

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**RECEPTOR DE DOPAMINA D4:
ESTUDO DA VARIABILIDADE E EVOLUÇÃO EM POPULAÇÕES AMERÍNDIAS**

LUCIANA TOVO RODRIGUES

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre**

Orientadora: Dr.^a Mara H. Hutz
Co-orientadora: Dr.^a Sidia M. Callegari-Jacques

Porto Alegre, março de 2010

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios 114 e 116 do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo programa Instituto do Milênio e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil).

À minha família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram durante o Mestrado, mesmo quando parecia que nada ia ter uma solução.

Ao meu irmão, André, pela amizade e companheirismo e também pela ajuda com a instalação de “programas de genes”.

À minha orientadora, Mara Hutz, pela dedicação, orientação, apoio, carinho, confiança e, principalmente, por acreditar que seria possível realizar este trabalho.

À minha co-orientadora Sidia M. Callegari-Jacques, pelo apoio, por sempre me incentivar, pelo carinho, pela ajuda com as análises estatísticas e, principalmente, pelos valiosos e sábios conselhos.

Ao professor Francisco Mauro Salzano, pela ajuda e pelo exemplo de cientista e de ser humano.

À Vanessa, pela amizade, por toda ajuda com análises, imagens, artigos, disciplinas, etc., e principalmente pela amizade e pela paciência comigo durante esses dois anos.

Aos meus colegas Júlia, Vinícius e Angélica Oliveira, pela ajuda, pela convivência harmônica e pelos momentos divertidos.

Ao clube do almoço da sala 115: Eve, Gabi, Tati, Angélica Oliveira (de novo), Gláucia, Angélica Baumont e Mari Riek.

Aos colegas e alguns ex-colegas de laboratório: Janaína, Ana Paula, Pietra, Verônica Contini, Verônica Zembrzusi, Shaiane, Guilherme, Elisa, Juliana e Caio, Mariana Botton e Vivian.

Um agradecimento mais que especial à Sandrine, à Tati Gonzales, à Juliana Gonçalves e ao Rodrigo, pela amizade, pelas discussões científicas (e não científicas), e principalmente pela disponibilidade e boa-vontade quando pedi ajuda.

Aos amigos Vanderlei, Andréa Marrero, Tábita, Rafael, Pollyana, Denis, Tony, Dani e Mateus.

Ao Elmo e à Ellen pela dedicação ao Programa e aos alunos, e pela ajuda em todas as horas.

Aos órgãos que financiaram este projeto, e a todos aqueles que ajudaram a torná-lo possível.

Ao Marquito. Obrigada por toda a ajuda com as imagens de artigos, obrigada por sempre confiar no meu trabalho e por sempre me fazer “mirar adelante”. Obrigada pela compreensão e obrigada por existir.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO.....	12
<i>I.1. Considerações gerais.....</i>	<i>13</i>
<i>I.2. Populações ameríndias</i>	<i>14</i>
<i>I.2.1. Caçadores-coletores e agriculturalistas</i>	<i>15</i>
<i>I.2.2. Os Guarani.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2.3. Os Caingang</i>	<i>18</i>
<i>I.3.. Receptor de Dopamina D4</i>	<i>19</i>
<i>I.3.1. O gene</i>	<i>19</i>
<i>I.3.2. A proteína</i>	<i>24</i>
<i>I.3.3. Gene candidato em estudos de associação</i>	<i>26</i>
<i>I.3.4. Estudos populacionais envolvendo o gene DRD4</i>	<i>27</i>
CAPÍTULO II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	34
CAPÍTULO III. <i>Dopamine Receptor D4 Allele Distribution in Amerindians: a reflection of past behavior differences?.....</i>	<i>37</i>
CAPÍTULO IV. DISCUSSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

DRD4 – Receptor de Dopamina tipo 4

GPCRs – receptores acoplados à Proteína G

pb (ou *bp*) – pares de bases (ou *base pair*)

SNP – *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

TDAH (*ADHD*) – Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (*Attention Déficit and Hyperactivity Disorder*)

VNTR – *Variable number of tandem repeats* (número de variações repetidas em tandem).

Ka/Ks – Razão entre as taxas de substituição não-sinônima (Ka) e sinônima (Ks) em sítios polimórficos.

RESUMO

O DRD4 é um dos genes mais variáveis do genoma humano. Seu terceiro éxon contém um polimorfismo do tipo VNTR de 48 pb cujas variantes apresentam uma grande diversidade em populações humanas. Além disso, interno ao VNTR, muitos polimorfismos do tipo SNPs são observados, totalizando 74 diferentes haplótipos descritos em humanos até o momento. O alelo de sete repetições do VNTR é descrito como o mais freqüente em populações nativas da América do Sul e possivelmente esteja sob efeito de seleção positiva. Como o DRD4 tem sido considerado gene candidato em diversos estudos de associação com doenças psiquiátricas e como os nativos da América do Sul constituem um dos três grupos parentais das populações atuais desse continente, é importante que a variabilidade nesse *locus* seja conhecida nessas populações.

Neste estudo foi avaliada a variabilidade genética do terceiro éxon do gene DRD4 em 172 indivíduos das populações Kaingang e Guarani do centro-sul do Brasil. Além disso, o seqüenciamento do alelo 7R foi realizado em indivíduos homocigotos para esse alelo. Foram adicionados os dados da literatura relativos a outras populações para o mesmo polimorfismo objetivando re-avaliar a variabilidade genética deste *locus* na América do Sul. As análises incluíram 18 populações, totalizando 568 indivíduos.

A freqüência do alelo 7R observada nas populações Kaingang e Guarani foi intermediária às observadas em populações amazônicas e às populações nativas da Argentina. A análise dos haplótipos obtidos pelo seqüenciamento revelaram que as populações Kaingang e Guarani-Kaiowá apresentam apenas o haplótipo mais comum na populações mundiais, enquanto que na população Guarani-Ñandeva foram identificados três haplótipos, um deles já descrito exclusivamente nos Suruí. A relação genética por distância D_A indicou que populações classificadas como

caçadoras-coletoras são mais próximas entre si, formando um agrupamento separado das populações classificadas como predominantemente agriculturalistas. Corroborando esses resultados, o Teste Exato de Fisher revelou um excesso de alelos *7R* nas populações predominantemente caçadoras-coletoras quando comparadas às agriculturalistas e a frequência do alelo *7R* apresentou correlação positiva com a latitude, evidenciando uma maior frequência do alelo *7R* no norte, onde estão localizadas a maioria das populações caçadoras-coletoras estudadas.

Nossos resultados apresentam uma evidência indireta da atuação da seleção natural no gene *DRD4*. É possível que esse gene tenha influenciado o comportamento das populações nativo-americanas, tendo sido vantajoso naquelas populações em que o comportamento exploratório e a caça e a coleta foram predominantes. Estudos envolvendo um maior número de populações caçadoras-coletoras ao sul do continente seriam necessários para melhor entender os padrões observados na América do Sul em relação ao *DRD4*.

ABSTRACT

DRD4 is one of the most variable genes in the human genome. Its third exon presents a VNTR polymorphism of 48 bp. Furthermore, SNPs were observed into repeats, composing at least 74 different haplotypes variants until now. The seven repeat (*7R*) allele is the most frequent in South America Amerindian populations and may be under positive selection. DRD4 is a candidate gene for many association studies between psychiatric disorders and genetics. Then, it is important to study the variability of this locus in Amerindian populations because they represent one of three parental groups of admixed populations in South America.

In this study, the genetic variability concerning this locus was studied in 172 subjects from Kaingang and Guarani populations of Brazilian Center-SE. Furthermore, all *7R* homozygous individuals were sequenced. The results were integrated with those published, aiming to re-evaluate DRD4 variability into South America. 18 populations and 568 individuals were integrated to the analysis.

The observed frequency in Kaingang and Guarani populations were intermediate between those reported in the Amazon region and in Argentina. The sequence data revealed that Kaingang and Guarani-Kaiowá were monomorphic showing only the most frequent worldwide haplotype while the Guarani-Ñandeva population was polymorphic for this locus. The D_A genetic distance indicates that the predominantly hunter-gatherer populations were tightly clustered whereas the predominantly agriculturalist populations were more scattered. Fisher Exact Test revealed an excess of the *7R* allele in predominantly hunter-gatherer populations when compared with agriculturalists and a correlation between latitude and *7R* frequency was observed, that indicates that the high frequencies of *7R* are in North, where most of hunter-gatherer populations are located.

Our results suggest indirectly that positive selection could be acting on the DRD4 gene. It is possible that the DRD4 gene have influenced life habits of South American native populations. *7R* could be adaptative in populations with more explorative behavior and with predominantly hunter and gatherer subsistence. Further studies considering larger numbers of hunter-gatherer populations in the south would provide a better interpretation of the genetic variability of the Amerindian populations and clarify the patterns of DRD4 evolution in South America.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

A investigação do passado e dos movimentos migratórios da espécie humana sempre fascinou um grande número de pesquisadores. Esse tema tem motivado investigações em diferentes áreas como antropologia, arqueologia, lingüística e genética. As populações ameríndias têm sido alvo de muitos estudos em todos esses campos.

Na época em que os europeus colonizaram a América do Sul, foi descrita uma ampla diversidade cultural, lingüística e biológica entre as populações indígenas que habitavam o continente. Porém, a violência imposta pelos europeus e as doenças novas trazidas por eles causaram uma dizimação em massa das populações nativas, de maneira que se estima uma redução populacional de 95% (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). Grande parte dessa diversidade foi extinta, porém vários grupos sobreviveram até o presente em relativo isolamento.

Atualmente, no Brasil existem 216 etnias indígenas em diferentes graus de integração com a sociedade nacional (Ricardo, 2000). Entre essas etnias, são faladas 181 línguas, classificadas em 43 famílias lingüísticas. Em relação à língua, estima-se que 85% das originais tenham sido extintas desde que os europeus colonizaram o Brasil (Rodrigues, 2005).

No campo da genética, as populações ameríndias têm sido alvo de inúmeros estudos, que envolvem tanto material genético uniparental quanto autossômico. A redução dos tamanhos populacionais, conseqüência do contato com os europeus, fez com que muitos pesquisadores pensassem que essas populações apresentariam baixa variabilidade genética. Entretanto, com exceção de alguns marcadores como mtDNA e HLA, esta se mostrou elevada, sendo mais marcante entre as populações que dentro delas (Hutz *et al.*, 1999), mas não sendo facilmente explicada por estrutura geográfica e lingüística.

Por meio dessas estimativas de variabilidade genética, é possível identificar as origens de determinada população e compreender sua história evolutiva, sua demografia e peculiaridades genéticas. Além disso, esses estudos permitem também mapear genes de relevância clínica e identificar genes de susceptibilidade a doenças complexas em determinada população, além de serem importantes na investigação forense.

Os estudos genéticos e evolutivos envolvendo populações ameríndias são importantes e têm auxiliado nas investigações antropológicas, arqueológicas e lingüísticas. Essas populações demonstram ser um ótimo modelo para estudos evolutivos, já que muitos grupos são comunidades nas quais suas atividades de subsistência (caça, coleta de alimentos e agricultura incipiente) assemelham-se àquelas prevalentes entre grupos nas primeiras fases da história humana. Além disso, investigações sobre a relação entre estrutura populacional e variabilidade genética também são possíveis uma vez que os grupos geralmente são pequenos, com isolamento relativo e ecologia simples. A informação genética que se tem a respeito dos povos ameríndios até o momento é abundante, entretanto ela é significativamente heterogênea em relação às populações e aos tipos de sistemas genéticos investigados (revisão em Salzano, 2002).

Devido à miscigenação com outros povos as perdas de seus valores culturais e genéticos são inevitáveis. Dessa maneira, os estudos envolvendo esses grupos merecem grande atenção e urgência. O presente estudo se propõe analisar a dinâmica histórica dos povos ameríndios da América do Sul por meio da ferramenta genética, considerando aspectos culturais e geográficos.

1.2. Populações ameríndias

Como mencionado anteriormente, as populações indígenas sul-americanas

exibem uma notável diversidade em seus aspectos culturais, lingüísticos e biológicos. Quando os europeus colonizaram a América do Sul, encontraram populações desde uma organização simples, com hábitos de caça, pesca e coleta e outras, que criaram verdadeiros impérios com a domesticação de animais e plantas.

1.2.1. Caçadores-coletores e agriculturalistas

Mais comumente associadas aos períodos Paleolítico e Mesolítico e a um nível simples de organização social, as sociedades caçadoras-coletoras são aquelas cujos métodos principais de subsistência envolviam: 1) busca por animais e plantas comestíveis diretamente da natureza, e 2) forrageamento e caça sem recursos suficientes para a domesticação de animais e plantas. Além disso, a construção de abrigos envolvia apenas a utilização de materiais disponíveis na natureza, preferencialmente aqueles com pouca necessidade de transformações. Considerando esses fatores, normalmente os recursos de uma área eram rapidamente esgotados, tornando impossível a fixação permanente dos grupos, o que faz com que o caráter nômade seja atribuído à maioria das sociedades caçadoras-coletoras (Burenhult, 1994) .

Essa estratégia de forrageamento foi empregada por mais de dois milhões de anos, até o final do período Mesolítico. O início do período Neolítico foi marcado pelo início de práticas agriculturalistas, empregadas em diferentes áreas, incluindo Ásia, Mesoamérica, Andes, Leste da América do Norte (Smith, 1992). Muitas populações sofreram essa transformação em momentos e com intensidades diferentes, de modo que muitas sociedades nativas atuais combinam as duas estratégias para sobrevivência.

