

Saulo José dos Reis

**Análises Filogenéticas da Região MHC em Primatas:
Evolução do Gene *MHC-G***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
cumprimento da disciplina TCC II
(BIO7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Andrea Marrero

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Reis, Saulo José

Análises Filogenéticas da Região MHC em Primatas: Evolução do Gene *MHC-G* / Saulo José Reis; orientadora, Andrea Marrero - Florianópolis, SC, 2015. 57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Genética. 3. Análise Filogenética. 4. *MHC-G*. 5. Evolução. I. Marrero, Andrea. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Saulo José dos Reis

**Análises Filogenéticas da Região MHC em Primatas:
Evolução do Gene *MHC-G***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para o cumprimento da disciplina TCCII (BIO7016) e aprovado em sua forma final pelo Banca Examinadora.

Florianópolis, 19 de junho de 2015.

Prof^ª Dr^ª Maria Risoleta F. Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Andrea Rita Marrero
Orientadora
UFSC

Leili Daiane Hausmann
UFSC

Prof^ª Dr^ª Yara C. N. Muniz
UFSC

Msc. Ticianá D.J. Farias
UFPR

Dedico esse trabalho aos meus pais
que sempre me apoiaram e estiveram
presentes em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Federal de Santa Catarina, seu corpo docente, direção, administração e demais funcionários que me oportunizaram a toda uma construção de conhecimento científica e pessoal que vou carregar comigo por toda minha vida e agora faz parte de mim.

Agradeço também a minha orientadora Prof^ª Dr^ª Andrea Rita Marrero, pelo suporte e disponibilização de seu tempo para correções, incentivos, sugestões, auxílio e paciência comigo, acredito que mais que uma professora ganhei uma grande amiga.

Aos membros da banca pela participação da avaliação desse trabalho; à todos seus apontamento e sugestões que auxiliaram não apenas na melhoria deste, como também na minha formação.

Sou muito grato aos meus pais, por estarem sempre presentes para o que eu precisasse, incentivo, apoio, sugestões, conselhos e nunca me deixaram faltar nada. Ao meu irmão por simplesmente ser meu irmão e meu amigo. Um obrigado a todos da minha família que sabiam da realização desse trabalho e em qualquer momento pensaram em mim.

Obrigado aos meus amigos e amigas que me ajudaram e sempre se lembram de mim. Em especial aos meus amigos e amigas da faculdade, Alviani Kunzler, Ana Paula Correia, Antonio Lourenço, Bruna Freitas, Dionia Dorneles, Gabriel Delapedra, Mariana Freitas e Rafael Meurer, sem vocês esse curso não teria sido o mesmo!

Agradeço a minha namorada Daniela Polla, por ser a melhor namorada do mundo e me dar todo suporte e carinho que precisei!!

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Às vezes sinto arrepios por todo o meu corpo, e pergunto-me se não me dediquei a uma fantasia”

(Charles Darwin, 1887)

RESUMO

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) representam uma importante contribuição evolutiva e estão relacionados à imunidade em vertebrados. A análise da variabilidade de homólogos da região *MHC-G* em primatas contribui para a compreensão das diferentes forças evolutivas às quais o gene está submetido. Visando a compreensão dos padrões de diversidade deste gene no intuito de construir relações filogenéticas intra e interespecíficas, o presente estudo é constituído por duas etapas, 1) revisão bibliográfica inserindo termos isolados e combinados entre si para selecionar e refinar as buscas; e 2) análise filogenética hierárquica, a partir de sequências previamente publicadas para primatas humanos e não humanos. Foram obtidas 351 sequências de *MHC-G* para 17 espécies de diferentes famílias (Hominidae, Cercopithecidae, Cebidae, Atelidae e Pithecidae) que foram alinhadas com programa BioEdit. Destas, 108 puderam ser utilizadas para construir uma relação filogenética utilizando o método de *Neighbor Joining* a partir das distâncias evolutivas do modelo de substituição nucleotídica Kimura-dois-parâmetros. Verificou-se uma clara divisão entre as parvordens Platyrrhini e Catarrhini, e dentro de cada *cluster* foi evidente o agrupamento das diferentes famílias. Apesar do papel bem descrito de genes do MHC como marcadores de divergência alélica e distância entre espécies, os resultados obtidos não puderam esclarecer alguns pontos da topologia da árvore, o que provavelmente está associado ao baixo número de espécimes representados para cada espécie, e não ao gene em si.

Palavras-chave: *MHC-G*; *Catarrhini*; *Platyrrhini*; Filogenia.

ABSTRACT

The Major Histocompatibility Complex (MHC) genes play role as an important evolutionary contribution and are related to immunity in vertebrates. The analysis of variability MHC-G region in primates contribute to understanding the different evolutionary forces to which the gene is subjected. To understand the diversity patterns of this gene in order to build intra- and interspecific phylogenetic relationships, this study consists of two steps: 1) literature review by entering terms isolated and combined to select and refine searches; and 2) hierarchical phylogenetic analysis, based on previously published sequences for human and non-human primates. 351 sequences were obtained MHC-G for 17 species of different families (Hominidae, Cercopithecidae, Cebidae, Atelidae and Pitheciidae) that were aligned with BioEdit software. Of these, 108 were used to build phylogenetic relationships using the *Neighbor Joining* method of evolutionary distances from the nucleotide substitution model “Kimura two-parameter”. There was a clear division between Platyrrhini and Catarrhini parvorders, and within each cluster was clear grouping of different families. Despite the well-described role of MHC genes as allelic divergence markers and distance between species, the results could not clarify some points of the tree topology, which is probably related to the low number of specimens for each species represented, not the gene itself.

