco grupos: leste asiático, europeu, africano, ameríndio e sul asiático. O objetivo principal do projeto foi genotipar esses indivíduos e fornecer informações a respeito da formação haplotípica e dos polimorfismos presentes nas diferentes populações. Foram classificadas variantes que possuem uma frequência de pelo menos 1% em diferentes populações, variantes raras (0,1-0,5%) no genoma funcional e variantes estruturais, como variações no número de cópias, inversões, inserções e deleções (NCBI). Todos os indivíduos possuem sequenciamento de exoma e de baixa cobertura, além disso 24 indivíduos foram sequenciados com alta cobertura para validação. O mapeamento foi realizado por meio da ferramenta BWA. Não há dados sobre a população brasileira e de nenhuma população miscigenada como a nossa neste consórcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-RACHED, L.; PARHAM, P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. **J Exp Med**, v. 201, n. 8, p. 1319-32, Apr 18 2005. ISSN 0022-1007.

AKBARI, S. et al. Recurrent Spontaneous Abortion (RSA) and Maternal KIR Genes: A Comprehensive Meta-Analysis. **JBRA Assist Reprod**, Feb 12 2020. ISSN 1517-5693.

AUGUSTO, D. G. The Impact of KIR Polymorphism on the Risk of Developing Cancer: Not as Strong as Imagined? **Front Genet**, v. 7, p. 121, 2016. ISSN 1664-8021.

AUGUSTO, D. G.; HOLLENBACH, J. A.; PETZL-ERLER, M. L. A deep look at KIR-HLA in Amerindians: comprehensive meta-analysis reveals limited diversity of KIR haplotypes. **Hum Immunol**, v. 76, n. 4, p. 272-80, Apr 2015. ISSN 0198-8859.

AUGUSTO, D. G. et al. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e39991, 2012. ISSN 1932-6203.

AUGUSTO, D. G.; PETZL-ERLER, M. L. KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. **Human Genetics**, v. 134, n. 9, p. 929-940, Sep 2015. ISSN 0340-6717.

AUGUSTO, D. G. et al. Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. **Immunogenetics**, v. 64, n. 2, p. 143-52, Feb 2012. ISSN 0093-7711.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-265, Jan 2005. ISSN 1367-4803.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, Jan 23 2009. ISSN 0092-8674.

BASHIROVA, A. A. et al. The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 7, p. 277-300, 2006. ISSN 1527-8204

BESSION, C. et al. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with Hodgkin's lymphoma in a familial study. **PLoS One**, v. 2, n. 5, p. e406, May 2 2007. ISSN 1932-6203.

BEZMAN, N. A. et al. Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 3835-46, Oct 1 2010. ISSN 0022-1767.

BOSSI, G. et al. Genetic epistasis between killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigens in Kawasaki disease susceptibility. **Genes Immun**, v. 16, n. 7, p. 481-7, Oct 2015. ISSN 1466-4879.

BOTTINO, C. et al. Cellular ligands of activating NK receptors. **Trends Immunol**, v. 26, n. 4, p. 221-6, Apr 2005. ISSN 1471-4906

BOUDREAU, J. E.; HSU, K. C. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 3, p. 222-239, Mar 2018a. ISSN 1471-4906.

_____. Natural killer cell education in human health and disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 102-111, Feb 2018b. ISSN 0952-7915.

BROWNING, S. R.; BROWNING, B. L. Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. **Am J Hum Genet**, v. 81, n. 5, p. 1084-97, Nov 2007. ISSN 0002-9297

BUTTURA, R. V. et al. HLA-F displays highly divergent and frequent haplotype lineages associated with different mRNA expression levels. **Hum Immunol**, v. 80, n. 2, p. 112-119, Feb 2019. ISSN 0198-8859.

CAMPBELL, K. S.; PURDY, A. K. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. **Immunology**, v. 132, n. 3, p. 315-325, Mar 2011. ISSN 0019-2805.

CASTELLI, E. C. et al. A Comprehensive Study of Polymorphic Sites along the HLA-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 11, p. 3069-3086, Nov 2011. ISSN 0737-4038.

CASTELLI, E. C. et al. Hla-mapper: An application to optimize the mapping of HLA sequences produced by massively parallel sequencing procedures. **Hum Immunol**, v. 79, n. 9, p. 678-684, Sep 2018. ISSN 0198-8859.

CHAN, H. W. et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. **J Exp Med**, v. 197, n. 2, p. 245-55, Jan 20 2003. ISSN 0022-1007

DELANEAU, O.; MARCHINI, J.; ZAGURY, J. F. A linear complexity phasing method for thousands of genomes. **Nat Methods**, v. 9, n. 2, p. 179-81, Dec 4 2011. ISSN 1548-7091.