Devido aos seus distintos hábitos de vida, as comunidades nos dois diferentes estágios evolutivos apresentavam diferentes dinâmicas populacionais e também

diferentes condições de saúde. Em comunidades tribais de caçadores-coletores com agricultura rudimentar, o tamanho da população era pequeno, havia alta mobilidade ao longo de seu território, o isolamento entre grupos era grande e a densidade populacional era baixa, o que determina um grau médio de estabilidade populacional. A fecundidade e a mortalidade eram moderadas, os padrões de habitação eram uniformes, a atividade física era intensa, a dieta era diversificada e a mobilidade de grupos familiares e/ou deslocamento de comunidades inteiras dificultavam o acúmulo de detritos prejudiciais à saúde pública. Assim, as epidemias, infecções parasitárias intestinais, doenças crônicas e degenerativas, exposição a substâncias tóxicas e introdução de novas doenças eram eventos raros (Salzano e Callegari-Jacques, 1988; Salzano e Hutz, 2005).

Esta situação alterou-se dramaticamente após o contato com a sociedade envolvente e a passagem para um padrão de vida rural. A agricultura tornou-se a atividade dominante e a alimentação menos variada, com a dependência de uma ou poucas plantas comestíveis. O aumento do tamanho populacional devido à agregação dos pequenos grupos, aliado à falta de condições sanitárias eficientes, facilitou a ocorrência de epidemias. As infecções parasitárias intestinais tornaram-se comuns e aumentou a exposição a substâncias tóxicas. A fertilidade aumentou, uma vez que era necessário mais pessoas para auxiliar nas práticas agrícolas, mas, devido aos problemas de saúde, a mortalidade também era alta (Salzano e Callegari-Jacques, 1988; Salzano e Hutz, 2005).

Essas dinâmicas populacionais e características diferentes refletem-se em suas peculiaridades genéticas e evolutivas. Grupos de caçadores-coletores parecem evoluir sob o modelo de “fissão-fusão” (Neel and Salzano 1967). De acordo com esse modelo, o aumento do tamanho populacional e a tensão social existente nas comunidades fariam com que elas se subdividissem. Após a fissão, o grupo migrante poderia se juntar a outra população, se juntar novamente com o grupo de origem ou formar outra vila, o que gera cruzamentos entre migrantes e não migrantes. Assim, a unidade de difusão seria composta por indivíduos relacionados,

e as distâncias geográficas que separam as populações não seriam importantes. O aumento do crescimento populacional e do sedentarismo nestes grupos teria reduzido os efeitos de deriva genética e aumentado o fluxo gênico entre grupos locais (o endocruzamento seria mais freqüente que o cruzamento entre diferentes populações), contribuindo assim, para a formação do reservatório genético regional (Malhi *et al.*, 2002). Assim, os modelos de ilhas e de isolamento por distância são mais verossímeis às estruturas populacionais das comunidades agriculturalistas, pastoralistas e industrializadas (Wright, 1943, Salzano, 2009).

1.2.2. Os Guarani

Os Guarani eram originários das florestas da região sudoeste da Amazônia e migraram em direção ao sul durante os séculos XVI-XVIII. Eles se distribuíram por toda a bacia do Prata, atingindo Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia (Schaivetto, 2003).

Lingüísticamente definidos como parte do tronco Tupi (Campbell, 1997), caracterizam-se fenotipicamente por sua estatura media/baixa, rosto largo, cabelos lisos e olhos pretos (Lazarotto, 1978). Eles começaram a desenvolver a agricultura a partir do século XVI, principalmente com a mandioca, um dos alimentos básicos de sua dieta, complementada por caça, pesca e coleta de frutas e raízes.

Os Guaranis do Brasil meridional podem ser divididos em três subgrupos considerando localização, diferenças lingüísticas e peculiaridades da cultura material e não-material: Ñandeva, Kaiowá e M'Byá (Schaden, 1962).

O subgrupo Ñandeva distribui-se principalmente ao longo do extremo sul do estado do Mato Grosso, nas aldeias Jacareí e Porto Lindo. O subgrupo Kaiowá também está localizado ao sul do Mato Grosso (em aldeias como Dourados, Panambi, Taquapiri, Amambaí entre outras) e às regiões contíguas do Paraguai. O

terceiro grupo, M'Byá, ocupava a maior parte do território que hoje compreende o Estado do Rio Grande do Sul (Kern *et al.*, 1993; Flores, 2003). Atualmente existe uma série de aldeias M'Byá, em áreas de reserva no oeste de Santa Catarina e Paraná, no leste paraguaio e também na porção setentrional da Argentina e Rio Grande do Sul (Schaden, 1962).

Em 1603, os padres jesuítas fundaram a primeira redução jesuítica Guarani no noroeste do Rio Grande do Sul, que incluía também territórios do Uruguai, Paraguai e Argentina. Nestas reduções, milhares de índios Guaranis foram catequizados. Porém, o declínio da população se deu por motivos similares àqueles que acometeram a outras populações nativas como novas doenças de origem européia, os ataques dos bandeirantes, a guerra guaraníca, a escravidão imposta pelo governo militar durante o período após a expulsão dos jesuítas e a mestiçagem das mulheres Guaranis com os homens não-índigenas (Flores, 2003).

Atualmente, os Guarani vivem em reservas indígenas, conservando alguns traços culturais como a língua, algumas cerimônias religiosas e outros hábitos (Martins, 1992).

1.2.3. Os Caingang

Pertencentes à porção meridional da família lingüística Jê (Campbell, 1997), os índios Caingang juntamente com os Guarani são as duas tribos mais numerosas do sul do Brasil. No Rio Grande do Sul, os Caingang constituem o grupo mais numeroso e caracterizam-se por apresentar aspecto mongolóide, estatura mediana, rosto oval, nariz achatado, pele bronzeada e cabelo liso (Lazzarotto, 1978).

Viviam em pequenos grupos formados por famílias entrelaçadas nas matas situadas nos locais mais altos do Planalto rio-grandense, em meio aos pinheirais (Becker, 1995; 1999). Eram coletores, caçadores, pescadores e horticultores. A

sobrevivência se dava por meio de colheita especialmente de pinhão, mas também do mel e frutos silvestres. A caça e a pesca eram praticadas com dardo e flechas (Becker, 1995). Entretanto, os indivíduos da população Caingang estudados neste trabalho já sugeriam um hábito de vida sedentário e foram classificados como predominantemente agricultores por Salzano & Callegari-Jacques (1988). As sociedades apresentavam divisão de trabalho por sexo e a estrutura social era a partir das famílias que mantinham certa estabilidade. O poder de governar dentro da tribo era irrestrito (Becker, 1995).

Foram dizimados pelas epidemias de origem européia e africana e pela ação de bandeirantes e *bugreiros* que recebiam pagamento por índio morto. Os índios não-guaranis sobreviventes nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (antes conhecidos como Guaianá ou Coroados) receberam o nome de Caingang por Telêmaco Morcines Barbosa, em 1882. Assim, foram agrupados todos aqueles grupos que lingüística e culturalmente formavam o ramo meridional da Família Jê (Becker, 1995. Flores, 2003).

Atualmente os Caingang encontram-se reduzidos numericamente e com uma aculturação muito mais proeminente devido ao contato com o europeu. Muitos dos seus valores e costumes foram extintos enquanto outros permaneceram, embora com modificações. Eles encontram-se distribuídos em reservas indígenas sobre o seu antigo território (São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Do total, aproximadamente 11.000 vivem no Rio Grande do Sul (Ricardo, 2000).

1.3. Receptor de Dopamina D4

1.3.1. O gene

O gene do receptor de dopamina humano D4 (DRD4) é importante foco de estudos nos campos da neurologia, psiquiatria, psicologia, endocrinologia e

farmacologia. Em humanos, esse gene é composto por quatro éxons e está localizado no cromossomo 11 (11p.15.5) (Gelernter *et al.*, 1992; Petronis *et al.*, 1993). Ele é expresso principalmente no córtex pré-frontal, divisão cognitiva cingulada anterior e em regiões límbicas do cérebro, ou seja, em regiões do cérebro importantes na cognição, atenção e emoção (Durston *et al.*, 2005).

Contendo diversos polimorfismos em sua extensão, é um dos mais variáveis no genoma (Figura 1). Entretanto, são poucos os polimorfismos freqüentemente estudados. Um deles é a duplicação de 120bp na região 5', localizada a 1,2 Kb do ponto de início da tradução do gene (Seaman *et al.*, 1999). O alelo longo relativo a esse polimorfismo apresenta uma atividade reduzida quando comparado ao alelo curto (D'Souza *et al.*, 2004). Na região promotora do gene está localizado outro polimorfismo, do tipo SNP (substituição -C521T), que também mostrou ser funcional, de maneira que o alelo T reduz os níveis de transcrição do gene (Okuyama *et al.*, 1999). Outra região polimórfica de importância por seu possível papel na tradução do receptor corresponde a uma porção do éxon 1. São os seguintes polimorfismos: um VNTR de 12 pb que pode variar de 1 a 3 repetições (Catalano *et al.*, 1993; Seaman *et al.*, 2000) e uma deleção de 21 pb (Cichon *et al.*, 1995) (figura1).

Entretanto, a maior parte dos estudos com o gene DRD4 envolve um polimorfismo situado no terceiro éxon, no qual são encontradas diferenças de comprimentos dos alelos devidas a um número variável de repetições em tandem (VNTR) de 48 pares de bases. Essa região, que é o foco deste estudo, codifica um domínio rico em prolina que corresponde a uma porção da terceira alça citoplasmática do receptor de dopamina D4 (Asghari *et al.*, 1995) (figura 1).

DRD4

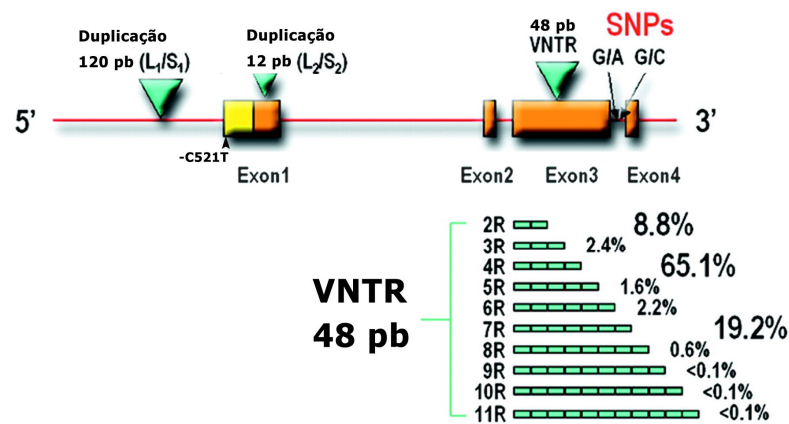


Figura 1: Esquema da estrutura do gene DRD4 e seus polimorfismos mais estudados no promotor, região 5', éxon 1 e éxon 3. Adaptado de Wang *et al.* (2004).

Em humanos são descritas variantes contendo de 2 a 11 repetições (Chang *et al.*, 1996), algumas delas com diferenças funcionais. O alelo de 4 repetições apresenta uma atividade ótima de resposta à dopamina, enquanto o alelo 7R, uma atividade reduzida. Posteriormente, SNPs internos ao VNTR foram descobertos, o que evidenciou a existência de diferentes unidades de repetições de 48pb (motivos), como apresentado na figura 2. Até o momento, foram descritos 35 motivos, que podem ser combinados de maneira diversa e originar 74 diferentes haplótipos, que são nomeados de acordo com a seqüência dos motivos e o tamanho do alelo (número de motivos) (Ding *et al.*, 2002; Grady *et al.*, 2003, 2005; Hattori *et al.*, 2009). Os primeiros 19 motivos apresentados na figura 2 foram descritas por Lichter *et al.* (1993) e foram identificadas com letras gregas. Porém, dada a diversidade observada posteriormente por Ding *et al.* (2002), esses motivos foram renomeados e passaram a ser identificados pela numeração indo-arábica. Muitas das mutações que definem um motivo são substituições não-sinônimas, que causam alterações nos resíduos de aminoácidos da alça citoplasmática.

Os diversos haplótipos são originados por eventos de recombinação desigual agregados a eventos de mutação, o que faz com que surjam novas unidades de repetição. Estima-se que o alelo ancestral em humanos tenha sido o *4R*. Através de eventos de recombinação entre dois alelos *4R*, teria se originado um alelo *7R*. Este, em outro evento de recombinação com o alelo *4R*, teria dado origem ao alelo *2R*. Por exemplo, estima-se que para criar o haplótipo mais freqüente *7R* (1-2-6-5-2-5-4), pelo menos um evento de recombinação entre dois alelos *4R* com haplótipo mais freqüente *4R*(1-2-3-4) e seis eventos de mutação teriam sido necessários (Ding *et al.*, 2002). Devido aos eventos de recombinação, a diversidade haplotípica em alelos com maior número de repetições é maior do que nos menores (Ding *et al.*, 2000; Grady *et al.*, 2003, 2005).

1.2.2. A proteína

Os receptores do tipo D2 (DRD2, DRD3 e DRD4) pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G e se caracterizam por uma inibição da função da Adenil Ciclase por intermédio daquela proteína. Os receptores da classe D2 compartilham uma homologia relativamente alta, sendo caracterizados por sete domínios hidrofóbicos (alfa-hélices de aproximadamente 25 aminoácidos cada) que atravessam a membrana plasmática (Oak *et al.*, 2000).