Keywords: *MHC-G; Catarrhini; Platyrrhini; Phylogeny.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Filogenia molecular da ordem dos Primatas. Entre parênteses estão representados o número de espécies ou gêneros utilizados, seguido pelo número de espécies ou gêneros descritos. Os boxes indicam os gêneros, nos quais, pelo menos uma espécie teve o genoma completo sequenciado 22
- Figura 2** – Relação filogenética entre os primatas da parvordem Catarrhini. Os números entre parênteses representam o número de gêneros incluídos, seguidos pelo total de gêneros descritos espécies. Os boxes indicam gêneros onde pelo menos uma espécie teve o genoma completo sequenciado 24
- Figura 3** – Relação filogenética entre os primatas da parvordem Platyrrhini. Os números entre parênteses representam o número de gêneros incluídos, seguidos pelo total de gêneros descritos espécies. Os boxes indicam gêneros onde pelo menos uma espécie teve o genoma completo sequenciado 25
- Figura 4** – Mapa Genômico do MHC Humano (HLA), identificando as diferentes regiões gênicas (mostrando a posição no cromossomo 6 e os genes dentro dos loci)..... 36
- Figura 5** – Relação filogenética do gene MHC-G em primatas humanos e não humanos, utilizando o método de *Neighbor Joining* a partir das distâncias evolutivas do modelo de substituição nucleotídica Kimura- dois-parâmetros. Os símbolos azuis indicam sequências de catarrinos (Quadrado – Família Hominidae; Estrela – família Cercopithecidae) e os símbolos amarelos indicam as sequências de platirrinos (quadrado – Família Cebidae; Estrela – família Atelidae; triângulo – família Atelidae)..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B	-	Região do MHC para Galinhas
Caja	-	Região do MHC para <i>Callithrix jacchus</i>
DLA	-	Região do MHC para Cães
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
EBI	-	Instituto de Bioinformática Europeu
FLA	-	Região do MHC para Gatos
H-2	-	Região do MHC para Camundongos
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	-	Região do MHC para Humanos
IPD	-	Banco de Dados de Polimorfismos Imunológicos
KIR	-	Receptor de Células "Killer Immunoglobulin-like"
Mamu	-	Região do MHC para Macaco Rhesus
MHC	-	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mtDNA	-	DNA Mitocondrial
NCBI	-	Centro Nacional para a Informação Biotecnológica
NK	-	Célula "Natural Killer"
PGH	-	Projeto Genoma Humano
PMID	-	Identificador Digital do PubMed
PubMed	-	Banco de Dados de Publicações Médicas e Outras
RNA	-	Ácido Ribonucléico
RT1	-	Região do MHC para Ratos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	SOBRE ANTROPOIDES MODERNOS E SUA FILOGENIA	23
1.2	GENÔMICA COMPARATIVA DE PRIMATAS.....	29
1.3	COMPLEXO PRINCIAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE...	29
2	OBJETIVOS	39
2.1	OBJETIVO GERAL	39
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	41
3.2	COMPILAÇÃO DE SEQUÊNCIAS - DESCRIÇÃO E ANÁLISES	43
4	RESULTADOS	45
5	DISCUSSÃO	47
6	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O projeto do genoma humano revolucionou diversas áreas de estudo, tais como biológicas, médicas, tecnológicas, entre outras. Muitos destes avanços também envolvem um contexto evolutivo na interpretação e construção, através dessas descobertas, de hierarquias filogenéticas nas espécies de primatas em nível molecular.

Com o sequenciamento do genoma completo de diversas espécies de primatas, novas análises e interpretações (além de uma adaptação) sobre a evolução do genoma humano foi iminente, auxiliando entre outras áreas, nos avanços biomédicos e novas descobertas taxonômicas (Perelman et al., 2011). Goodman (et al., 1998) e Wilson e Reeder (2005) defendem que cerca de 68 gêneros de primatas possuem um ancestral comum durante o período Cretáceo/ Paleoceno (80 a 90 milhões de anos atrás). O número de espécies em primatas é um pouco controverso, estando numa faixa entre 261 a 377 (Goodman et al., 1998; Groves, 2001; Wilson e Reeder, 2005). Em 2011, Perelman e colaboradores publicaram uma extensa análise utilizando 186 espécies de primatas representativos dos gêneros descritos e reconstruíram as relações filogenéticas com base em análises de marcadores uniparentais (cromossomo Y e mtDNA) e marcadores biparentais (54 regiões gênicas autossômicas) e apresentaram a mais conclusiva árvore de relação evolutiva entre as espécies de primatas atuais, totalizando 70 gêneros.

Na expansão do Período Eoceno, teve-se a formação das principais linhagens existentes dos grupos de primatas (Perelman et al., 2011), Strepsirrhini: Lorisiformes, Chiromyiformes e Lemuriformes; Haplorrhini: Tarsiiformes e Simiiformes; Simiiformes onde estão as parvordens de Platyrrhini, Macacos do Novo Mundo e de Catarrinos,

que inclui os Macacos do Velho Mundo, humanos, grandes macacos e gibões) (Figura 1).

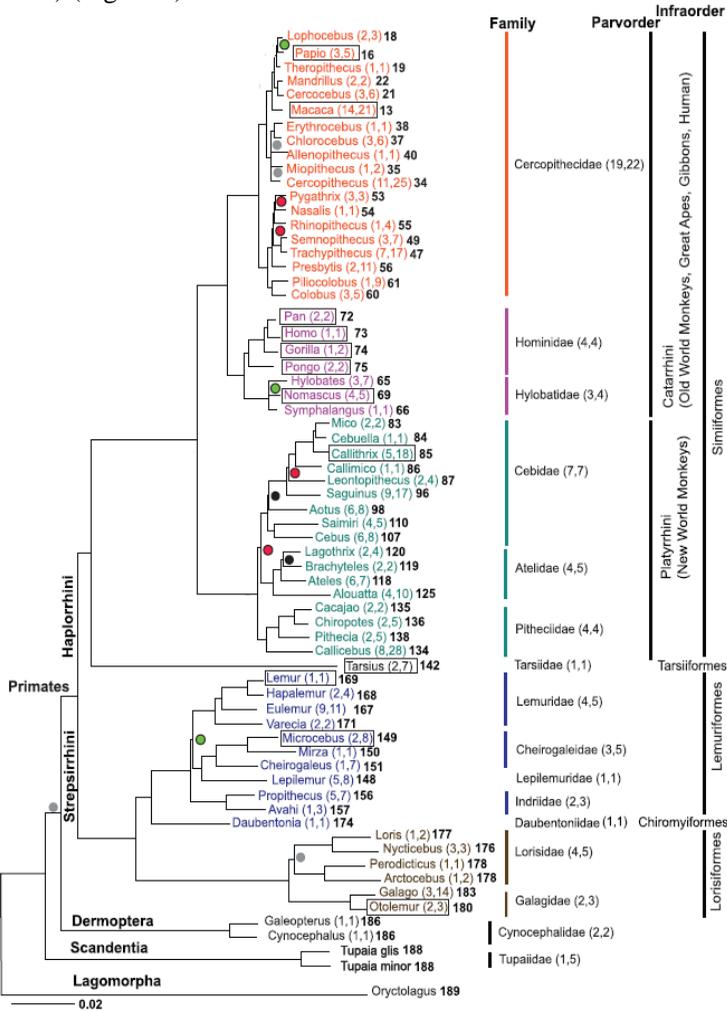


Figura 1 - Filogenia molecular da ordem dos Primatas. Entre parênteses estão representados o número de espécies ou gêneros utilizados, seguido pelo número de espécies ou gêneros descritos. Os boxes indicam os gêneros nos quais pelo menos uma espécie teve o genoma completo sequenciado (Perelman et al., 2011).

1.1 SOBRE ANTROPOIDES MODERNOS E SUA FILOGENIA

Os Catarrhini (macacos do Velho Mundo) são primatas de aspectos semelhantes aos humanos, também chamados de antropoides modernos. Apresentam narinas voltadas para frente e para baixo; uma abertura óssea nasal no crânio pequena, cauda geralmente curta ou ausente (sem evolução de cauda pênsil). Os registros mais antigos estão no Mioceno (Período Terciário), mas é importante ressaltar que ao final do Mioceno e no início do Plioceno houve uma importante redução da diversidade de símios generalizados e suas formas semelhantes. A radiação dos primatas é mais derivada (de modo geral) e mais bem sucedida quando comparada em variedade de espécies (Pough et al., 2008; Fleagle, 2013).