DIAZ-PENA, R. et al. Analysis of Killer Immunoglobulin-Like Receptor Genes in Colorectal Cancer. **Cells**, v. 9, n. 2, Feb 24 2020. ISSN 2073-4409.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, May 2010. ISSN 1755-098X.

FARIAS, T. D. J. et al. Screening the full leucocyte receptor complex genomic region revealed associations with pemphigus that might be explained by gene regulation. **Immunology**, v. 156, n. 1, p. 86-93, Jan 2019. ISSN 0019-2805.

- FERREIRA, L. B. et al. Genomic ancestry of a sample population from the state of Sao Paulo, Brazil. **American Journal of Human Biology**, v. 18, n. 5, p. 702-705, Sep-Oct 2006. ISSN 1042-0533.
- FONDEVILA, M. et al. Revision of the SNPforID 34-plex forensic ancestry test: Assay enhancements, standard reference sample genotypes and extended population studies. **Forensic Science International-Genetics**, v. 7, n. 1, p. 63-74, Jan 2013. ISSN 1872-4973.
- FU, W.; AKEY, J. M. Selection and adaptation in the human genome. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 14, p. 467-89, 2013. ISSN 1527-8204.
- GERAGHTY, D. E. et al. The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. **J Immunol**, v. 149, n. 6, p. 1934-46, Sep 15 1992. ISSN 0022-1767
- GONZALEZ-GALARZA, F. F. et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D784-8, Jan 2015. ISSN 0305-1048.
- GUETHLEIN, L. A. et al. Co-evolution of MHC class I and variable NK cell receptors in placental mammals. **Immunol Rev**, v. 267, n. 1, p. 259-82, Sep 2015. ISSN 0105-2896.
- HINTON-SHELEY, P. Missing Self Hypothesis for Natural Killer Cells. News-Medical. (2019, February 26). Retrieved on June 16, 2020 from <https://www.news-medical.net/life-sciences/Missing-Self-Hypothesis-for-Natural-Killer-Cells.aspx>.
- HOU, L. et al. Conserved KIR allele-level haplotypes are altered by microvariation in individuals with European ancestry. **Genes and Immunity**, v. 13, n. 1, p. 47-58, Jan 2012. ISSN 1466-4879.
- HOU, L. et al. Seventeen novel alleles add to the already extensive KIR3DL3 diversity. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 6, p. 449-454, Dec 2007. ISSN 0001-2815.
- HSU, K. C. et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. **Immunological Reviews**, v. 190, n. 1, p. 40-52, Dec 2002. ISSN 0105-2896.
- HSU, K. C. et al. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: Evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 5118-5129, Nov 2002. ISSN 0022-1767.
- HUHN, O. et al. High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. **J Immunol**, v. 201, n. 9, p. 2593-2601, Nov 1 2018. ISSN 0022-1767.

HUMPHREY, M. B.; LANIER, L. L.; NAKAMURA, M. C. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. **Immunological Reviews**, v. 208, p. 50-65, Dec 2005. ISSN 0105-2896.

JAGER, A.; KUCHROO, V. K. Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, n. 3, p. 173-184, Sep 2010. ISSN 0300-9475.

JONES, D. C. et al. Nature of allelic sequence polymorphism at the KIR3DL3 locus. **Immunogenetics**, v. 58, n. 8, p. 614-627, Aug 2006. ISSN 0093-7711.

KARRE, K. et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 675-8, Feb 20-26 1986. ISSN 0028-0836

KEY, F. M. et al. Advantageous diversity maintained by balancing selection in humans. **Curr Opin Genet Dev**, v. 29, p. 45-51, Dec 2014. ISSN 0959-437x.

KHAKOO, S. I. et al. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. **Immunity**, v. 12, n. 6, p. 687-98, Jun 2000. ISSN 1074-7613.

KULKARNI, S.; MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 6, p. 343-352, Dec 2008. ISSN 1044-5323.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v. 33, n. 7, p. 1870-4, Jul 2016. ISSN 0737-4038.

LEATON, L. A. et al. Conservation, Extensive Heterozygosity, and Convergence of Signaling Potential All Indicate a Critical Role for KIR3DL3 in Higher Primates. **Front Immunol**, v. 10, p. 24, 2019. ISSN 1664-3224.

LI, H. et al. Characterization of KIR intermediate promoters reveals four promoter types associated with distinct expression patterns of KIR subtypes. **Genes and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 66-74, Jan-Feb 2016a. ISSN 1466-4879.

_____. Characterization of KIR intermediate promoters reveals four promoter types associated with distinct expression patterns of KIR subtypes. **Genes Immun**, v. 17, n. 1, p. 66-74, Jan-Feb 2016b. ISSN 1466-4879.

LIMA, T. H. A. et al. HLA-A promoter, coding, and 3'UTR sequences in a Brazilian cohort, and their evolutionary aspects. **Hla**, v. 93, n. 2-3, p. 65-79, Feb 2019. ISSN 2059-2302.