A resposta à dopamina é realizada por meio do acionamento de múltiplos efetores intracelulares. De uma maneira geral a dopamina, ao se ligar ao receptor, ativa a subunidade inibitória da proteína G, inativa a Adenil Ciclase e determina a baixa concentração de AMPcíclico na célula. Com isso há uma redução da atividade da Proteína Quinase A (PKA), gerando, conseqüentemente, alterações na fosforilação de fatores de transcrição e alterações na expressão de genes envolvidos na resposta à dopamina (Oak *et al.*, 2000; Aguirre-Samudio e Nicolini 2005).

Como o principal mecanismo de resposta do receptor de dopamina D4 à dopamina se dá por meio da interação com a proteína G e como o VNTR de 48pb altera o tamanho da terceira alça citoplasmática, que interage diretamente com a subunidade alfa-inibitória dessa proteína, estudos bioquímicos foram realizados para determinar o possível efeito funcional das repetições. Estudos *in vitro* usando células ovarianas de camundongos revelaram que a potência da dopamina para inibir a formação de AMP cíclico seria reduzida de duas a três vezes no alelo com sete repetições quando comparado com o de quatro repetições, e o alelo 2R apresentaria uma funcionalidade intermediária entre o 7R e o 4R (Asghari *et al.*, 1995). Assim, o alelo 7R teria uma menor resposta à dopamina quando comparado aos alelos 2R e 4R.

Além disso, as regiões do VNTR e seu entorno são ricas em prolina e contém múltiplas cópias do motivo PXXP (P=prolina, X=qualquer resíduo de aminoácido), que é considerado o núcleo da seqüência consenso para ligação de domínios SH3 (Src homology 3). Essas regiões SH3 são reconhecidas como domínios modulares de ligação para interação proteína-proteína essenciais para atividades celulares. Assim, é possível que essa região do receptor D4 possa interagir com uma variedade de proteínas contendo esse domínio (Oldenhof *et al.*, 1998). Dado que a região polimórfica do VNTR pode afetar o número de domínios de ligação SH3 presentes no receptor D4 e dado que os diferentes haplótipos apresentam mutações não-sinônimas, é possível que interações proteína-proteína com essa região possam apresentar diferenças funcionais entre os receptores de diferentes tamanhos e haplótipos da proteína.

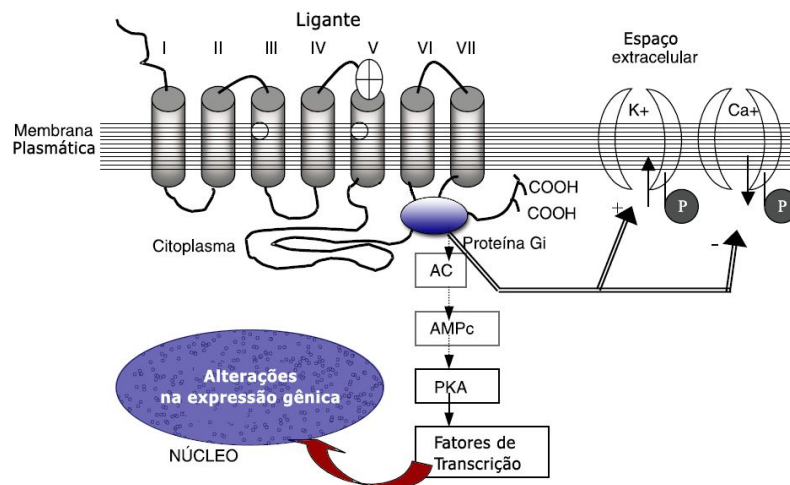


Figura 3: Esquema do Receptor de Dopamina D4 e sua função fisiológica. Os cilindros representam os domínios transmembrana I, II, III, IV, V, VI e VII. A elipse na porção transmembrana V ilustra a dopamina enquanto aquela entre a terceira e quarta alças citoplasmáticas representa o sítio de interação com a proteína G. A ligação de dopamina ao Receptor D4 ativa a proteína Gi que inibe a formação de adenil ciclase (AC), AMP cíclico e proteína Quinase A (PKA). As setas indicam as vias de ativação dos canais de Potássio (K⁺) e de Cálcio (Ca⁺⁺) fosforilados (P). Modificado de Aguirre-Samudio e Nicolini (2005).

1.2.3. Gene candidato em estudos de associação

O gene DRD4 por ser expresso em regiões cerebrais associadas a atenção, emoção e cognição e por participar da rota dopaminérgica (alvo de diversos fármacos como metilfenidato, levodopa, haloperidol, clozapina, risperidona, entre outros), têm sido objeto de diversos estudos de associação com transtornos psiquiátricos. A região do VNTR, por apresentar diferenças funcionais em relação aos seus alelos, é o principal polimorfismo estudado.

O trabalho realizado por Ebstein *et al.* (1996) foi o precursor para estudos de associação entre o DRD4 e psicopatologias. Como a dimensão de personalidade “busca de novidades” é predominante em indivíduos com relatos de abuso de drogas e em indivíduos com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), por exemplo, diversos estudos de associação entre esse polimorfismo e psicopatologias foram conduzidos. Dessa forma, o mecanismo molecular que vincula o alelo 7R com essa dimensão de personalidade estaria possivelmente relacionado com a alteração que as repetições induzem no terceiro éxon do gene. Assim, o alelo 7R codificaria um receptor menos sensível à dopamina, de maneira que o circuito mesocortical dopaminérgico se mostraria menos eficiente em facilitar a ativação do córtex pré-frontal (Carrasco *et al.*, 2004).

Foi estudada, com resultados negativos e positivos, a associação desse *locus* com tendências de impulsividade e/ou de hiperatividade (Rowe *et al.*, 1998; Swanson *et al.*, 1998), TDAH (revisão em Gizer *et al.*, 2009), esquizofrenia (Mitsuyasu *et al.*, 2007; Lung *et al.*, 2009), alcoolismo (Bau *et al.*, 1999; Roman *et al.*, 1999), surtos psicóticos e transtorno bipolar e esquizofrenia (Aguirre *et al.*, 2007, Serretti *et al.*, 2004).

1.2.4. Estudos populacionais envolvendo o gene DRD4

Os estudos populacionais envolvendo o gene DRD4 variam desde estudos de associação entre o VNTR do terceiro exon e doenças a estudos que visam a determinar a frequência alélica em populações nativas e seus aspectos históricos.

As frequências desse polimorfismo em indivíduos pertencentes a grupos controles e/ou a indivíduos com algum transtorno foram descritas em populações dos Estados Unidos (Loo *et al.*, 2008), Alemanha (El-Faddagh *et al.*, 2004), Chile (Carrasco *et al.*, 2004), Brasil (Roman *et al.*, 2001), Irlanda (Hawi *et al.*, 2000), Israel (Eisenberg *et al.*, 2000), Reino Unido (Holmes *et al.*, 2000), China (Qian *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2005), Holanda (Bakker *et al.*, 2005), Índia (Bhaduri *et al.*, 2006), Japão (Hattori *et al.*, 2009) e México (Aguirre *et al.*, 2007). Entretanto, o número de estudos envolvendo populações nativas e sua história é menor.

Chang *et al.* (1996), em um estudo envolvendo 36 populações mundiais, 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 (frequência média de 65%). Os outros alelos mais comuns são o 7R (19%) e o 2R (9%) enquanto os demais somam apenas 7%. O 7R variou de 0 a 78%, sendo o mais prevalente nas populações ameríndias da América do Sul e praticamente ausente nas populações asiáticas. Já o alelo 2R é mais prevalente na Ásia (30 - 40%) que nas outras populações, sendo raro, por sua vez, nas populações ameríndias (Chang *et al.*, 1996; Hutz *et al.*, 2000). Esse polimorfismo foi também investigado em populações da Rússia (Borinskaia *et al.*, 2004) da Índia (Ghosh e Seshadri, 2005), da China (Ding *et al.*, 2000) e do Paquistão (Mansoor *et al.*, 2008). Em brasileiros, a distribuição desse polimorfismo em afro e euro-descendentes do sul foi descrita por Roman *et al.* (1999).

Hutz *et al.* (2000) estudaram cinco populações nativas 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. Posteriormente Marignac e Bianchi (2006) investigaram populações nativas chaquenhas e patagônicas da Argentina e descreveram outro perfil de freqüências alélicas, sendo o alelo *4R* mais freqüente do que o encontrado anteriormente (Chang *et al.*, 1996; Hutz *et al.*, 2000).

Porém, diferentemente dos tamanhos dos alelos, a maioria dos haplótipos considerando os SNPs internos ao VNTR não podem ser definidos geograficamente. Lichter *et al.* (1993) realizaram o primeiro estudo de seqüenciamento dessa região do DRD4. Eles observaram 25 diferentes haplótipos, compostos pela combinação de 19 diferentes repetições de 48pb. Os alelos *4R* e *7R* encontrado mais frequentemente nas populações em geral e principalmente nos europeus apresentava a composição de SNPs que determina os haplótipos *4R(1-2-3-4)* e *7R(1-2-6-5-2-5-4)*, respectivamente. Essas duas variantes foram observadas na totalidade dos alelos seqüenciados da população Maya e dos nativos Colombianos (grupo lingüístico Guahibo) investigados. Quatro outras variantes haplotípicas foram vistas raramente nos 60 cromossomos europeus seqüenciados e não observados em nenhuma outra população.

Ding *et al.* (2002), complementando o trabalho realizado por Lichter *et al.* (1993), seqüenciaram 600 alelos de indivíduos pertencentes aos principais grupos étnicos. Esses pesquisadores descreveram 31 haplótipos diferentes além dos 25 observados anteriormente (Lichter *et al.*, 1993). Alguns haplótipos população-específicos foram encontrados. Entre eles estão os alelos *2R(30-4)* e *7R(1-2-6-5-2-5-19)*, observados somente na população Suruí (nativa da América do Sul); alelo *5R(1-3-2-3-4)*, exclusivo de chineses, e alelos *3R(1-11-33)* e *7R(1-2-6-5-13-5-4)*, exclusivos da população Nasioi (nativa do Pacífico). Estudos mais recentes realizados com indivíduos portadores de TDAH e de autismo revelaram que indivíduos com o primeiro transtorno exibem um excesso de variantes raras (principalmente no alelo *7R*) quando comparadas às variantes descritas na população em geral e em autistas (Lichter *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 2002, Grady *et al.*,

2005), o que sugere que variantes raras possam ser específicas ao TDAH. Entretanto, nenhum estudo bioquímico foi realizado até o momento para descobrir se as variantes raras exibem funcionalidade diferencial.

A diversidade alélica observada dentro do alelo de 4 repetições e a ausência de desequilíbrio de ligação com marcadores próximos sugerem que esse alelo é uma variante comum em humanos há muito tempo. O alelo *7R* teria se originado por eventos de recombinação e mutação recentes (estima-se que seja de 5 a 10 vezes mais recente que o alelo *4R*). O fato de o alelo *7R* ter aumentado a sua frequência em tão pouco tempo, encontrar-se em forte desequilíbrio de ligação com os polimorfismos ao seu entorno (proporcional à distância do VNTR, diferentemente dos alelos *2R* e *4R*; figura 4) e apresentar valores de k_a/k_s elevados em relação aos outros alelos sugerem que esse alelo tenha evoluído por seleção positiva. Porém a possível vantagem adaptativa conferida por esse alelo não seria a mesma em todas as populações, o que justificaria a distribuição desigual das frequências nas populações estudadas (Ding *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

e dimensão de personalidade busca de novidades, hiperatividade e comportamentos de risco (Benjamin *et al.*, 1996, Ebstein *et al.*, 1996, LaHoste *et al.*, 1996, Castro *et al.*, 1997, Hamer, 1997, Ono *et al.*, 1997, Smalley *et al.*, 1998, Swanson *et al.*, 1998). Assim, comportamentos exploratórios seriam adaptativos em sociedades migratórias porque eles permitiriam uma exploração de recursos mais eficaz em ambientes novos. Segundo (Jensen *et al.*, 1997) alguns sintomas do TDAH teriam sido adaptativos nessas sociedades. Para garantir a sobrevivência elas teriam que ser:

1. hipervigilantes, ou desatentos, incluindo a habilidade de captar e integrar as informações do ambiente enquanto está ciente de todos processos que ocorrem concomitantemente. A atenção focada em alguns dos processos poderia ser perigosa pelo desconhecimento de aproximação de animais e de inimigos, por exemplo. A velocidade em mapear o ambiente também seria importante;
2. impulsivos, sendo rápidos para fugir ou atacar;
3. hiperativos, procurando alimentos, se movendo para locais com temperaturas mais agradáveis e para outros ambientes quando os recursos acabam.

Sociedades sedentárias, por outro lado, não obtêm recursos por exploração de novos ambientes, mas desenvolvem métodos intensivos para o uso dos recursos de um espaço limitado (Netting 1993). Nestas sociedades, a dimensão busca por novidades e os comportamentos exploratórios acarretariam custos sociais e seriam selecionados negativamente. Dessa maneira, alguns transtornos psiquiátricos contemporâneos, como o TDAH, seriam um subproduto da adaptação humana ao processo migratório (Jensen *et al.*, 1997). Os componentes anteriormente adaptativos desse transtorno, como altos níveis de hiperatividade, desatenção e impulsividade, se tornaram problemáticos nas sociedades modernas.

Entretanto, a única sugestão da vantagem adaptativa do alelo *7R* em populações caçadoras-coletoras, além do trabalho de Chen *et al.* (1999), foi feita por

Eisenberg *et al.* (2008). Neste estudo foi avaliada a frequência do alelo 7R na população africana Ariaal, comparando grupos nômades e recentemente sedentários. Os autores observaram que esse alelo estava associado com melhores índices nutricionais, como aumento de massa magra e maior índice de massa corpórea, entre os nômades, e piores índices entre sedentários.