Mesmo tendo dentes mais especializados à herbivoria, os Catarrhini são onívoros: alimentam-se de frutos, flores e sementes, mas insetos e pequenos vertebrados estão incluídos na dieta. Apresentam algumas especializações do aparelho digestório (necessitam de um aparelho digestivo de maior comprimento para que as fibras vegetais possam ser digeridas) (Marques, 2006).

A parvordem Catarrhini inclui as famílias Cercopithecidae (babuínos, mandris e rhesus entre outros), Hylobatidae (gibões) e a mais conhecida família Hominidae, onde estão o orangotango, gorila, chimpanzé/ bonobos e os hominídeos, sendo destes últimos *Homo sapiens* a única espécie vivente. A figura 2, obtida de Perelman et al., 2011, apresenta a relação filogenética de Catarrinos, definida por diversos marcadores moleculares.

região da orelha e a abertura óssea nasal comentada anteriormente (Poughet al., 2008).

Os Platyrrhini podem ser divididos em três famílias: Atelidae (conseguem ficar suspensos pela cauda por um modo de locomoção arbórea bastante especializada), Pitheciidae (apresentam especializações dentárias para processar frutas e sementes) e Cebidae (unhas na forma de garras em todos os dedos, exceto polegar). A figura 3 apresenta a relação filogenética de Catarrinos, definida por diversos marcadores moleculares (Fleagle, 2013).



Figura 3 - Relação filogenética entre os primatas da parvordem Platyrrhini. Os números entre parênteses representam o número de gêneros incluídos, seguidos pelo total de gêneros descritos espécies. Em destaque no box o gênero com a única espécie de platirrinos com genoma completo sequenciado (adaptada de Perelman et al., 2011).

Alguns exemplos popularmente identificados de Platyrrhini são os Saguins (*Callithrix*), Mico Leão Dourado (*Leontopithecus*), Macaco da noite (*Aotus*), Macaco de Cheiro (*Saimiri*), Macaco barrigudo (*Lagothrix*), Macaco Aranha (*Ateles*), Bugio (*Alouatta*) e Macaco Prego (*Cebus*).

Uma vez que a nomenclatura biológica visa possibilitar a indexação das informações sobre organismos, revisões importantes são periodicamente realizadas também nos gêneros/ famílias de primatas. Uma das mais recentes mudou o gênero de uma espécie bastante conhecida – o macaco prego – de *Cebus* para *Sapajus* (Guimarães, 2012).

O grupo dos Cebideos tem registros em diferentes Biomas Brasileiros (Amazônia, Cerrado, Caatinga e em toda a Mata Atlântica); existindo evidências do grupo até a Argentina. São bastante singulares, variando em forma, tamanho, cor, comportamento e até preferências alimentares. Possuem um sistema social com alta complexidade e são capazes de usar ferramentas simples, algo bastante incomum entre os primatas (Guimarães, 2012).

Mesmo com essas grandes variações entre espécies, o macaco-prego e caiararas eram classificados no mesmo gênero, *Cebus*, sendo a maioria dos registros científicos com o nome *Cebus apella* (Guimarães, 2012). Considerando que a taxonomia desses primatas seguia o trabalho de naturalistas e com base das novas tecnologias moleculares, sugeriu-se uma nova classificação, com intuito de reorganização do grupo em questão (Alfaro et al., 2012).

Com essa reorganização foram propostos dois grupos, a partir do gênero *Cebus*, um mantendo a mesma nomenclatura para os caiararas, primatas mais esguios e com ampla distribuição na Amazônia para o sentido norte, sugerindo um novo grupo (*Sapajus*) para os macacos-prego, que são mais robustos e muitas vezes caracterizados por apresentarem um topete na cabeça, presentes na Amazônia para o sul (Guimarães, 2012).

Por meio de análises genéticas, essa divisão ampliou-se, mostrando que *Cebus* e *Sapajus* apresentam diferenças a ponto de serem considerados gêneros distintos mesmo possuindo características visuais parecidas (Guimarães, 2012). Estudos mostram que as duas linhagens dividem-se filogeneticamente há cerca de 6 milhões de anos (mesmo tempo do surgimento de chimpanzés e humanos por um ancestral comum) (Alfaro et al., 2012).

A formação do rio Amazonas pode ser responsável pela separação norte-sul que criou uma divergência nos primatas que ali viviam, ramificando o grupo que deu origem a *Cebus* e a *Sapajus*. A cerca de 2 milhões de anos, os macacos que faziam parte do grupo mais robusto dessa ramificação (*Sapajus*) espalharam-se pela mata atlântica sem deixar vestígios ancestrais. A ocupação da costa brasileira foi rápida; há cerca de 700 mil anos essa expansão alcançava uma pequena parte da região norte do Brasil (no cerrado) e toda região sul, chegando até a Argentina. Há cerca de 400 mil anos o grupo dos *Sapajus* voltou para Amazônia, onde teve seu primeiro contato com o grupo dos *Cebus*, mais frequente pela região norte, em torno dos Andes, e chegou à América Central (Guimarães, 2012).

1.2. GENÔMICA COMPARATIVA DE PRIMATAS

O objetivo principal de estudar genomas completos de primatas está essencialmente relacionado à observação e interpretação das anotações genéticas que surgiram desde a separação dos grupos há cerca de 70 mil anos. Estas diferenças são responsáveis, ao longo dos anos, pelas mudanças e divergências e produzem traços únicos entre espécies. Com o passar do tempo, tais modificações podem trazer mudanças morfológicas fenotípicas, como o surgimento de regiões reguladoras envolvendo pequeno número de bases de DNA, ou ainda rearranjos genômicos em larga escala (Rogers e Gibbs, 2014).

Por outro lado, a percepção da conservação de regiões inter e extra gênicas relacionam conclusões de pressão seletiva sobre o genoma e podem elucidar questionamentos sobre o delineamento de genes ao longo da evolução das espécies. Conjuntos genômicos de grandes primatas fornecem notáveis informações sobre origens evolutivas destas espécies e também dos processos envolvidos na formação do genoma humano, considerando diferença e semelhanças que são utilizadas como modelo para investigação relacionada a genes (Enard et al., 2010).

Após a finalização do Projeto Genoma Humano, uma diversidade de conhecimentos sobre a variabilidade genética humana surgiu na comunidade científica especializada. A partir de tais resultados e de outros que sucederam, foi possível utilizar dados de diferentes regiões do genoma para fazer inferências robustas sobre a história demográfica humana comparando com a de outros primatas (Voight et al., 2005; Fagundes et al., 2007) e determinar a estrutura genética das populações a partir de um grande número de polimorfismos representativos do genoma (Li et al., 2008).

Três critérios principais foram considerados para definir a ordem de sequenciamento de primatas não humanos: a posição filogenética com relação a humanos, a utilidade de identificação de elementos regulatórios primata-específicos e a relevância biomédica onde os outros dois critérios tivessem empate. Desta forma, o primeiro grande primata a ter o genoma sequenciado foi o chimpanzé (*Pan troglodytes*) em 2005 (*The Chimpanzee Sequencing and Anaysis Consortium*, 2005), seguido do macaco rhesus (*Macaca mulatta*) em 2007 (Gibbs et al., 2007). Ambos genomas foram analisados utilizando exclusivamente o método de sequenciamento de Sanger (que foca na síntese de cadeias a partir de um fragmento de DNA).