MARSH, S. G. E. et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. **Journal of Immunological Methods**, v. 281, n. 1-2, p. 1-8, Oct 2003. ISSN 0022-1759.

MARTINEZ-FIERRO, M. L. et al. Ancestry informative markers and admixture proportions in northeastern Mexico. **J Hum Genet**, v. 54, n. 9, p. 504-9, Sep 2009. ISSN 1434-5161.

MCKENNA, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297-1303, Sep 2010. ISSN 1088-9051.

MICHELET, X. et al. Metabolic reprogramming of natural killer cells in obesity limits antitumor responses. **Nat Immunol**, v. 19, n. 12, p. 1330-1340, Dec 2018. ISSN 1529-2908.

MORETTA, A. et al. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. **Trends Immunol**, v. 26, n. 12, p. 668-75, Dec 2005. ISSN 1471-4906

MURRELL, B. et al. FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 5, p. 1196-205, May 2013. ISSN 0737-4038 (

NEMAT-GORGANI, N. et al. Diversity of KIR, HLA Class I, and Their Interactions in Seven Populations of Sub-Saharan Africans. **J Immunol**, v. 202, n. 9, p. 2636-2647, May 1 2019. ISSN 0022-1767.

NORMAN, P. J. et al. Co-evolution of Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I Ligands with Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors (KIR) in a Genetically Diverse Population of Sub-Saharan Africans. **Plos Genetics**, v. 9, n. 10, Oct 2013. ISSN 1553-7404.

NORMAN, P. J. et al. Defining KIR and HLA Class I Genotypes at Highest Resolution via High-Throughput Sequencing. **American Journal of Human Genetics**, v. 99, n. 2, p. 375-391, Aug 2016. ISSN 0002-9297.

NUTALAI, R. et al. Regulation of KIR3DL3 Expression via Mirna. **Genes (Basel)**, v. 10, n. 8, Aug 9 2019. ISSN 2073-4425.

O'CONNOR, G. M. et al. Mutational and structural analysis of KIR3DL1 reveals a lineage-defining allotypic dimorphism that impacts both HLA and peptide sensitivity. **J Immunol**, v. 192, n. 6, p. 2875-84, Mar 15 2014. ISSN 0022-1767.

ORDONEZ, D. et al. KIR typing by non-sequencing methods: polymerase-chain reaction with sequence-specific primers. **Methods Mol Biol**, v. 882, p. 415-30, 2012. ISSN 1064-3745.

ORR, M. T.; LANIER, L. L. Natural Killer Cell Education and Tolerance. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 847-856, Sep 2010. ISSN 0092-8674.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 201-214, Mar 2005. ISSN 1474-1733.

PENA, S. D. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17063, Feb 16 2011. ISSN 1932-6203.

PEREIRA, R. et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29684, 2012. ISSN 1932-6203.

PESCE, S. et al. New miRNA Signature Heralds Human NK Cell Subsets at Different Maturation Steps: Involvement of miR-146a-5p in the Regulation of KIR Expression. **Front Immunol**, v. 9, p. 2360, 2018. ISSN 1664-3224.

PHILLIPS, C. Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. **Forensic Science International-Genetics**, v. 18, p. 49-65, Sep 2015. ISSN 1872-4973.

PHILLIPS, C. et al. Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. **Forensic Sci Int Genet**, v. 1, n. 3-4, p. 273-80, Dec 2007. ISSN 1872-4973.

POSTH, C. et al. Reconstructing the Deep Population History of Central and South America. **Cell**, v. 175, n. 5, p. 1185-1197.e22, Nov 15 2018. ISSN 0092-8674.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, Jun 2000. ISSN 0016-6731.

PURDY, A. K.; CAMPBELL, K. S. Natural killer cells and cancer Regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). **Cancer Biology & Therapy**, v. 8, n. 23, p. 2211-2220, Dec 2009. ISSN 1538-4047.

PYO, C. W. et al. Different Patterns of Evolution in the Centromeric and Telomeric Regions of Group A and B Haplotypes of the Human Killer Cell Ig-Like Receptor Locus. **Plos One**, v. 5, n. 12, Dec 2010. ISSN 1932-6203.

PYO, C. W. et al. Recombinant structures expand and contract inter and intragenic diversification at the KIR locus. **BMC Genomics**, v. 14, p. 89, Feb 8 2013. ISSN 1471-2164.

QI, Y. et al. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 8, p. e79, Aug 2006. ISSN 1553-7366.

ROBINSON, J. et al. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D423-31, Jan 2015. ISSN 0305-1048.

ROE, D. et al. Revealing complete complex KIR haplotypes phased by long-read sequencing technology. **Genes Immun**, v. 18, n. 3, p. 127-134, Sep 2017. ISSN 1466-4879.