A outra hipótese leva em consideração a seleção sexual. Os portadores do alelo 7R poderiam ter uma vantagem adaptativa por apresentarem comportamentos que o levariam a se reproduzir mais, como a procura de muitas mulheres, ou eles poderiam apresentar uma vantagem reprodutiva nas sociedades que apresentam competição intrasexual (Harpending e Cochran 2002). Os autores propõem essa hipótese com base na existência de dois tipos de sociedades classificadas por características sexuais e cuidado com a prole. As “dad” (do inglês, paternais) e as “cad” (do inglês, grosseiras). Nas sociedades do tipo “cad” os homens, por não terem relação pública com as mulheres e nem se preocuparem com cuidados com a prole, ocupam seu tempo com adornos, preparativos para festas, rituais e guerras, enquanto nas sociedades “dad” os homens trabalham para prover alimento para a prole, reduzindo o tempo para preparativos para guerras. Esta hipótese também está intrinsecamente ligada ao hábito de vida das populações. Nas populações caçadoras-coletoras exclusivas, antes da agricultura (classificadas como dad), ambos homens e mulheres proviam sustento e carinho à prole e a violência entre homens não era uma constante. Nestas sociedades, o alelo 7R teria uma vantagem limitada, exceto naqueles nichos onde a abundância de recursos permitisse a competição intrasexual. Um exemplo desse tipo de sociedade é a !Kung Bushmen, do sudeste da África, que apresenta baixa frequência do alelo 7R.

Com o surgimento das técnicas iniciais de agricultura, outro tipo de sociedade emerge, nas quais as mulheres proveriam alimento à prole, enquanto os homens, livres da responsabilidade doméstica e em um ambiente de agressão e competição masculina, ocupariam seu tempo com ornamentações e preparativos para novos ataques. Essas sociedades seriam estáveis uma vez que os confrontos frequentes e

as guerras restringiriam o crescimento populacional. Nesse tipo de sociedades “cad” de corte, de agressão e de competição entre homens os indivíduos com o alelo *7R* teriam tido mais sucesso. São exemplos de sociedades cad as populações ameríndias das terras baixas da América do Sul e as populações do das terras altas da Nova Guiné.

Entretanto, com o estabelecimento de políticas poderosas que permitiram o crescimento populacional e forçaram a intensificação agrícola, o espaço de terras se tornou escasso e os homens foram forçados a prover alimento às suas famílias. Assim, as sociedades voltam a ser classificadas como “dad” e possuir o alelo *7R* não apresentaria novamente uma vantagem. Um exemplo seria a ausência do alelo *7R* no leste asiático, onde a intensificação da agricultura teria levado à perda do alelo *7R* por não conferir uma vantagem adaptativa para os homens portadores.

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

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.

Apesar de Chen *et al.* (1999) terem observado uma correlação entre macro-migração e o alelo 7R, o mesmo não foi observado por esses pesquisadores para a micro-migração na América do Sul. A possível razão seria o baixo número de populações investigadas (6). Assim, o acúmulo de dados provenientes da análise molecular do gene DRD4 permitirá uma ampliação do conhecimento da estrutura genética, além de esclarecer os processos microevolutivos que ocorrem nessas populações.

Este trabalho tem como objetivo estimar a variabilidade da região de VNTR do exon III do gene DRD4 em populações nativas da América do Sul.

São objetivos específicos deste trabalho:

2.1 - Verificar a variabilidade do VNTR de 48pb do gene DRD4 em três populações ameríndias sul-americanas: Guarani-Ñandeva, Guarani-Kaiowá e Caingang.

2.2 – Analisar as relações genéticas entre essas três populações e outras nativas sul-americanas descritas na literatura para o mesmo polimorfismo,

procurando responder à seguinte questão: Poderia a possível vantagem do alelo *7R* em populações caçadoras-coletoras ter influenciado na distribuição alélica e na evolução de populações nativo-americanas?

2.3 - Descrever a variabilidade nucleotídica na seqüência do VNTR de 48pb do gene DRD4 nas populações ameríndias genotipadas.

2.4 – Comparar a variabilidade dentro e entre os diferentes grupos partir dos haplótipos obtidos.

CAPÍTULO III

Dopamine Receptor D4 Allele Distribution in Amerindians: a reflection of past behavior differences?

Manuscrito submetido à revista American Journal of Physical Anthropology



Dopamine Receptor D4 Allele Distribution in Amerindians: a reflection of past behavior differences?

Journal:	<i>American Journal of Physical Anthropology</i>
Manuscript ID:	AJPA-2010-00032
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	28-Jan-2010
Complete List of Authors:	Tovo-Rodrigues, Luciana; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Genetica Callegari-Jacques, Sidia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Genetica; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Estatistica Petzl-Erler, Maria Luiza; Unversidade Federla do Parana, Genetica Tsuneto, Luiza; Universidade Estadual de Maringa, Genetica Salzano, Francisco; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genetica Hutz, Mara; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Genética
Key Words:	DRD4, VNTR, Amerindian populations, selection



1
2
3 **Dopamine Receptor D4 Allele Distribution in Amerindians: a reflection of past behavior**
4
5 **differences?**
6
7
8
9

10 Luciana Tovo-Rodrigues,¹ Sidia M. Callegari-Jacques,^{1,2} M. Luiza Petzl-Erler L,³ Luiza
11
12 Tsuneto,³ Francisco M. Salzano,¹ and Mara H. Hutz¹.
13
14
15
16

17 ¹*Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053,*
18 *91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*
19

20 ²*Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale,*
21 *91509-900 Porto Alegre, RS, Brazil*
22

23 ³*Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19071, 81531-*
24 *990 Curitiba, PR, Brazil*
25
26
27
28
29
30
31
32

33 Corresponding author:

34 Mara H. Hutz

35 Departamento de Genética, UFRGS

36 Caixa Postal 15053

37 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

38 Tel: 55 51 3308 6720

39 Fax: 55 51 3308 7311

40 E-mail: mara.hutz@ufrgs.br
41
42
43
44
45
46
47

48 Running title: DRD4 VARIABILITY IN SOUTH AMERINDIANS
49

50 Grant sponsor: Institutos do Milênio; Grant sponsor: Programa de Apoio a Grupos de Excelência; Grant sponsor:

51 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grant sponsor: Fundação de Amparo à
52

53 Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul;
54

55 Number of pages: 19
56
57
58
59
60

ABSTRACT

The *DRD4* variable number of tandem repeats (VNTR) allele distribution of 172 Guarani (Kaiowá and Nandeva subgroups) and Kaingang Brazilian Amerindians is reported. These results were integrated with those previously obtained for this ethnic group. Allele frequencies for the three populations are within the interval observed for 15 other Native American populations and showed intermediate values between those observed in Amazonia and Patagonia. Significant differences in allele distribution between recent past hunter-gatherer and agriculturalist populations were observed, with an increase of the 7R allele among hunter-gatherers ($P < 0.001$). Analysis of molecular variance (AMOVA) and pairwise F_{ST} data suggest three distinct sectors for the genetic landscape of Native South America: Andes, Center/Southeast region, and Amazonia. Common traits among hunter-gatherers such as novelty-seeking temperament, hyperactivity and impulsivity could have been important and advantageous in new environments during America's prehistoric colonization.

KEY WORDS: DRD4, VNTR, Amerindian populations, selection, genetic structure.

1
2
3
4
5
6
7
8 The Dopamine Receptor D4 (*DRD4*) gene is one of the most variable in the human
9 genome, most of its variability being restricted to exon III. This hypervariable region contains
10 an expressed variable number tandem repeats (VNTR) of 48bp and differences of single
11 nucleotide polymorphism (SNPs) inside these repeats (Lichter et al., 1993; Ding et al., 2002;
12 Grady et al., 2003, 2005; Hattori et al., 2009). In humans the VNTR variability in this region
13 ranges from 2 to 11 repeats. The four repeats (*4R*) allele is the most common in world
14 populations and has been identified as the conserved ancestral allele (Wang et al., 2004). The
15 next most frequent alleles are those with seven repeats (*7R*) and two repeats (*2R*) while all the
16 others are rare. The *7R* frequency varies from 0 to 78%; it is most prevalent in South
17 Amerindians and virtually absent in Asian populations (Chang et al., 1996; Hutz et al., 2000;
18 Marignac and Bianchi, 2006).

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34 SNPs within repeats were also described, forming 35 sequence variants of the 48bp
35 repeat unit (motifs). They form at least 74 unique different haplotypes (Lichter et al., 1993;
36 Chang et al., 1996; Ding et al., 2002; Grady et al. 2003,2005; Hattori et al., 2009). The most
37 common *7R* haplotype is designated as 1-2-6-5-2-5-4, and is observed in several populations
38 (Ding et al., 2002). Data for Amerindians are restricted to Colombian natives, Maya and Surui
39 (Lichter et al., 1993; Ding et al., 2002). Ding et al. (2002) described a Surui exclusive
40 haplotype (1-2-6-5-2-5-19).

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51 Biochemical analysis has demonstrated that the *7R* protein has a three-fold blunted
52 ability to reduce forskolin-stimulated cAMP levels, as compared to the *4R* protein (Asghari et
53 al., 1995). This allele has been also associated with a novelty-seeking personality dimension
54 (Ebstein et al., 1996; Sullivan et al., 1998), impulsivity and hyperactivity (Rowe et al., 1998;
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Swanson et al., 1998; Roman et al., 2001), and attention deficit hyperactivity disorder
4
5 (ADHD; Gizer et al. 2009). High linkage disequilibrium with neighboring markers, high
6
7 values of K_a/K_s , and a rapid increase in its frequency suggest that the *7R* allele is recent and is
8
9 under the influence of selection (Ding et al. 2002; Wang et al., 2004). It has been estimated
10
11 that it arose prior to the Paleolithic era, between 40,000 and 50,000 years ago, and may have
12
13 been important in different occasions in human evolution, as during the out of Africa exodus
14
15 (Ding et al. 2002). Suggestions have been made that exploratory behaviors could have been
16
17 adaptive in migratory societies, allowing for more successful exploitation of resources of
18
19 particular environments. A positive correlation between the *7R* allele frequency and distance
20
21 traveled by the populations was described (Chen et al. 1999). The high frequency of this allele
22
23 in South America could be explained by an initial bottleneck during the entry process, but an
24
25 advantageous behavior of the *7R* in a new environment cannot be discarded. One possibility is
26
27 that *7R*, would have a differential role in Native Americans, possibly related to the hunter-
28
29 gatherer way of life. Resource-depleted, or rapid changing environments might select for
30
31 individuals with “response ready” adaptations (traits related with novelty seeking personality
32
33 and ADHD), whereas resource-rich, or little changes in environments might select against
34
35 such adaptations (Jensen et al., 1997; Williams and Taylor, 2006).
36
37
38
39
40
41
42

43 Another hypothesis, related to mating strategies and subsistence, could also explain the
44
45 *7R* allele distribution. Male *7R* bearers might have advantage in hunter-gatherer populations,
46
47 in which competition and violence among males are frequent and females provide subsistence
48
49 to the family. Societies like that are classified as “cad” and occur in lowland South America
50
51 and highland New Guinea. Agriculturalist societies are classified as “dad” because males and
52
53 females contribute equally to son and/or daughters’ survival. In these populations, where
54
55 competition among males is almost inexistent, *7R* would not confer fitness to its bearers
56
57
58
59
60

1
2
3 (Harpending and Cochran, 2002). Only one study has attempted to test the selection
4
5 hypothesis. In the Ariaal African population, 7R allele was associated with indices of better
6
7 nutritional status among nomads, and worse indices in the sedentary context (Eisenberg et al.
8
9 2008).

10
11
12 At present, 15 South Amerindian populations were studied for this locus. Chang et al
13
14 (1996) and Hutz et al. (2000) studied Amazonian populations and reported 7R allele as the
15
16 most frequent allele. However, Marignac and Bianchi (2006) found that 4R has the highest
17
18 frequency in native populations of the Argentinian Chaco and Patagonia regions.
19

20
21
22 Since *DRD4* was considered a candidate gene for some psychiatric disorders observed
23
24 in South American admixed populations, it is important to describe its variability in American
25
26 natives, one of the parental groups of these populations. Data on the genetic variation of
27
28 candidate genes in populations with diverse ethnic origins are important to understand the
29
30 impact of ethnic heterogeneity in different pathologies. Considering the large number of
31
32 indigenous groups in Brazil, the amount of *DRD4* information in them is scarce, and for the
33
34 central-south is absent. Therefore, we decided to study three central-southern Brazilian
35
36 populations. These results were integrated with published information, trying to answer the
37
38 following questions: (a) How the *DRD4* Native American frequencies and associated
39
40 variability are distributed in South America? (b) Can distinctive geographical patterns be
41
42 observed within the American continent? (c) Could the hypothesis of 7R advantage allele in
43
44 hunter-gatherer populations be tested? (d) Is the Surui exclusive 7R (1-3-6-5-2-5-19) observed
45
46 in other Amerindian populations?
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIAL AND METHODS

Populations

Three Native American populations were studied: one Kaingang and two Guarani (Ñandeva and Kaiowá subgroups). These are the major Amerindian ethnic units living in southern Brazil, speaking languages of the Je and Tupi stocks (Campbell, 1997). They are in a process of adaptation to the neo-Brazilian rural way of life, but despite living geographically close to each other for centuries, the Guarani and Kaingang still differ in many cultural and biological aspects (Petzl-Erler et al. 1993; Tsuneto et al. 2003). The studied sample consisted of 172 individuals from the Kaingang (N=72), Guarani-Kaiowá (N=50) and Guarani Ñandeva (N=50) populations. The Kaingang were sampled in Nonoai, Rio Grande do Sul; the Guarani-Kaiowá live in Amambaí and Limão-Verde, Mato Grosso do Sul; and the Guarani Ñandeva in Porto Lindo and Amambaí, Mato Grosso do Sul. Geographical coordinates of these places are given in Table 1. This table provides additional information about these three populations and for those previously reported as being studied for *DRD4*. Classification in a predominantly hunter-gatherer or agriculturalist way of living was as described in Salzano and Callegari-Jacques (1988). It should be stressed that this classification refer to their relatively recent past, independently of most recent changes, that probably could not have significantly influenced their gene pool

Laboratory methods

Blood samples were obtained with anticoagulant, refrigerated shortly after collection, and sent by air to Porto Alegre or Curitiba (Brazil), where DNA was extracted by standard salting out procedures.