No ano de 2011 foi publicada uma série de sequenciamentos de genomas completos, foram eles: Orangotango (*Pongo abelii*) (Locke et al., 2011), Macaco rhesus chinês e indiano (*M. mulatta*) (Fawcett et al., 2011; Fanget et al., 2011), Macaco cinomolgoso Vietnã (*Macaca fascicularis*) (Yan et al., 2011), lêmure rato (*Microcebus murinus*) (Lindblad-Toh et al., 2011), "Bushbaby" (*Otolemurgarnettii*) (Lindblad-Toh et al., 2011), tarso (*Tarsiussyrichta*) (Lindblad-Toh et al., 2011).

A evolução estrutural do genoma do orangotango tem acontecido muito mais lentamente do que outros grandes macacos. Esta conclusão é evidenciada por menos rearranjos genéticos, menor taxa de duplicação, segmentação e taxa mais baixa de famílias gênicas (Locke et al., 2011). A comparação do genoma completo de chimpanzés com de macaco rhesus (tanto indiano quanto chinês) revela que ambos mantêm heterogeneidade genética bastante alta. Padrões de divergência genética sugerem que o genoma do Macaco cinomolgo do Vietnã pode ter sido moldado após hibridação com o macaco rhesus chinês (Yan et al.,

2011). Com a comparação dos genomas relacionados, Lindblad-Toh e colaboradores (2011) apresentaram o lêmure rato ("Bushbaby") e o tarso, mostrando sobreposição com variantes associados a doenças, o que pode apontar direções importantes nos estudos da biologia humana, da saúde e da doença.

Em 2012, com o sequenciamento do genoma de Bonobo (*Pan paniscus*) e a análise comparativa deste com outros primatas, verificou-se que ao comparar chimpanzés, bonobos e humanos, a proximidade filogenética entre os dois últimos é 3% maior que entre humanos e chimpanzés (Prufer et al., 2012). O autor conclui que isso pode elucidar a base genética de fenótipos que os seres humanos compartilham com outros primatas.

Os gorilas (*Gorilla gorilla*) são parentes vivos mais próximos dos seres humanos após chimpanzés. Scally e colaboradores (2012) mostram indicativos que, considerando cerca de 30% do genoma humano e fazendo uma comparação filogenética com gorila, chimpanzé e humano, os gorilas estariam geneticamente mais próximos de humanos do que chimpanzés. O sequenciamento do genoma destes e futuras análises promoverá uma melhor compreensão de grandes macacos, biologia e evolução.

Após o sequenciamento do genoma completo do aye-aye, feita em 2012 por Perry e colaboradores, foram comparados dados com outros quatro genomas de primatas (humanos, chimpanzés, orangotangos e macaco rhesus) e observou-se uma taxa de substituição relativamente lenta na linhagem aye-aye quando comparada com estes primatas. Parte da explicação pode ser dada pelo padrão de vida do aye-aye, como

desmame e reprodução tardios em relação a outros lêmures (Perry et al., 2012).

O macaco cinomolgo da Malásia (*Macaca fascicularis*) teve seu genoma completo sequenciado em 2012. Como resultados deste sequenciamento, verificou-se que ele têm alta diversidade genética e genes do macaco rhesus intimamente relacionados (*Macaca mulatta*). A comparação de dois cinomolgos (da Malásia e do Vietnã) e dois rhesus (da Índia e da China) sugere que os cinomolgos da China foram mais afetados por introgressão de genes de macacos rhesus, isso pode auxiliar em encontrar diferenças genéticas que são responsáveis pela diversidade fenotípica em macacos (Higashino et al., 2012).

Em 2014 teve-se o sequenciamento do genoma mitocondrial completo do primeiro primata do novo mundo, o Sagui-do-Tufo-Branco (*Callithrix jacchus*), os dados foram depositadas no banco de dados GenBank com o número de acesso de KM588314. Esta sequência mitocondrial relatada pode ser vista como um novo recurso genético para o gênero *Callithrix*, sendo útil para estudos comparativos de genomas em primatas (Wang et al., 2014). Em 2014 foi apresentado também o sequenciamento de genoma completo do *Callithrix jacchus*. As comparações desse genoma com os genomas dos macacos do velho mundo (Catarrhini) disponíveis, identificaram aspectos antes não detectados na evolução gênica, incluindo uma porção significativa de segmentos conservados que anteriormente não estava devidamente identificada. O genoma exibe uma série de características únicas, tais como mudanças na expressão de microRNAs (expressos na placenta) e alterações em genes codificadores de proteínas envolvidas na fisiologia reprodutiva, que podem estar relacionados a formação de gêmeos ou

quimerismo bastante comum na espécie (*The Marmoset Genome Sequencing and Analysis Consortium*, 2014).

A partir das informações obtidas com estes grandes projetos de sequenciamento foi desenvolvido um importante poder de anotação genômica em cada uma e entre as espécies analisadas, revelando elementos que foram alterados na evolução das mesmas. A comparação entre as diferentes espécies de grandes primatas tem sido um extenuante exercício de interpretação da variação *versus* conservação. Em breve outros primatas terão seus genomas completos sequenciados e esta poderá ser a chave para o refinamento das interpretações e hipóteses evolutivas.

Embora seja uma espécie extinta, foi muito importante o sequenciamento do genoma completo de *Homo neanderthalensis*. É possível inferir que existiam relacionamentos de consanguinidade na espécie e o cruzamento entre parentes próximos era comum entre seus antepassados. Recentemente considerado filogeneticamente diferente de *H. sapiens* e *H. neanderthal*, Denisova ficou conhecido por ter o genoma completamente sequenciado, ainda que por falta de informações morfológicas não tenha sido possível descrever a espécie. Uma análise histórica das relações da população mostra que vários eventos de fluxo gênico ocorreram entre os *Homo neanderthal*, Denisovae humanos modernos, incluindo possivelmente o fluxo gênico em Denisovanos de um grupo arcaico desconhecido. Desta maneira, cruzamentos, embora poucos ocorreram entre muitos grupos de homínídeos no final do Pleistoceno. Além disso, o genoma de *H. neanderthal* nos permite estabelecer uma lista definitiva de substituições fixadas em seres

humanos modernos após sua separação dos ancestrais *Homo neanderthale* Denisova (Prüfer et al., 2014).

1.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) apresentam uma série de detalhes que chamam a atenção para estudos de adaptação e seleção em espécies, uma vez que a quantidade de informações presentes nesses genes traz uma gama de informações, podendo assim fazer análises comparativas em indivíduos diferentes de uma mesma espécie ou análises comparativas em grupos diferentes (Bernatchez e Landry, 2003).