SINGLE, R. M. et al. Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations. **Immunogenetics**, v. 60, n. 12, p. 711-725, Dec 2008. ISSN 0093-7711.

STULBERG, M. J. et al. Identification of distal KIR promoters and transcripts. **Genes Immun**, v. 8, n. 2, p. 124-30, Mar 2007. ISSN 1466-4879.

SUN, H. S. et al. Disease-association of different killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and HLA-C gene combinations in reactive arthritis. **Mod Rheumatol**, v. 29, n. 3, p. 531-537, May 2019. ISSN 1439-7595.

SUTO, Y. et al. Chromosomal localization of the human natural killer cell class I receptor family genes to 19q13.4 by fluorescence in situ hybridization. **Genomics**, v. 35, n. 1, p. 270-272, Jul 1996. ISSN 0888-7543.

TAKESHITA, L. Y. et al. A database for curating the associations between killer cell immunoglobulin-like receptors and diseases in worldwide populations. **Database (Oxford)**, v. 2013, p. bat021, 2013. ISSN 1758-0463.

TONEVA, M. et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 4, p. 358-62, Apr 2001. ISSN 0001-2815

TORKAR, M. et al. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 12, p. 3959-67, Dec 1998. ISSN 0014-2980

TROMPETER, H. I. et al. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 7, p. 4135-4143, Apr 2005. ISSN 0022-1767.

TROWSDALE, J.; MOFFETT, A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. **Semin Immunol**, v. 20, n. 6, p. 317-20, Dec 2008. ISSN 1044-5323

TRUNDLEY, A. E. et al. Molecular characterization of KIR3DL3. **Immunogenetics**, v. 57, n. 12, p. 904-916, Jan 2006. ISSN 0093-7711.

UHRBERG, M. et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 753-763, Dec 1997. ISSN 1074-7613.

VAN BERGEN, J. et al. Structural and functional differences between the promoters of independently expressed killer cell Ig-like receptors. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 7, p. 2191-9, Jul 2005. ISSN 0014-2980

VAN DER AUWERA, G. A. et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. 43, p. 11.10.1-33, 2013. ISSN 1934-3396.

VANDENBUSSCHE, C. J. et al. Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule. **Genes Immun**, v. 10, n. 2, p. 162-73, Mar 2009. ISSN 1466-4879.

VENDELBOSCH, S. et al. Extensive Variation in Gene Copy Number at the Killer Immunoglobulin-Like Receptor Locus in Humans. **Plos One**, v. 8, n. 6, Jun 2013. ISSN 1932-6203.

VERHEYDEN, S.; BERNIER, M.; DEMANET, C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 12, p. 2002-7, Dec 2004. ISSN 0887-6924.

VILCHES, C.; PARHAM, P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 217-251, 2002. ISSN 0732-0582.

VIVIER, E. et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. **Science**, v. 331, n. 6013, Jan 2011. ISSN 0036-8075.

WANG, L. et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptors associate with HIV-1 infection in a narrow-source Han Chinese cohort. **PLoS One**, v. 13, n. 4, p. e0195452, 2018. ISSN 1932-6203.

WILSON, M. J. et al. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 9, p. 4778-83, Apr 25 2000. ISSN 0027-8424

WRIGHT, P. W. et al. Characterization of a weakly expressed KIR2DL1 variant reveals a novel upstream promoter that controls KIR expression. **Genes Immun**, v. 15, n. 7, p. 440-8, Oct 2014. ISSN 1466-4879.

Conclusão

O gene *KIR3DL3* foi avaliado em 27 populações mundiais, incluindo populações europeias, africanas, asiáticas e algumas populações miscigenadas (incluindo Brasil). Essas populações são provenientes do banco de dados 1000 *genomes*, exceto a população brasileira. Para isso, desenvolvemos uma metodologia de sequenciamento de segunda geração para sequenciar os dados da população brasileira e uma estratégia computacional específica para trabalhar com esta família gênica. A partir disso podemos destacar alguns pontos em relação ao gene *KIR3DL3*:

1. Foram encontradas duas linhagens de promotores divergentes, com muitas variantes em absoluto LD, baixa diversidade no promotor proximal e evidencia de seleção balanceadora nos promotores principalmente em populações europeias e do leste asiático;
2. Observamos seleção purificadora no domínio D2 (éxon 5), alta diversidade de proteínas preditas e seleção balanceadora no domínio transmembrana (éxon 6);
3. O peptídeo líder e a região citoplasmática são muito conservadas em todas as populações estudadas;
4. Confirmamos a presença de um hotspot de recombinação no íntron 5 do gene *KIR3DL3*;
5. A diversidade genética desse gene é muito superior à já relatada em bancos de dados especializados;
6. A ancestralidade e região de origem do indivíduo está diretamente relacionada com as frequências de alguns alelos e proteínas preditas.