The VNTR-48bp in *DRD4* exon III was genotyped as described by Roman et al (1999).

1
2
3 All 7R allele homozygote samples were sequenced. The primers used for sequencing were D4-
4 3 (5'-GCGACTACGTGGTCTACTCG-3') and D4-J3 (5'-CCTTC CCCCACGCCA-3')
5
6
7
8 (Lichter et al., 1993). After amplification, PCR products were purified by exonuclease I (Exo)
9
10 and shrimp alkaline phosphatase (SAP) treatment (Ding et al., 2002). The purified fragment
11
12 was sequenced at MACROGEN Inc. When new mutations were observed or when sequences
13
14 were dubious, the samples were resequenced through independent PCR products.
15
16
17
18
19

20 **Statistical and sequence data analyses**

21
22 Allele frequencies were obtained directly by gene counting. The Hardy-Weinberg
23
24 equilibrium was assessed by the exact test of Guo and Thompson (1992), using the
25
26 ARLEQUIN v.3.11 software (Excoffier et al. 2005).
27
28

29 Average heterozygosities were calculated according to Nei (1987), and the genetic
30
31 distance matrix was calculated employing the D_A distance (Nei et al. 1983) using the
32
33 DISPAN software (Ota, 1993). A nonmetric multidimensional scaling (MDS) plot was
34
35 obtained using SPSS v.16 (SPSS Inc., USA, 1998).
36
37

38 Population genetic structure was investigated using analysis of molecular variance
39
40 (AMOVA; Excoffier et al. 1992). Language, geography and way of living grouping
41
42 approaches for subdivision were considered using the ARLEQUIN v. 3.11 program (Excoffier
43
44 et al. 2005). F_{ST} estimates were also obtained with this software.
45
46
47

48 In an attempt to test the association between the 7R allele frequency and populations
49
50 in different ways of living, allele distributions were compared using Fisher's exact test.
51
52 Spearman's correlation coefficients between latitudes and allele frequency were also
53
54 calculated to verify the possible existence of a geographical pattern in the 7R distribution.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 All tests were two-tailed and significance level was set at 0.05. The analyses were performed
4
5 with the SPSS software, version 16 (SPSS Inc., USA).
6
7

8 Map of the populations' geographic locations and the isolines for 7R allele
9
10 frequencies were produced with the IDRISI_C v.32.02 software (Eastman, 2000).
11
12

13 In this study, the term 'motif' refers to a variant sequence of the VNTR 48bp repeat
14
15 unit. A haplotype means a specific motif composition, and allele refers to a specific length
16
17 variant.. Analysis of sequence data was accomplished using the Codon Code Aligner v3.0.1
18
19 software and haplotypes were estimated using the Bayesian method implemented in
20
21 PHASE2.1 software (Stephens et al., 2001; Stephens and Scheet, 2005). The haplotypes
22
23 were derived according to the motifs and point mutations as described previously (Ding et
24
25 al., 2002).
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 RESULTS

36
37 *DRD4* allele frequencies observed in the Kaingang, Guarani-Kaiowá and Guarani-
38
39 Ñandeva, and in previously studied populations are shown in Table 2. Eight alleles (ranging
40
41 from 2R to 9R) were observed. The Guarani-Ñandeva presented four alleles, while five and
42
43 seven alleles were seen among the Guarani-Kaiowá and Kaingang respectively. 4R and 7R
44
45 were the most frequent alleles and were observed in all populations. 4R was the most frequent
46
47 in the Kaingang (53%) and Guarani-Ñandeva (48%) while 7R was more frequent in Guarani-
48
49 Kaiowá (52%). When these results were compared with previous data, the 7R average
50
51 frequency (0.443) proved to be intermediate between those obtained by Chang et al. (1996)
52
53 (0.628) and Hutz et al. (2000) (0.544) for the Amazonian region, and those reported by
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Marignac and Bianchi (2006) (0.341) in Chaco and Patagonia regions.
4

5 As for the intrapopulation genetic variability, the Kaingang were more variable than
6 the others, showing three variants (*3R*, *8R* and *9R*) absent in the Guarani subgroups. Table 2
7 presents heterozygosity values in the 18 South Amerindian investigated for the *DRD4 locus*.
8 The lowest values were observed in the Ticuna (0.354) and Mapuche (0.398) while the higher
9 values were in the Tehuelche (0.725) and Xavante (0.698) populations.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 To further evaluate the genetic relationships among the 18 South Amerindian
19 populations, D_A genetic distances were estimated. The multidimensional scaling plot based on
20 this distance is presented in Figure 1. As shown there, those classified as hunter-gatherers
21 were more tightly clustered than the agriculturalists. Notice that Wai-Wai and Tehuelche,
22 classified as hunter-gatherers, clustered together with the agriculturalists, while Ticuna,
23 classified as an agriculturalist population, clustered with the hunter-gatherers. When the
24 Ticuna was removed from the analysis, AMOVA showed a significant structure between these
25 two divisions (Table 3). The actual *7R* frequencies were averaged as 0.58 in hunter-gatherers
26 against 0.48 in agriculturalists ($P < 0.001$).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Spearman's correlation coefficient was afterwards estimated between latitude and *7R*
41 frequency in the 18 populations. A north-south gradient was found ($\rho = 0.580$, $P = 0.012$; Figure
42 2b), with the *7R* frequencies decreasing toward the south. It is interesting to note that the
43 populations of the southern end have frequencies similar to those observed in native North
44 America (Table 2). Figure 2a shows the *7R* allele distribution in South America.
45
46
47
48
49
50

51 As shown in Table 3, the highest level of molecular variation between the suggested
52 divisions (7.73%) corresponds to the separation between North /Central and South American
53 populations. A clear difference among Andes, Center/SE and Amazonia was also found, ($P =$
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 0.015; Table 3), but no significance when populations were grouped by linguistic affiliation.
4
5
6 F_{ST} estimates between the three indicated divisions reflected the reduction of gene flow
7
8 between them: Amazon and Andean (0.157, $P < 0.001$), Amazon and Center/SE (0.061,
9
10 $P < 0.001$), and Andean and Center/SE (0.020, $P = 0.027$);

11
12 The DNA of a total of nine Kaingang, nine Guarani-Kaiowá and eight Guarani-
13
14 Ñandeva individuals homozygous for the 7R allele were sequenced (Table 4). As was
15
16 observed in other populations (Lichter et al., 1993; Ding et al., 2002) the most frequent
17
18 haplotype was 1-2-6-5-2-5-4. It was the only haplotype observed in the Kaingang and
19
20 Guarani-Kaiowá, whereas in the Guarani-Ñandeva two different haplotypes were observed in
21
22 addition to it, one of them being the so-called Surui exclusive haplotype (1-3-6-5-2-5-19).
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 DISCUSSION

35
36
37
38 The present study provides: (1) novel information regarding the frequency of the 48bp
39
40 VNTR polymorphism of the *DRD4* gene in Guarani and Kaingang populations; (2) new data
41
42 on VNTR haplotypes in these populations; and (3) a general analysis of the VNTR *DRD4*
43
44 distribution in South Amerindians.
45
46
47

48 VNTR sequences in Native American populations have been reported for the Maya,
49
50 Colombian natives, and Surui only (Lichter et al., 1993; Ding et al., 2002). Lichter et al (1993)
51
52 sequenced 20 Amerindian chromosomes (10 Mayans and 10 Colombians). In these
53
54 populations, 70% and 60% respectively of the alleles sequenced were 7R, and all presented the
55
56 1-2-6-5-2-5-4 haplotype. Ding et al. (2002) studied 600 alleles, 76 being Amerindian alleles
57
58
59
60

1
2
3 without population source information. Five (6.5%) of the Amerindian 7R alleles presented a
4 haplotype (1-2-6-5-2-5-19) designated by the authors as a Surui exclusive haplotype probably
5 because it occurred only in this population. This haplotype was now observed in three out of
6 Guarani-Ñandeva 16 7R chromosomes (19%). This shared haplotype between the Guarani-
7 Nandeva and Surui supports the hypothesis of an Amazonian origin for the Guarani. Probably
8 the 7R (1-2-6-5-2-5-19) haplotype is an Amerindian marker. As in the Maya and Colombian
9 natives, the Kaingang and Guarani-Kaiowá populations presented only the most common
10 (1-2-6-5-2-5-4) 7R haplotype.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 Positive selection in the VNTR region has been long addressed (Chang et al. 1996;
23 Ding et al. 2002; Wang et al. 2004). It was proposed that the 7R allele selection possibly
24 involves migration. . Exploratory behaviors would be adaptive in nomad societies because
25 they allowed for more successful exploitation of resources. Conversely, in agriculturalist
26 sedentary societies, novelty-seeking and exploratory behaviors would have social costs
27 because these populations developed intensive methods for using the land in a given settled
28 environment (Chen et al. 1999).
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Chen et al (1999) had previously reported an association between macro-migrations
39 and 7R or long alleles around the world. In their study micro-migrations failed to show
40 association with 7R possibly due to the small number of American sedentary societies
41 investigated by them. Our results show an association between high 7R and the hunter-
42 gatherer way of living reinforcing the idea of an advantage of novelty-seeking temperament,
43 hyperactivity and impulsivity in this situation. It is proposed that these traits could have been
44 important and advantageous in the colonization of new environments during the peopling of
45 the Americas. The high 7R frequency in predominantly hunter-gatherers might reflect the
46 advantage of hyperactive and more violent men during competitions and warfare (Harpeding
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and Cochran, 2002). However, to correctly test this hypothesis, the between groups *7R*
4
5 frequencies must be calculated considering males only.
6
7

8 Our results also showed an allele distribution related to geography. Both correlation
9
10 and AMOVA analyses (Figure 2a,b; Table 3) indicated the Amazon as a region of high *7R*
11
12 frequency. Similar results were observed with the β -globin haplotypes, and they could
13
14 indicate vestiges of past South Amerindian migrations (Callegari-Jacques et al. 2007). But it is
15
16 unlikely that the *7R* distribution in South America is due to geography. The correlation with
17
18 latitude is probably due to the fact that hunter-gatherers live in northern, and agriculturalists in
19
20 southern regions. Alternative hypotheses (see below) seems more likely.
21
22
23

24 CONCLUSION

25
26
27
28
29 In this study we reported *DRD4* VNTR locus allele frequencies in three South
30
31 Amerindian populations. These new data, pooled with those previously reported, provided
32
33 indirect evidence of *7R* involvement with the hunter-gatherer way of living. Geography could
34
35 also modulate the *7R* distribution in South America. This geographic pattern could be due to
36
37 (1) differential location of hunter-gatherers and agriculturalists, (2) undetected bottleneck and
38
39 admixture effects; or (3) evidences of past migrations not necessarily involved with behavioral
40
41 traits influenced by the dopamine receptor D4; no evidence is available, however, for
42
43 hypotheses 2 and 3. Our results have implications in association studies of neuropsychiatric
44
45 diseases. Given the observed heterogeneity of South Amerindians and the admixed nature of
46
47 the continent's population, the appropriateness of the control samples in case-control studies is
48
49 of critical importance.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

AKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to the Fundação Nacional do Índio for authorizing this study and for logistic assistance. The Indian leaders and the subjects of investigation were adequately informed about the aims of the study and gave their approval, which is gratefully acknowledged.. Our research program was approved by the Brazilian Ethics National Committee (Resolution 123/98).