O MHC foi descrito pela primeira vez em 1936 a partir de camundongos em estudos relacionados a transplante de tecido. Caracterizando as primeiras moléculas como antígenos polimórficos de superfície celular (codificadas pelo *locus* H-2), alguns dos resultados disso constituíram a barreira imunológica, e com isso, o sucesso dos transplantes dependeria da similaridade doador/ receptor H-2 para antígenos chamados "antígenos de histocompatibilidade". Após esses estudos, complexos gênicos similares foram descritos em espécies de mamíferos, mostrando resultados muito próximos, codificando produtos moleculares da resposta imune (Hunham et al., 1987; Christiansen et al., 1993; Croua-Roy et al., 1994).

Localizado no cromossomo humano 6, são encontradas três diferentes regiões do MHC (figura 4) nomeadas como: Classe I, Classe II e Classe III (Pirri, 2006). Considerando que genes de mesma região do MHC podem receber diferentes nomenclaturas dependendo do grupo de estudo em questão, HLA – humanos, Patr – chimpanzé, DLA – cachorros, B – galinha, RT1 – ratos, H-2 - camundongos, Mamu – macacos rhesus, Caja – *Callithrix jacchus*, FLA – gatos,

(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>) apenas para citar alguns exemplos, a descrição a seguir será exemplificada tendo como exemplo a região do MHC humano (HLA).

Os genes Classe I são localizados na região mais telomérica do sistema HLA e possuem vários éxons (com íntrons intercalados), que formam a cadeia polipeptídica dos receptores glicoprotéicos (presente na membrana de células nucleadas ou em formas solúveis), constituídos por uma região extracelular de ligação a antígenos, um segmento citoplasmático e uma região transmembranar (Malissen et al., 1982).

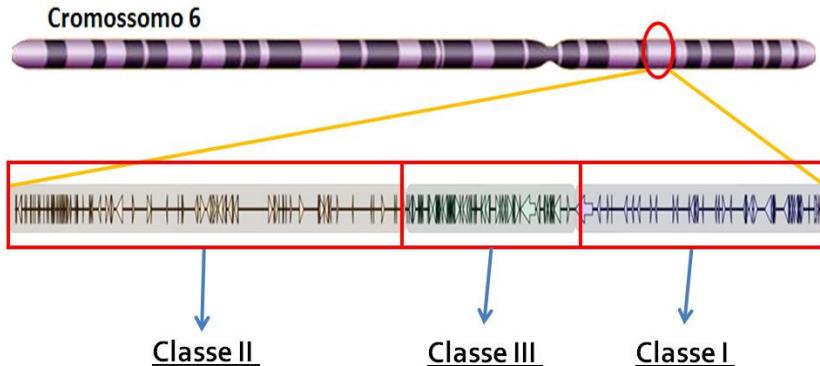


Figura 4 – Mapa genômico do MHC Humano (HLA), identificando as diferentes regiões gênicas (mostrando a posição no cromossomo 6 e os genes dentro dos loci (Fonte: <http://www.iayork.com/Images/XPlasMap/HLA.PNG>).

A região de Classe II apresenta uma organização mais complexa, onde as moléculas ali presentes são codificadas por diferentes *loci* e mapeados na região *HLA* do MHC; isso resulta em uma grande variabilidade estrutural para essas moléculas, exibindo uma distribuição restrita apenas em células endoteliais de vênulas ou capilares, linfócitos B, macrófagos e monócitos (Pirri, 2006).

A região de Classe III está entre as regiões e Classe I e Classe II, apresenta 59 genes. Possui densidade gênica maior do que quando comparada as outras regiões do MHC. Foram definidos alguns genes que atuam no processo de ativação do sistema complemento (Bf, C2, C4A, C4B), envolvidos com citocinas e genes atuantes para susceptibilidade a doenças (Doença de Graves, Doença de Crohn, e outras) (Matsuzaka et al., 2001).

O *HLA-G* é um gene de classe I e apresenta 8 éxons e 7 íntrons em sua extensão. Nos éxons 2 e 3 são encontrados os polimorfismos que codificam para as estruturas moleculares onde há um sítio de ligação para os antígenos (Malissen et al., 1982). É possível a formação de sete isoformas de proteínas providas do processamento alternativo após a transcrição do mRNA, quatro delas ligados à membrana (HLA-G1, G2, G3, G4) e três solúveis (G5, G6, G7), isso resulta numa variação na funcionalidade de nucleotídeos das regiões reguladoras, ocasionando expressão diferencial desse *locus* (Castelli et al., 2011).

No gene *HLA-G* existem algumas peculiaridades que o distinguem dos outros genes de classe I. Tendo uma estrutura molecular diferenciada, proporciona uma apresentação do antígeno mais restrita, o que permite uma modulação celular do sistema imune (células NK, entre outras), pode também, funcionar como uma molécula tolerogênica e imunossupressora (Donadi et al, 2011).

Com função fisiológica na participação da tolerância entre células maternas e fetais no contexto placentário (Yao et al., 2005), o *HLA-G* está envolvido na etiopatologia de diversas doenças; em primatas humanos existe uma forte presença imunológica em infecções virais (citomegalovirus, HIV, hepatite B/C), incompatibilidade ou rejeição de

órgãos em transplantes, neoplasias e doenças autoimunes (esclerose sistêmica/múltipla, artrite reumatoide, diabetes *mellitus* do tipo I e lúpus eritematososistêmico) (Carosella et al., 2008).

Por apresentar regulação da resposta imune, associação na inibição de células T e função citológica das células NK, inibição da proliferação de células T alogênicas, o *HLA-G* tem sido associado com o resultado (rejeição) de aloenxertos e doenças autoimunes (também doenças infecciosas ou de desordens malignas) (Castelli et al., 2011).

Em processos de transplantes, por sua ativação e expressão, acaba suprimindo a modulação da resposta imune, gerando assim, uma melhor aceitação a enxertos, com isso, tem-se um melhor controle a rejeições agudas e/ou crônicas, e um auxílio na proteção de processos inflamatórios (Lila et al., 2000; Lila et al., 2002).

A análise da variabilidade de homólogos da região *MHC-G* em primatas contribui para a compreensão das diferentes forças evolutivas às quais o gene está submetido. No momento, poucos dados na literatura estão disponíveis acerca da variabilidade deste gene para primatas do velho mundo (chimpanzés, gorila e orangotango) e apenas uma espécie (*C. jacchus*) dos 16 gêneros de primatas neotropicais teve seu genoma sequenciado. Os poucos dados disponíveis contrastam com dados sobre a variabilidade dessas regiões em humanos (Kono et al., 2014).

Diante do exposto anteriormente, pode-se dizer que os resultados obtidos na investigação proposta neste trabalho permitirão a melhor compreensão dos padrões de diversidade do gene *MHC-G*, visando a inclusão desses resultados em consistentes estudos de relações filogenéticas entre indivíduos de uma mesma espécie ou entre grupos de espécies distintas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Construir a relação filogenética do gene *MHC-G* em primatas humanos e não humanos, com informações compiladas a partir de revisão bibliográfica, visando compreender a evolução do gene *MHC-G* dentro das parvordens Catarrhini e Platyrrhini.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Selecionar bibliografia pertinente a partir de diversos bancos de dados públicos e da literatura especializada utilizando palavras-chave relacionadas ao estudo evolutivo do gene *MHC-G* em primatas não humanos e humanos;
- ✓ Implementar alinhamentos comparativos de sequências disponíveis em bancos de dados indexados;
- ✓ Verificar a análise filogenética do gene *MHC-G* da região MHC Classe I em primatas das parvordem Platyrrhini e Catarrhini.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Acessando o *site* PubMed - US *National Library of Medicine National Institutes of Health* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), foi utilizado o termo "*primate complete genome*", localizando os artigos referentes aos primatas que tem seu genoma completo, os quais foram estudados e usados como referência no presente trabalho.

Os principais artigos relacionados ao *MHC-G* também estavam disponíveis no *site* PubMed e foram localizados usando o próprio termo como busca "*MHC-G*".

Demais artigos fizeram parte dessa revisão utilizando termos isolados como "*HLA-G*", "*primates*", ou inserindo o próprio nome científico de cada espécie no mecanismo de busca do mesmo *site*, os artigos foram devidamente lidos, verificando se o conteúdo e assunto em questão poderiam fazer parte ou adicionar informações relacionadas ao tema abordado.

A busca por identificadores chave no PubMed resultou inicialmente em dados volumosos de informações publicadas. Por exemplo, o termo "*primates*" retornou 13.932.809 resultados e a busca refinada para cada uma das parvordens diminuiu esses valores em Catarrhini (29.253) e Platyrrhini (116). Por outro lado, a busca booleana do termo misto "*primates complete genome*" retornou quinze registros específicos.

Inserindo o termo "MHC" a busca resultou em 57.430 artigos indexados, porém os resultados apurados para "*MHC-G*" reduziram a 19 registros. Cabe ressaltar que a busca considera presença e ausência do traço espaçador e é não sensível ao caractere, ou seja, independe de fonte tipográfica maiúscula ou minúscula. Se for adicionado o termo

“*HLA-G*”, os números aumentam consideravelmente (1.851), mas é importante considerar que o PubMed inclui todos estes na categoria “MHC” pois a busca não é textual, mas sim baseada na busca avançada de gerenciamento por palavras-chave registradas no acesso primário de indexação (PMID).

3.2 COMPILAÇÃO DE SEQUÊNCIAS –DESCRIÇÃO E ANÁLISES

Sequências foram compiladas a partir da base de dados do IPD (*Immuno Polymorphism Database*) (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>), a partir da qual foram extraídas todas aquelas depositadas para primatas humanos e primatas não humanos, mantendo a nomenclatura proposta para as espécies descritas abaixo (entre parênteses o número de sequências utilizadas, seguido do número de sequências disponíveis no IPD):

<i>Homo sapiens</i>	Humano (n = 31/ 50)
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé (n = 1/1)
<i>Pan paniscus</i>	Bonobo(n = 1/1)
<i>Gorilla gorilla</i>	Gorila(n = 1/1)
<i>Macaca fascicularis</i>	Macaco-cinomolgo (n = 10/10)
<i>Macaca mulatta</i>	Macaco rhesus (n = 4/4)
<i>Chlorocebus aethiops</i>	Macaco verde africano (n = 2/2)
<i>Aotus trivirgatus</i>	Macaco da noite (n = 1/3)
<i>Ateles belzebuth</i>	Macaco-aranha (n = 1/3)
<i>Ateles fusciceps</i>	Macaco-aranha-castanho (n = 8/9)
<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui-de-tufos-brancos (n = 18/59)
<i>Leontopithecus rosalia</i>	Mico-leão-dourado (n = 2/2)
<i>Pithecia pithecia</i>	Parauaçu (n = 4/4)
<i>Saguinus fuscicollis</i>	Sagui-de-cara-suja (n = 4/4)
<i>Saguinus labiatus</i>	Sagui-de-boca-branca (n = 13/13)
<i>Saguinus oedipus</i>	Sagui-cabeça-de-algodão (n = 8/11)
<i>Saimiri sciureus</i>	Macaco de cheiro (n = 1/1)

Para as análises comparativas foram localizados os arquivos FASTA de *MHC-G* dos primatas que possuíam o gene do *MHC-G* sequenciado.

As sequências foram alinhadas e editadas com auxílio do programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Após o alinhamento, as sequências foram exportadas para o programa MEGA6 (Tamura et al., 2013) com o qual foram construídas relações filogenéticas entre as linhagens, utilizando-se o método *Neighbor-Joining* a partir das estimativas de distâncias evolutivas baseadas nos modelos de substituição nucleotídica Kimura-

dois-parâmetros, que assume taxas diferentes entre transições e transversões.

4 RESULTADOS

Foram compiladas 351 sequências de primatas, das quais apenas 108 apresentavam qualidade ou tamanho de segmento satisfatório para o alinhamento. A sequência considerada referência para o alinhamento foi a correspondente ao alelo humano HLA G*01:01:01:01 (com 1017 pares de bases nucleotídicas). A árvore filogenética foi construída utilizando 34 sequências da família Hominidae, 16 da família Cercopithecidae (ambas da parvordem Catarrhini). Representando a parvordem Platyrrhini, foram utilizadas 46 sequências de espécies da família Cebidae, 8 da família Atelidae e 4 da família Pitheciidae. A árvore filogenética molecular obtida está representada na Figura 5.