LITERATURE CITED

- 1
2
3
4
5
6 Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. 1995. Modulation
7
8 of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J*
9
10 *Neurochem* 65:1157-1165.
11
12
13 Campbell L. 1997. *American Indian languages: the historical linguistics of Native America.*
14
15 Oxford: Oxford University Press.
16
17
18 Callegari-Jacques SM, Crossetti SG, Kohlrausch FB, Salzano FM, Tsuneto LT, Petzl-Erler
19
20 ML, Hill K, Hurtado AM, Hutz MH. 2007. The beta-globin gene cluster distribution
21
22 revisited - patterns in Native American populations. *Am J Phys Anthropol* 134:190-
23
24 197.
25
26
27 Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK. 1996. The world-wide distribution of
28
29 allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98:91-101.
30
31
32 Chen C, Burton M, Greenberger E, Dmitrieva J. 1999. Population migration and the variation
33
34 of Dopamine D4 Receptor (DRD4) allele frequencies around the globe. *Evol Hum*
35
36 *Behav* 20: 309–324.
37
38
39 Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA,
40
41 Schuck S, Swanson JM, Zhang YP, Moyzis RK. 2002. Evidence of positive selection
42
43 acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*
44
45 99:309-314.
46
47
48 Eastman JR. 2000. IDRISI software. Worcester MA: Clark Labs, Clark University. Software
49
50 available at <http://www.clarklabs.org/>.
51
52
53
54 Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L,
55
56 Katz M, Belmaker RH. 1996. Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism
57
58
59
60

- 1
2
3 associated with the human personality trait of novelty seeking. *Nat Genet* 12:78-80.
4
5 Eisenberg DT, Campbell B, Gray PB, Sorenson MD. 2008. Dopamine receptor genetic
6 polymorphisms and body composition in undernourished pastoralists: an exploration of
7 nutrition indices among nomadic and recently settled Ariaal men of northern Kenya.
8 *BMC Evol Biol* 8:173-184.
9
10 Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software
11 package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50.
12
13 Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from
14 metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA
15 restriction data. *Genetics* 131:479-491.
16
17 Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic
18 review. *Hum Genet* 126:51-90.
19
20 Grady DL, Chi HC, Ding YC, Smith M, Wang E, Schuck S, Flodman P, Spence MA,
21 Swanson JM, Moyzis RK. 2003. High prevalence of rare dopamine receptor D4 alleles
22 in children diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*
23 8:536-545.
24
25 Grady DL, Harxhi A, Smith M, Flodman P, Spence MA, Swanson JM, Moyzis RK. 2005.
26 Sequence variants of the DRD4 gene in autism: further evidence that rare DRD4 7R
27 haplotypes are ADHD specific. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 136B:33-35.
28
29 Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for
30 multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
31
32 Harpending H, Cochran G. 2002. In our genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:10-12.
33
34 Hattori E, Nakajima M, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Saitou N, Yoshikawa T. 2009.
35 Variable number of tandem repeat polymorphisms of DRD4: re-evaluation of selection
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 hypothesis and analysis of association with schizophrenia. *Eur J Hum Genet* 17:793-
4
5 801.
6
7
8 Hutz MH, Almeida S, Coimbra CE, Jr., Santos RV, Salzano FM. 2000. Haplotype and allele
9
10 frequencies for three genes of the dopaminergic system in South American Indians.
11
12 *Am J Hum Biol* 12:638-645.
13
14
15 Jensen PS, Mrazek D, Knapp PK, Steinberg L, Pfeffer C, Schowalter J, Shapiro T. 1997.
16
17 Evolution and revolution in child psychiatry: ADHD as a disorder of adaptation. *J Am*
18
19 *Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:1672-1679; discussion in 1679-1681.
20
21
22 Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK, Livak KJ. 1993. A hypervariable
23
24 segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* 2:767-
25
26 773.
27
28
29 Marignac VL, Bianchi NO. 2006. Prevalence of dopamine and 5HT2C receptor
30
31 polymorphisms in Amerindians and in an urban population from Argentina. *Am J Hum*
32
33 *Biol* 18:822-828.
34
35
36 Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
37
38 Nei M, Tajima F, Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular
39
40 data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol* 19:153-170.
41
42
43 Ota, T. 1993. *DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis*. University Park: Institute
44
45 of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University.
46
47
48 Petzl-Erler ML, Luz R, Sotomaior VS. 1993. The HLA polymorphism of two distinctive
49
50 South-American Indian tribes: the Kaingang and the Guarani. *Tissue Antigens* 41:227-
51
52 237.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH. 1999. Lack of association of the dopamine D4
4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. *Addict*
5 *Biology* 4:203–207.
6
7
8
9
10 Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2001. Attention-deficit
11 hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene
12 and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet.* 105: 471-478.
13
14
15
16
17 Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH,
18 Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. 1998. Dopamine DRD4 receptor
19 polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 3:419-426.
20
21
22
23
24 Salzano FM, Callegari-Jacques SM. 1988. South American Indians: a case study in evolution.
25 Oxford: Clarendon Press.
26
27
28
29
30 SPSS INC. 1998. SPSS Base 16.0 for windows. Chicago: SPSS Inc.
31
32
33 Stephens M, Scheet P. 2005. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype
34 inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 76:449-462.
35
36
37 Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype
38 reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978-989.
39
40
41
42 Sullivan PF, Fifeild WJ, Kennedy MA, Mulder RT, Sellman JD, Joyce PR. 1998. No
43 association between novelty seeking and the type 4 dopamine receptor gene (DRD4) in
44 two New Zealand samples. *Am J Psychiatry* 155:98-101.
45
46
47
48
49 Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wigal T, Lerner M, Williams
50 L, LaHoste GJ, Wigal S. 1998. Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene
51 with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-
52 based approach. *Mol Psychiatry* 3:38-41.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Tsuneto LT, Probst CM, Hutz MH, Salzano FM, Rodriguez-Delfin LA, Zago MA, Hill K,
4
5
6 Hurtado AM, Ribeiro-dos-Santos AK, Petzl-Erler ML. 2003. HLA class II diversity in
7
8 seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Ache. *Tissue Antigens*
9
10 62:512-526.
11
- 12 Wang E, Ding YC, Flodman P, Kidd JR, Kidd KK, Grady DL, Ryder OA, Spence MA,
13
14 Swanson JM, Moyzis RK. 2004. The genetic architecture of selection at the human
15
16 dopamine receptor D4 (DRD4) gene locus. *Am J Hum Genet* 74:931-944.
17
18
- 19 Williams J, Taylor E. 2006. The evolution of hyperactivity, impulsivity and cognitive
20
21 diversity. *J R Soc Interface* 3:399-413.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legends for figures

Fig 1. Non-metric multidimensional scaling plot of the D_A distances between 18 South Amerindian populations, calculated considering the 48bp-VNTR *locus*. Axis 1 separates (with few exceptions) hunter-gatherers from agriculturalists.

Fig 2. (a) Isoline map showing the distribution of 7R observed frequencies in South America. (b) Correlation between 7R frequency and latitude of 18 South Amerindian populations

TABLE 1. Linguistic affiliation, geographic location, sample size and acculturation stage for 18 South Amerindian populations (listed in alphabetic order)

Population number	Population name	No of tested chromosomes	Relatively recent way of living	Linguistic group ^a	Geographic localization		References
					Latitude	Longitude	
1	Ayoreo	8	Hunter-gatherer	Zamuco	19° 00' S	60° 30' W	3
2	Gavião	58	Hunter-gatherer	Tupi-Mondé	10° 10' S	61° 08' W	2
3	Guahibo	26	Hunter-gatherer	Arawak	6° 00' N	70° 00' W	1
4	Guarani-Kaiowá	100	Agriculturalist	Tupi-Guarani	23° 00' S	55° 00' W	4
5	Guarani-Ñandeva	100	Agriculturalist	Tupi-Guarani	23° 00' S	54° 30' W	4
6	Kaingang	144	Agriculturalist	Je	27° 00' S	52° 00' W	4
7	Karitiana	108	Hunter-gatherer	Tupi-Arikém	9° 30' S	64° 15' W	1
8	Lengua	16	Agriculturalist	Mascov	22° 27' S	58° 00' W	3
9	Mapuche	44	Agriculturalist	Mapudungu	41° 00' S	69° 00' W	3
10	Mataco	42	Agriculturalist	Mataco-Mataguayo	24° 00' S	62° 00' W	3
11	Quechua	44	Agriculturalist	Quecha	12° 00' S	77° 00' W	1
12	Surui I	90	Hunter-gatherer	Tupi-Mondé	10° 50' S	61° 10' W	1
13	Surui II	44	Hunter-gatherer	Tupi-Mondé	11° 00' S	62° 00' W	2
14	Tehuelche	16	Hunter-gatherer	Chon	45° 00' S	70° 00' W	3
15	Ticuna	128	Agriculturalist	Ticuna	3° 00' S	70° 00' W	1
16	Xavante	56	Hunter-gatherer	Je	13° 20' S	51° 40' W	2
17	Zoró	56	Hunter-gatherer	Tupi-Mondé	10° 20' S	60° 20' W	2
18	Wai Wai	56	Hunter-gatherer	Caribe	0° 40' S	57° 55' W	2

TABLE 1 (continuation)

References: 1.Chang et al. (1996); 2.Hutz et al. (2000); 3.Marignac and Bianchi (2006); 4.Present study.

^aAccording to Campbel (1997)

TABLE 2. Frequencies (%) and genetic variability measures (heterozygosity and number of alleles) of exon III 48pb VNTR locus in Amerindians

Population	No. of chromosomes	Alleles								Heterozygosity (H)	No of alleles
		2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R		
South America											
Ayoreo ³	8	0.000	0.000	0.375	0.000	0.000	0.625	0.000	0.000	0.536	2
Gavião ²	58	0.030	0.000	0.280	0.000	0.000	0.690	0.000	0.000	0.452	3
Guahibo ¹	26	0.000	0.000	0.230	0.000	0.150	0.620	0.000	0.000	0.562	3
Guarani-Kaiowá ⁴	100	0.010	0.000	0.280	0.010	0.180	0.520	0.000	0.000	0.625	5
Guarani-Ñandeva ⁴	100	0.040	0.000	0.480	0.000	0.040	0.440	0.000	0.000	0.579	4
Kaingang ⁴	144	0.040	0.010	0.530	0.000	0.020	0.370	0.020	0.010	0.584	7
Karitiana ¹	108	0.000	0.000	0.390	0.000	0.000	0.600	0.010	0.000	0.492	3
Lengua ³	16	0.250	0.000	0.563	0.000	0.000	0.187	0.000	0.000	0.625	3
Mapuche ³	44	0.045	0.023	0.773	0.023	0.023	0.113	0.000	0.000	0.398	6
Mataco ³	42	0.000	0.024	0.476	0.024	0.071	0.405	0.000	0.000	0.618	5
Quechua ¹	44	0.000	0.000	0.410	0.000	0.140	0.450	0.000	0.000	0.624	3
Surui I ¹	90	0.140	0.000	0.160	0.010	0.000	0.690	0.000	0.000	0.484	4
Surui II ²	44	0.110	0.000	0.140	0.020	0.000	0.730	0.000	0.000	0.445	4
Tehuelche ³	16	0.188	0.062	0.375	0.000	0.000	0.375	0.000	0.000	0.725	4
Ticuna ¹	128	0.020	0.000	0.200	0.000	0.000	0.780	0.000	0.000	0.354	3
Xavante ²	56	0.000	0.000	0.320	0.030	0.040	0.430	0.180	0.000	0.698	5
Zoró ²	56	0.000	0.000	0.360	0.000	0.000	0.640	0.000	0.000	0.469	2
Wai Wai ²	56	0.020	0.000	0.520	0.050	0.180	0.230	0.000	0.000	0.653	5

(continue)

TABELA 2 (continuation)

Population	No of chromosomes	Alleles									Heterozygosity (H)	No of alleles
		2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R			
Mesoamerica												
Maya ¹	100	0.010	0.000	0.570	0.000	0.030	0.390	0.000	0.000	0.527	4	
North America												
Cheyenne ¹	96	0.010	0.000	0.520	0.020	0.110	0.340	0.000	0.000	0.608	5	
Jemez Pueblo ¹	86	0.040	0.010	0.700	0.020	0.030	0.190	0.010	0.000	0.476	7	
Muskoke ¹	24	0.040	0.090	0.540	0.040	0.000	0.290	0.000	0.000	0.640	5	
Pima ¹	70	0.010	0.000	0.740	0.030	0.000	0.220	0.000	0.000	0.409	4	

¹Chang et al. (1996); ²Hutz et al. (2000); ³Marignac and Bianchi (2006); ⁴Present study.

TABLE 3. Molecular analysis of variance using 48bp VNTR of DRD4 alleles

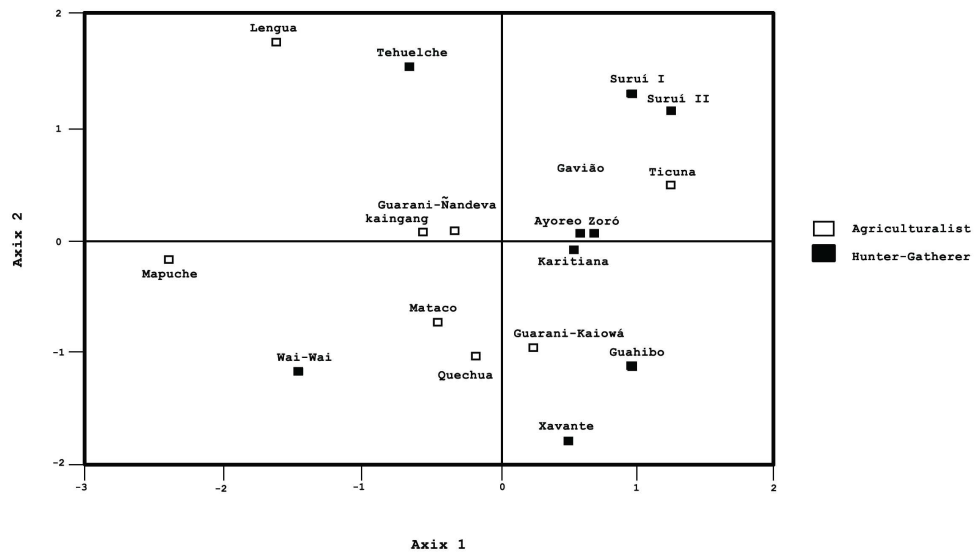
Divisions (and number of populations tested)	Number of divisions	Number of populations	Percentage of variation			
			Within populations ¹	Among populations within divisions ¹	Among divisions	Among divisions P-value
North/Central Americas (5) vs South America (18)	2	23	84.30	7.97	7.73	0.014 ± 0.004
Andean region (3) vs Lowland South America (15)	2	18	85.50	8.52	5.98	0.055 ± 0.007
Andean region (3) vs Amazon (8) vs Center/SE South America (7)	3	18	88.01	6.39	5.61	0.015 ± 0.003
Hunter-gatherers (9) vs Agriculturalists (8)	2	17	89.67	6.50	3.83	0.036 ± 0.006
Tupi (7) vs Jêan (2) Languages	2	9	91.16	4.82	4.02	0.100 ± 0.010