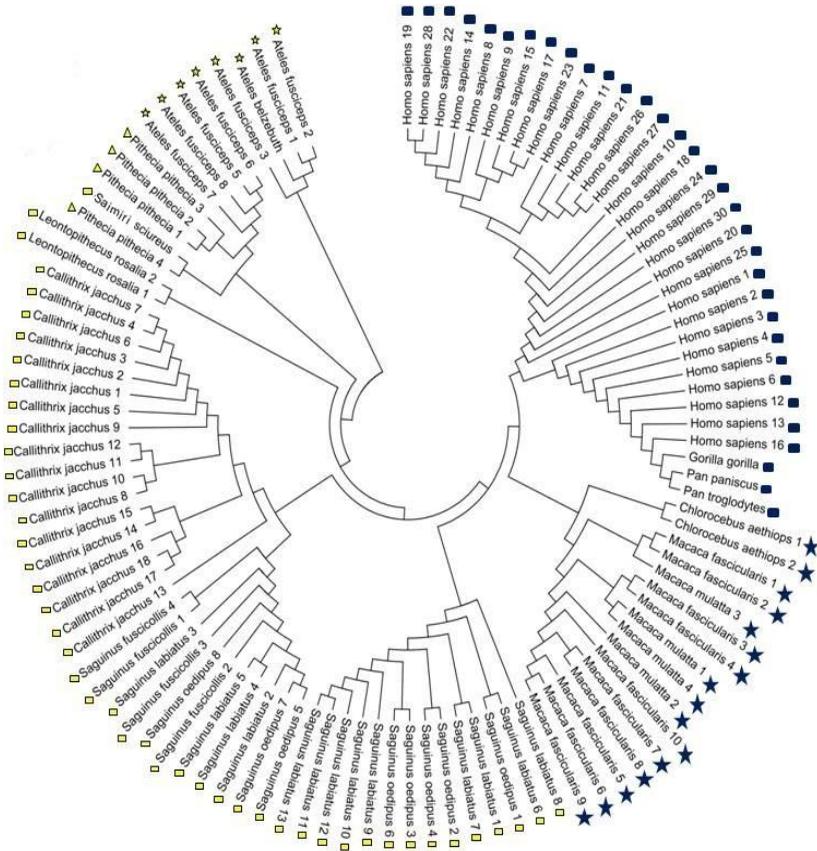


Figura 5 – Relação filogenética do gene *MHC-G* em primatas humanos e não humanos, utilizando o método de *Neighbor Joining* a partir das distâncias evolutivas do modelo de substituição nucleotídica Kimura-dois-parâmetros. Os símbolos azuis indicam seqüências de catarrinos (Quadrado – Família Homínidae; Estrela – família Cercopithecidae) e os símbolos amarelos indicam as seqüências de platirrinos (quadrado – Família Cebidae; Estrela – família Atelidae; triângulo – família Atelidae)

5 DISCUSSÃO

A comparação filogenética (figura 5) evidencia uma clara separação entre catarrinos e platirrinos, em acordo com o descrito na literatura (Fleagle, 2013). Esta separação aconteceu há cerca de 38 milhões de anos, embora possa parecer confuso, uma linhagem de primatas do Novo Mundo originou os primatas do Velho mundo e os antropoides modernos (Fleagle, 2013).

Como indicado na legenda da figura, as famílias Cebidae (representadas por quadrados amarelos), Atelidae (representada por estrelas amarelas) e Pitheciidae (representada por triângulos amarelos) formaram cada uma delas *clusters* bem definidos, com exceção da única sequência da espécie *Saimiri sciureus* que se agrupou ao indivíduo *Pithecia pithecia* 4. Ao localizar o macaco de cheiro (*S. sciurus*) na árvore filogenética verifica-se que este pertence a um gênero da família Cebidae mais basal que os saguinos e calitriquídeos, gêneros aos quais pertencem as outras espécies cujas sequências foram compiladas. Desta forma, é mais parcimonioso pensar em agrupamentos por similaridade com grupos basais (neste caso *Pitheciidae*) do que com os mais derivados (*Saguinus* e *Callithrix*).

O *Saguinus oedipus* (sagui-cabeça-de-algodão) apresenta tufo de pelos brancos que se estendem do topo da cabeça até o pescoço (Burton, 2002), habita a região central sul-americana (Panamá, Colômbia e Costa Rica) (Castelli et al., 2011), e artigos anteriores indicaram que este possui genes funcionais do *MHC-G* funcionando como *MHC-A* e *MHC-B*, com sequências de *MHC-C* deletadas e podendo interagir com genes *KIR* (Receptor de Células "Killer Immunoglobulin-like") (Watkins et al., 1990a).

S.oedipus apresenta uma maior homologia com o *HLA-G* do que com MHC clássicos de classe I (Watkins e Letvin et al.,1990b; Watkins et al., 1990a). Arnaiz-Villena (1999) e Parga-Lozano (2009) e seus respectivos colaboradores propõem que o *HLA-G* pode ser o gene ancestral do MHC de classe I, e que o MHC no *Saguinus oedipus* pode apresentar uma grande homologia com o *locus* do *HLA-G*. Também foi visto sob outra perspectiva, que o *MHC-E* pode ser mais semelhante ao MHC de primatas do Novo Mundo quando o *MHC-E* é analisado junto com o *MHC-G*.

MHC-G mostra uma sequência de pares de bases bastante conservadas (considerando as espécies de primatas estudadas); uma pequena deleção está presente entre as posições 161 e 183 (23 pb) (Arnaiz-Villena, 1997 e 1999). De acordo com Diehl (1996), existem duas explicações viáveis e possíveis para o ocorrido: 1 - a sequência de *MHC-G* descrita nos primatas pode não ter dado origem para os macacos do Velho Mundo ou alelos do *MHC-G* humano; 2 - a deleção de 23 pb pode ter ocorrido depois de acontecer a separação do Novo Mundo/Velho Mundo (cerca de 38 milhões de anos atrás). Com melhor aceitação científica, a primeira explicação mostra-se mais viável, uma vez que peptídeos do *S. oedipus* referentes a moléculas de *MHC-G* não são (tipicamente) iguais ao *MHC-G* classe I.

Existem moléculas muito parecidas (no sentido funcional) e que podem se portar como o *MHC-G* em espécies de macacos que se separaram da linhagem humana; os alelos do *MHC-G* apresentam um polimorfismo no receptor de células T, de células NK e em locais de ligação de antígenos, o que deixa bastante provável que a função do

MHC-G para os macacos do Novo Mundo seja similar ou muito parecido com o HLA de classe I clássico (Castelli et al., 2011).

Recentemente, Kono e colaboradores (2014) publicaram o primeiro artigo com resultados de *MHC-G/F* (denominado *Caja*) para Primatas do Novo Mundo, analisando *Callithrix jacchus*, uma espécie que ganhou muita atenção e importância nos estudos experimentais com animais devido ao pequeno porte, facilidade de manipulação, tempo curto entre as gerações e gastos diminuídos quando comparado com outras espécies primatas utilizadas em laboratórios (como chimpanzés, orangotangos ou gorila). Os autores sequenciaram um segmento de 854.000 bases e verificaram que nesta espécie não existe um, mas 25 genes *Caja G/F*, sendo 19 funcionais e os demais pseudogenes. Esta diversidade genômica é explicada por sucessivos eventos de duplicação de unidades segmentadas consistentes de cinco genes *MHC*, seguidos de subsequentes expansões/ deleções de genes. As análises filogenéticas indicaram que *Caja-G* evoluiu depois da divergência de Catarrhini, sendo que os calitriquídeos estão entre os gêneros mais derivados da família Cebidae.

Dois *clusters* são formados incluindo saguinos (tanto *Saguinus labiatus* quanto *S. fuscicolis* e *S.oedipus*), mas todas as sequências de *Callithrix jacchus* foram organizadas em um único agrupamento, mas com muitas subdivisões internas, salientando a variabilidade das espécies.

Para os macacos do Velho Mundo, grupos de macacos viventes na África e Eurásia, os alelos *MHC-G* de *M. fascicularis*, *M. mulata* e *C. aethiops* mostram uma particularidade nos códons de paradas, presentes numa zona do éxon 3 bastante restrita (códons 164, 133, 118 e 176)

(Castro, 1996). Os sítios aloantigênicos mostraram-se preservados para todas as espécies estudadas, o que pode ser um forte indício para provar a funcionalidade do *MHC-G*, considerando que o *MHC-G* preserva o feto numa gestação normal do ataque de células NK maternas, favorecendo o sucesso reprodutivo ao longo da evolução dos primatas (Fernandez-Soria, 1998; Peltola, 1994).