¹ In all cases, p < 0.001

TABLE 4. DRD4-7R haplotypes observed in homozygous individuals for this allele in Guarani (Kaiowá and Ñandeva subgroups) and Kaingang populations

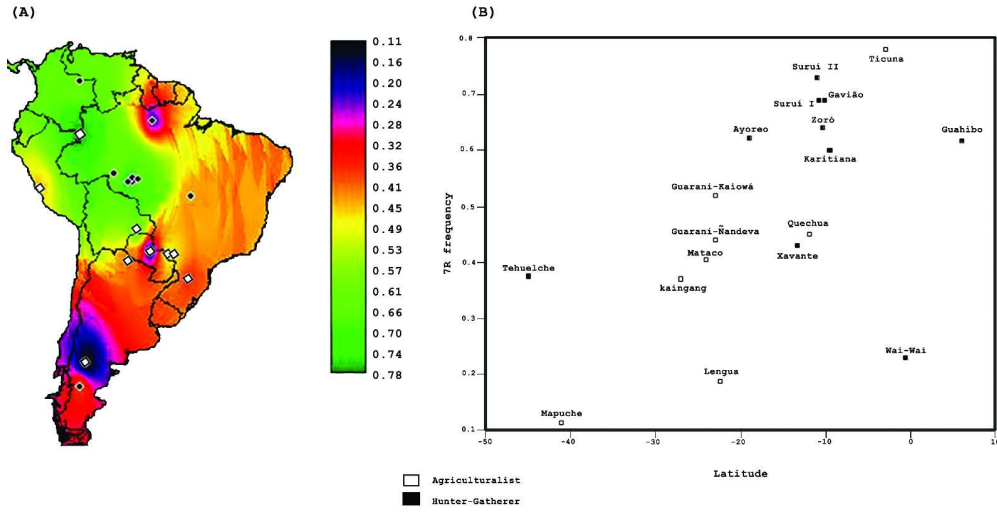
Population	No of chromosomes	No of observed haplotypes	Frequency (%) of haplotypes	^a Haplotypes						
Kaingang	18	18	100	1	2	6	5	2	5	4
Guarani-Kaiowá	18	18	100	1	2	6	5	2	5	4
Guarani-Ñandeva	16	11	69	1	2	6	5	2	5	4
		3	19	1	2	6	5	2	5	19
		2	12	1	2	6	5	2	3	4

^aThe numbers refer to 7R haplotype motifs. They were determined according to Ding et al. (2002).



200x126mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



270x150mm (300 x 300 DPI)

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

A discussão específica e completa referente aos resultados obtidos no presente trabalho encontra-se no manuscrito (capítulo III). Neste capítulo serão abordados aspectos gerais, relacionados com as populações ameríndias da América do Sul e com o gene DRD4 em estudos evolutivos, bem como as perspectivas deste trabalho. Assim, pretende-se que o texto não seja repetitivo. Porém, alguma sobreposição é inevitável visto a complexidade do tema abordado.

Como mencionado no capítulo I, na época do contato, os nativo-americanos estavam subdivididos em populações com diferentes hábitos de vida, desde exímios agricultores até organizações mais simples como caçadores-coletores. Eles falavam diferentes línguas e também apresentavam uma imensidão de diferentes costumes e outros aspectos culturais. Apesar de os estudos genéticos envolvendo populações ameríndias serem heterogêneos e algumas vezes contraditórios, diferenças na América são observadas. Algumas delas são clinais, enquanto outras são mais abruptas, provavelmente devido aos movimentos populacionais variados e aos distintos ambientes a que esses povos tiveram que enfrentar (Salzano 2002).

Assim como a genética, o comportamento humano também é variável na América do Sul. A evolução humana caracteriza-se por um notável aumento no tamanho e na complexidade do cérebro. Sabe-se que muitos genes envolvidos no desenvolvimento e na fisiologia do cérebro de primatas, principalmente de humanos, evoluíram sob pressão da seleção natural (Dorus *et al.*, 2004). Assim, os genes que codificam proteínas relacionadas com o sistema de neurotransmissão seriam ótimos candidatos para estudos envolvendo o comportamento humano.

O gene DRD4 é um dos genes que possivelmente esteja sob efeito seletivo, especificamente a variante 7R (Ding *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), de forma que algumas hipóteses foram propostas para tentar elucidar sua vantagem adaptativa, como apresentado no capítulo I. Entretanto, alguns autores expressam opinião oposta e contestam o efeito da seleção (Hattori *et al.*, 2009). Essas críticas são geralmente baseadas em características

moleculares dessa região do gene DRD4: (1) nenhum teste de seleção conhecido até o momento está desenhado para ser aplicado em um VNTR; (2) a evolução dessa região não se dá apenas por substituição, mas também por uma alta taxa de recombinação, o que faz com que simulações por coalescência e também relações filogenéticas simples sejam inadequadas; (3) o tamanho de cada unidade de repetição em outros animais não é a mesma de humanos, 48pb. Por exemplo, em eqüinos e cetáceos os motivos contêm 18 pb (Momozawa *et al.*, 2005, Larsen *et al.*, 2005), enquanto em ratos não foram detectadas repetições (O'Malley *et al.*, 1992), o que torna complicada a comparação entre elas; (4) As unidades de repetições em outros primatas são de 48bp, porém, até o momento, existe pouca informação sobre seqüências de diferentes tamanhos de alelos de não-humanos nesta ordem (Livak *et al.*, 1995).

Esses fatores fazem com que a hipótese de seleção seja sugerida baseada em sua maioria em fatos indiretos, como freqüência alélica diferencial em continentes, aumento da freqüência alélica em curto espaço de tempo, associação entre alelo 7R e TDAH, dimensão de personalidade busca de novidades e associação entre alelo 7R e melhores índices nutricionais em indivíduos de população nômade. Entretanto, a evidência mais confiável é dada através do grande desequilíbrio de ligação entre o alelo 7R e seus polimorfismos próximos, metodologia que tem se tornado cada vez mais comum para estimar o efeito da seleção (Eberle *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006, Huff *et al.*, 2010). Apesar de alguns autores tentarem aplicar testes-padrão de seleção na região do VNTR, como estimativas de Ka/Ks (Ding *et al.*, 2002), isso não está totalmente correto levando em consideração as características moleculares ímpares dessa região do DRD4.

O presente trabalho buscou caracterizar a variabilidade genética de três populações do centro-sul do Brasil, considerando o VNTR do gene DRD4. Estes dados, acrescidos de informação genética relativa a mais 15 populações sul-americanas revelaram uma maior freqüência de alelo 7R em populações caçadoras-coletoras, o que pode estar associado ao hábito de vida dessas populações. Dessa maneira, os nossos resultados fornecem indícios indiretos de

vantagem adaptativa do alelo *7R* em sociedades caçadoras coletoras, reforçando a hipótese de seleção natural.

Os nossos resultados, ao mesmo tempo, são condizentes com a hipótese proposta por Harpending e Cochran (2002), que está intrinsecamente relacionada com o hábito de vida dessas populações. Entretanto, para que essa hipótese seja corretamente testada, seria necessário se obter a frequência do alelo *7R* em ambos gêneros devido ao possível efeito da seleção sexual.

Os resultados também indicaram que a América está subestruturada em três grandes macroregiões geográficas. Entretanto, dadas as evidências de associação entre o alelo *7R* e populações caçadoras-coletoras obtidas pela associação com o Teste Exato de Fisher e pela correlação, além da evidência de seleção natural dos trabalhos prévios, é improvável que a distribuição do alelo *7R* na América do Sul tenha se dado por fatores aleatórios como demografia, deriva genética e dispersão. Os resultados de estruturação genética devido à geografia possivelmente possam estar sofrendo a influência da distribuição das populações com diferentes hábitos de vida, uma vez que os dois fatores estão muitas vezes relacionados nas populações nativas da América do Sul estudadas. Assim, torna-se uma tarefa complicada tentar distingui-las e analisá-las separadamente. Por exemplo, os povos habitantes da região dos Andes apresentavam alto nível de organização, domesticavam plantas e animais, praticavam irrigação e sua tecnologia era bastante desenvolvida. Já os indígenas da floresta Amazônica praticavam na sua maioria a caça e a coleta, com agricultura incipiente, devido às características do solo e do clima da região tropical (Salzano e Callegari-Jacques, 1988; Crawford, 1998). Já na região Centro-Sul foram analisadas populações que são mescladas em relação aos hábitos de vida, o que pode ter configurado o valor intermediário de frequência *7R*. Os valores de F_{ST} entre essas três macro-regiões corroboram essa hipótese, sendo Amazônia e Andes mais distantes, e Centro-Sul intermediário aos dois.

Em relação aos resultados obtidos com as seqüências do VNTR do gene *DRD4* em ameríndios, eles refletem o padrão encontrado para outras populações

mundiais, exceto na população Guarani-Ñandeva, que se mostrou polimórfica para este locus. Os Guarani representam a porção mais austral da bem sucedida expansão Tupi. Apesar da escassez de dados envolvendo o seqüenciamento do VNTR em populações ameríndias, os Guarani são a única população que compartilha um haplótipo com populações Amazônicas, representadas pelos Suruí, o que pode indicar a expansão Tupi.

Como mencionado, os dois subgrupos da população Guarani estudadas aqui demonstraram ser diferentes, principalmente em relação às frequências dos alelos 4R, 6R e 7R, além dos haplótipos observados no alelo 7R. Diferenças entre os subgrupos Guarani também já foi relatada para mtDNA (Marrero *et al.*, 2007), o que sugere que a separação dos três subgrupos tenha sido um evento anterior ao contato com colonizadores europeus.

Este estudo é de grande valia para trabalhos que buscam associar doenças e genes, já que o DRD4 é um gene muito estudado na etiologia de transtornos psiquiátricos e as populações indígenas são um grupo parental das populações miscigenadas desse continente. Nesse tipo de estudo, a utilização de um grupo controle correto é imprescindível. Como a América está estruturada em relação ao hábito de vida das sociedades, é muito importante que essa equivalência genético-cultural seja respeitada para que não se recorra em resultados enviesados.

O gene DRD4, apesar de ser complexo de ser manuseado, apresenta muitos campos de trabalho abertos. Por exemplo, a investigação de populações de hábito de vida caçadoras coletoras mais ao sul do continente, como as populações Aché (Chaco) e Ona, Alacaluf e Yahgan (Patagônia) seria importante para confirmar a hipótese de seleção natural. Além disso, a variabilidade interna ao VNTR tem se mostrado uma área promissora devido à elevada frequência de variantes raras 7R em indivíduos com TDAH, porém até o momento tem sido pouco estudada. O seqüenciamento do VNTR em indivíduos do sul do Brasil sadios e com a patologia, comparadas com os haplótipos determinados no presente estudo poderiam auxiliar nos aspectos de miscigenação populacional

nessa região, de evolução molecular do VNTR e também as relações evolutivas entre TDAH e hábito de vida das populações nativas sul-americanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre-Samudio AJ e Nicolini H (2005) DRD4 polymorphism and the association with mental disorders. *Rev Invest Clin* 57:65-75.

Aguirre AJ, Apiquian R, Fresan A e 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* 153:209-215.

Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V e Van Tol HH (1995) Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem* 65:1157-1165.

Bakker SC, Van der Meulen EM, Oteman N, Schelleman H, Pearson PL, Buitelaar JK e Sinke RJ (2005) DAT1, DRD4, and DRD5 polymorphisms are not associated with ADHD in Dutch families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132B:50-52.

Bau CH, Roman T, Almeida S e Hutz MH (1999) Dopamine D4 receptor gene and personality dimensions in Brazilian male alcoholics. *Psychiatr Genet* 9:139-143.

Becker IIB (1995) O índio Kaingang do Rio Grande do Sul. UNISINOS, São Leopoldo, 334p.

Becker IIB (1999) O índio Kaingang do Paraná. Subsídios para uma etno-história. UNISINOS, São Leopoldo, 344p.

Benjamin J., Li L., Patterson C., Greenberg BD, Murphy DL e Hamer DH (1996) Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of novelty seeking. *Nat Genet* 12:81–84.

Bhaduri N, Das M, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Chaudhuri K, Singh M e Mukhopadhyay K (2006) Association of dopamine D4 receptor (DRD4) polymorphisms with attention deficit hyperactivity disorder in Indian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:61-66.

Borinskaia SA, Kozhekbaeva Zh M, Gorbunova EV, Sokolova MV, Iur'ev EB, Tiazhelova TV, Grechanina E, Khusnutdinova EK e Iankovskii NK (2004) Analysis of the DRD4 gene polymorphism in populations of Russia and neighboring countries. *Genetika* 40:835-840.

Burenhult G (1994) Traditional Peoples Today: Continuity and Change in the Modern World. 1ª edição. University of Queensland Press, Brisbane Australia, 239 p.

Campbell L (1997) American Indian languages: the historical linguistics of Native America. 2ª edição. Oxford University Press, Oxford, 528p.

Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, Henriquez H, Aboitiz F e Rothhammer F (2004) Presence of *DRD4/7R* and *DAT1/10R* allele in Chilean family members

with attention deficit hyperactivity disorder. *Rev Med Chil* 132:1047-1052.

Castro IP, Ibanez A, Torres P, Saiz-Ruiz J e Fernandez-Piqueras J (1997) Genetic association study between pathological gambling and a functional DNA polymorphism at the D4 receptor gene. *Pharmacogenetics* 7: 345–348.

Catalano M, Nobile M, Novelli E, Nothen MM e Smeraldi E (1993) Distribution of a novel mutation in the first exon of the human dopamine D4 receptor gene in psychotic patients. *Biol Psychiatry* 34:459-464.

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P e Piazza A (1994) The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton, 518 p.

Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ e Kidd KK (1996) The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98:91-101.

Chen C, Burton M, Greenberger E e Dmitrieva J (1999) Population migration and the variation of Dopamine D4 Receptor (DRD4) allele frequencies around the globe. *Evol Hum Behav* 20: 309–324.

Cichon S, Nothen MM, Catalano M, Di Bella D, Maier W, Lichtermann D, Mingos J, Albus M, Borrmann M, Franzeck E, *et al.* (1995) Identification of two novel polymorphisms and a rare deletion variant in the human dopamine D4 receptor gene. *Psychiatr Genet* 5:97-103.

Crawford MH (1998) The origins of Native Americans: evidence from anthropological genetics. Cambridge University Press, Cambridge, 326p.

D'Souza UM, Russ C, Tahir E, Mill J, McGuffin P, Asherson PJ e Craig IW (2004) Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5'flanking region of the DRD4 gene. *Biol Psychiatry* 56:691-697.

Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, *et al.* (2002) Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:309-314.

Ding YC, Wooding S, Harpending HC, Chi HC, Li HP, Fu YX, Pang JF, Yao YG, Yu JG, Moyzis R, *et al.* (2000) Population structure and history in East Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14003-14006.

Dorus S, Vallender EJ, Evans PD, Anderson JR, Gilbert SL, Mahowald M, Wyckoff GJ, Malcom CM e Lahn BT (2004) Accelerated evolution of nervous system genes in the origin of Homo sapiens. *Cell* 119:1027-1040.

Durston S, Fossella JA, Casey BJ, Hulshoff Pol HE, Galvan A, Schnack HG, Steenhuis MP, Minderaa RB, Buitelaar JK, Kahn RS *et al.* (2005) Differential

effects of DRD4 and DAT1 genotype on fronto-striatal gray matter volumes in a sample of subjects with attention deficit hyperactivity disorder, their unaffected siblings, and controls. *Mol Psychiatry* 10:678-685.

Eberle MA, Rieder MJ, Kruglyak L e Nickerson DA (2006) Allele frequency matching between SNPs reveals an excess of linkage disequilibrium in genic regions of the human genome. *PLoS Genet* 2:1319-1327.

Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M e Belmaker RH (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12:78-80.

Eisenberg DT, Campbell B, Gray PB e Sorenson MD (2008) Dopamine receptor genetic polymorphisms and body composition in undernourished pastoralists: an exploration of nutrition indices among nomadic and recently settled Ariaal men of northern Kenya. *BMC Evol Biol* 8:173-184.

Eisenberg J, Zohar A, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Gritsenko I, Nemanov L e Ebstein RP (2000) A haplotype relative risk study of the dopamine D4 receptor (DRD4) exon III repeat polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Am J Med Genet* 96:258-261.

El-Faddagh M, Laucht M, Maras A, Vohringer L e Schmidt MH (2004) Association of dopamine D4 receptor (DRD4) gene with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in a high-risk community sample: a longitudinal study from birth to 11 years of age. *J Neural Transm* 111:883-889.

Flores M (2003) História do Rio Grande do Sul. 7ª edição. Ediplat, Porto Alegre, 206p.

Gelernter J, Kennedy JL, van Tol HH, Civelli O e Kidd KK (1992) The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close to HRAS. *Genomics* 13:208-210.

Ghosh A e Seshadri M (2005) Indian ethnic populations characterized by dopamine (D4) receptor VNTR polymorphism. *Ann Hum Biol* 32:574-584.

Gizer IR, Ficks C e Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51-90.

Grady DL, Chi HC, Ding YC, Smith M, Wang E, Schuck S, Flodman P, Spence MA, Swanson JM e Moyzis RK (2003) High prevalence of rare dopamine receptor D4 alleles in children diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 8:536-545.

Grady DL, Harxhi A, Smith M, Flodman P, Spence MA, Swanson JM e Moyzis RK (2005) Sequence variants of the DRD4 gene in autism: further evidence that rare

DRD4 7R haplotypes are ADHD specific. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 136B:33-35.

Hamer DH (1997) The search for personality genes: adventures of a molecular biologist. *Curr Dir Psychol Sci* 6:111–114.

Harpending H e Cochran G (2002) In our genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10-12.

Hattori E, Nakajima M, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Saitou N e Yoshikawa T (2009) Variable number of tandem repeat polymorphisms of DRD4: re-evaluation of selection hypothesis and analysis of association with schizophrenia. *Eur J Hum Genet* 17:793-801.

Hawi Z, McCarron M, Kirley A, Daly G, Fitzgerald M e Gill M (2000) No association of the dopamine DRD4 receptor (DRD4) gene polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the Irish population. *Am J Med Genet* 96:268-272.

Holmes J, Payton A, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W *et al.* (2000) A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 5:523-530.

Huff CD, Harpending HC e Rogers AR (2010) Detecting positive selection from genome scans of linkage disequilibrium. *BMC Genomics* 11:8.

Hutz MH, Almeida S, Coimbra CE, Jr., Santos RV e 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.

Hutz MH, Callegari-Jacques SM, Almeida SEM, Armborst T e Salzano FM (2002) Low Levels of STRP Variability Are Not Universal in American Indians. *Hum Biol* 74: 791-806.

Jensen PS, Mrazek D, Knapp PK, Steinberg L, Pfeffer C, Schowalter J e Shapiro T (1997) Evolution and revolution in child psychiatry: ADHD as a disorder of adaptation. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:1672-1679.

Kern AA, B, Bend Z, Cohen VRA, Avancini EG, Kenel CLA e Gick PW (1993) Rio Grande do Sul: Continente múltiplo. Coleção o continente de São Pedro, volume V. Riocell Marprom, Porto Alegre, 159 p.

LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N e Kennedy JL (1996) Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1: 121–124.

Larsen SA, Mogensen L, Dietz R, Baagoe HJ, Andersen M, Werge T e

Rasmussen HB (2005) Identification and characterization of tandem repeats in exon III of dopamine receptor D4 (DRD4) genes from different mammalian species. *DNA Cell Biol* 24:795-804.

Lazzarotto P (1978) *História do Rio Grande do Sul*. 3ª edição. Ed. Sulina, Porto Alegre, 154 p.

Leung PW, Lee CC, Hung SF, Ho TP, Tang CP, Kwong SL, Leung SY, Yuen ST, Lieh-Mak F, Oosterlaan J, *et al.* (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:54-56.

Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK e Livak KJ (1993) A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* 2:767-773.

Livak KJ, Rogers J e Lichter JB (1995) Variability of dopamine D4 receptor (DRD4) gene sequence within and among nonhuman primate species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:427-431.

Loo SK, Rich EC, Ishii J, McGough J, McCracken J, Nelson S e Smalley SL (2008) Cognitive functioning in affected sibling pairs with ADHD: familial clustering and dopamine genes. *J Child Psychol Psychiatry* 49:950-957.

Lung FW, Shu BC, Kao WT, Chen CN, Ku YC e Tzeng DS (2009) Association of DRD4 uVNTR and TP53 codon 72 polymorphisms with schizophrenia: a case-control study. *BMC Med Genet* 10:147-154.

Malhi RS, Eshleman JA, Greenberg JA, Weiss DA, Schultz Shook BA, Kaestle FA, Lorenz JG, Kemp BM, Johnson JR e Smith DG (2002) The structure of diversity within New World mitochondrial DNA haplogroups: implications for the prehistory of North America. *Am J Hum Genet* 70:905-919.

Martins GF (1992) *Breve painel etno-histórico do Mato Grosso do Sul*. 2ª edição. UFMS/FNDE, Campo Grande.

Mansoor A, Mazhar K e Qamar R (2008) VNTR polymorphism of the DRD4 locus in different Pakistani ethnic groups. *Genet Test* 12:299-304.

Marignac VL e Bianchi NO (2006) Prevalence of dopamine and 5HT2C receptor polymorphisms in Amerindians and in an urban population from Argentina. *Am J Hum Biol* 18:822-828.

Marrero AR, Silva-Junior WA, Bravi CM, Hutz MH, Petzl-Erler ML, Ruiz-Linares A, Salzano FM e Bortolini MC (2007) Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil. *Am J Phys Anthropol* 132:301-310

Mitsuyasu H, Kawasaki H, Ninomiya H, Kinukawa N, Yamanaka T, Tahira T, Stanton VP, Jr., Springett GM, Hayashi K, Tashiro N, et al. (2007) Genetic structure of the dopamine receptor D4 gene (DRD4) and lack of association with schizophrenia in Japanese patients. *J Psychiatr Res* 41:763-775

Momozawa Y, Takeuchi Y, Kusunose R, Kikusui T e Mori Y (2005) Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. *Mamm Genome* 16:538-544

Neel JV e Salzano FM (1967) Further studies on the Xavante Indians. X. Some hypotheses-generalizations resulting from these studies. *Am J Hum Genet* 19:554-574

Netting RM (1993) *Smalholders, householders*. 1ª edição. Stanford University Press, Stanford, 416pp.

O'Malley KL, Harmon S, Tang L e Todd RD (1992) The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* 4:137-146

Oak JN, Oldenhof J e Van Tol HH (2000) The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol* 405:303-327

Okuyama Y, Ishiguro H, Toru M e Arinami T (1999) A genetic polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with expression and schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 258:292-295

Oldenhof J, Vickery R, Anafi M, Oak J, Ray A, Schoots O, Pawson T, von Zastrow M e Van Tol HH (1998) SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry* 37:15726-15736

Ono Y, Manki H, Yoshimura K, Muramatsu T, Mizushima H, Higuchi S, Yagi G, Kanba S e Asai M (1997) Association between dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism and novelty seeking in Japanese subjects. *Am J Med Genet* 74: 501–503.

Petronis A, Van Tol HH, Lichter JB, Livak KJ e Kennedy JL (1993) The D4 dopamine receptor gene maps on 11p proximal to HRAS. *Genomics* 18:161-163

Qian Q, Wang Y, Zhou R, Yang L e Faraone SV (2004) Family-based and case-control association studies of DRD4 and DAT1 polymorphisms in Chinese attention deficit hyperactivity disorder patients suggest long repeats contribute to genetic risk for the disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 128B:84-89

Ricardo CA (1996/2000) *Povos indígenas no Brasil*. Instituto Socioambiental, São Paulo.

Rodrigues AD (2005) *Sobre as línguas indígenas e sua pesquisa no Brasil*.

Ciência e Cultura 57: 35-38

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

Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA e Hutz MH (2001) Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* 105:471-478

Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A e Waldman ID (1998) Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 3:419-426

Salzano FM (2002) Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information. *An Acad Bras Cienc* 74:223-263

Salzano FM (2009) The Fission-Fusion Concept. *Curr Anthropol* 50:959-959.

Salzano FM e Callegari-Jacques SM (1988) South American Indians: a case study in evolution. Clarendon Press, Oxford, 259p.

Schaden E (1962) Aspectos fundamentais da cultura Guarani. Difusão européia do Livro, São Paulo, 190 p.

Schiavetto SNO (2003) A arqueologia Guarani: construção e desconstrução da identidade indígena. Annablume/ FAPESP, São Paulo, 138p.

Seaman MI, Chang FM, Quinones AT e Kidd KK (2000) Evolution of exon 1 of the dopamine D4 receptor (DRD4) gene in primates. *J Exp Zool* 288:32-38

Seaman MI, Fisher JB, Chang F e Kidd KK (1999) Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4). *Am J Med Genet* 88:705-709

Serretti A, Lorenzi C, Mandelli L, Cichon S, Schumacher J, Nöthen MM, Rietschel M, Tullius M e Ohlraun S (2004) DRD4 exon 3 variants are not associated with symptomatology of major psychoses in a German population. *Neurosci Lett*. 368:269-273.

Smalley SL, Bailey JN, Palmer CG, Cantwell DP, McGough JJ, Del’Homme MA, Asarnow JR, Woodward JA, Ramsey C e Nelson SF (1998) Evidence that the dopamine D4 receptor is a susceptibility gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 3: 427–430.

Smith BD (1992) *Rivers of Change: Essays on early agriculture in eastern North*

America. Smithsonian Institution Press, Washington. 302p.

Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wigal T, Lerner M, Williams L, LaHoste GJ e 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* 3:38-41

Wang E, Ding YC, Flodman P, Kidd JR, Kidd KK, Grady DL, Ryder OA, Spence MA, Swanson JM e Moyzis RK (2004) The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene locus. *Am J Hum Genet* 74:931-944

Wang ET, Kodama G, Baldi P e Moyzis RK (2006) Global landscape of recent inferred Darwinian selection for *Homo sapiens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:135-140

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28:114–138.

Zhang C, Bailey DK, Awad T, Liu G, Xing G, Cao M, Valmeekam V, Retief J, Matsuzaki H, Taub M, *et al.* (2006) A whole genome long-range haplotype (WGLRH) test for detecting imprints of positive selection in human populations. *Bioinformatics* 22:2122-2128