Dentro do agrupamento filogenético obtido no presente estudo para o *cluster* de Primatas do Velho Mundo, há uma divisão evidente entre Hominidae (humanos, gorila, chimpanzé e bonobo) e Cercopithecidae (macacos rhesus e macaco verde).

O gene *MHC-G* não se mostrou um bom indicador filogenético para organizar a hierarquia dentro das famílias, como em *Hominidae*. Na árvore filogenética gerada, as duas espécies de chimpanzés (*Pan paniscus* e *Pan troglodytes*) e o gorila (*Gorilla gorilla*) são indicadas como mais recentes que todas as sequências de *Homo sapiens*, o que está em desacordo com o conhecimento mais atual que situa *Homo sapiens* como a espécie mais derivada, tendo o gênero *Pan* com grupo irmão e *Gorilla* como externo. Porém, antes de concluir o poder de decisão do gene, é muito importante ressaltar que apenas uma sequência de cada uma destas espécies (chimpanzés e gorila) foi incluída no alinhamento, polarizando o poder de agrupamento em *Homo sapiens* pela quantidade de alelos variantes.

Entre os *Cercopithecidae* é importante ressaltar que a distância entre *Chlorocebus* e *Macaca* é suficiente para separar dois grupos, mas as espécies *Macaca fascicularis* e *Macaca mulatta* ainda tem nós (*nodes*) com agrupamentos múltiplos. Isto pode ser devido à variabilidade dentro de cada uma das espécies que pode não estar representada na amostra,

destacando que não apenas as diferenças filogenéticas devem ser consideradas, mas também a quantidade de variação entre indivíduos da mesma espécie.

A utilização de genes da região MHC como marcadores de tempo de divergência entre alelos e distância entre espécies vem se mostrando eficiente à medida que aumenta o conhecimento da variabilidade destas regiões. Os genes MHC são modelados constantemente por processo demográficos e ação das forças evolutivas (mutação, migração, deriva genética e seleção natural), o que explica os diversos padrões de variação.

Embora muitas espécies de primatas não humanos e a espécie atual de humanos tenham o genoma completamente elucidado, é preciso aumentar o número de amostras sequenciadas para identificar o poder das variações intra-específicas nas relações filogenéticas. Grande parte das sequências depositadas no IPD para primatas não humanos são resultantes do esforço de Cadavid e colaboradores, publicado em 1997. Novos sequenciamentos devem ser realizados, tanto para aumentar o tamanho do segmentos investigado quanto a variabilidade nos indivíduos de cada espécie, levando em consideração as recentes informações de quimerismo ou duplicação de genes.

Mais amostras de indivíduos da parvordem Catarrhini devem ser adicionadas e também é essencial aumentar o número de espécies estudadas para cada um dos 16 gêneros das três famílias de Platyrrhini e das infraordens externas como Tarsiiformes, Lemuriformes e Lorisiformes, entre outros.

6 REFERÊNCIAS

ALFARO, J. W. et al. **How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*.** American Journal of Primatology 74.4: 273-286. 2012

ARNAIZ-VILLENA, A. et al. **Primate MHC-E and -G alleles.** Immunogenetics 46:251–266. 1997.

ARNAIZ-VILLENA, A. et al. **Evolution of *MHC-G* in primates: a different kind of molecule for each group of species.** Journal of Reproductive Immunology 43:111–125. 1999.

BURTON, R. **Pinchétamarin.** Marshall Cavendish International Wild life Encyclopedia Volume 19. Ed. Burton, M. Marshall Cavendish. 2002.

CAROSELLA E. D. et al. **Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule.** Blood; 111(10):4862–70. 2008.

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

CASTRO, M. J. et al. **Allelic diversity at the primate *MHC-G* locus: exon 3 bears stop codons in all Cercopithecinae sequences.** Immunogenetics 43:327–336. 1996.

CHIMPANZEE SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. **Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome.** Nature 437, 69–87. 2005.

CHRISTIANSEN, O.B. et al. **Prognostic significance of maternal DR histocompatibility type Danish women with recurrent miscarriages.** Human Reproduction, Oxford, UK, v. 8, n. 11, p. 1843-1847. 1993.

DIEHL, M. et al. **Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters.** Current Biology 6:305–314. 1996.

DONADI, E. A. et al. **Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 68, p. 369-395. 2011.

ENARD, D. et al. **Human and non-human primate genomes share hotspots of positive selection.** PLOS genetics 6.2: e1000840. 2010.

FAGUNDES N. J. et al. **Statistical evaluation of alternative models of human evolution.** Proceedings of the Natural Academy of Sciences, 104 (45): 17614-17619. 2007.

FANG, X. et al. **Genome sequence and global sequence variation map with 5.5 million SNPs in Chinese Rhesus macaque.** Genome Biol. 12, R63. 2011.

FAWCETT, G. L. et al. **Characterization of single nucleotide variation in Indian-origin rhesus macaques (*Macaca mulatta*).** BMC Genomics 12, 311. 2011.

FERNANDEZ-SORIA, V. M. et al. **Transcription and weak expression of HLA-DRB6: a gene with anomalies in exon 1 and other regions.** Immunogenetics 48:16–21. 1998.

FLEAGLE, G.F. **Primate Adaptation & Evolution.** 3^a edição, Academic Press. 2013

GIBBS, R. A. et al. **Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome.** Science 316, 222–234. 2007.

GOODMAN, M. et al. **Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence.** Molecular Phylogenetics and Evolution 9: 585–598. 1998.

GROVES, C.P. **Primate taxonomy.** Washington, DC: Smithsonian Institution Press. 2001.

GUIMARÃES, M. **Ramificações ancestrais.** Pesquisa FAPESC 196. 2012.

- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic acids symposium series. Vol. 41. 1999.
- HIGASHINO, A. et al. **Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome.** Genome Biology. 13, R58. 2012.
- HUNHAM, I. et al. **Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel eletroforesis.** Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, Washington, v. 84, p.7235. 1987.
- KONO, A. et al. **Genomic sequence analysis of the MHC class IG/F segment in common marmoset (*Callithrix jacchus*).** The Journal of Immunology 192.7: 3239-3246. 2014.
- LI, J. Z. et al. **Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation.** Science, 319 (5866): 1100-1104. 2008.
- LILA, N. et al. **Human leukocyte Antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection.** Circulation, Hagerstown, v. 105, n. 16, p. 1949-1954. 2002.
- LILA, N. et al. **Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance.** The Lancet, New York, v. 355, p. 2138. 2000.
- LINDBLAD-TOH, K. et al. **A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals.** Nature 478, 476–482. 2011.
- LOCKE, D. P. et al. **Comparative and demographic analysis of orangutan genomes.** Nature 469, 529–533. 2011.
- MALISSEN, M. et al. **Exon/ intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene.** Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 79: 893–897. 1982.
- MARQUES, K. L. S. **Aspectos do repertório vocal de *Cebus apella* emitidos em cativeiro.** TCC. UFPR, Belém.2006.

MATSUZAKA, Y. et al. **New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region.** Tissue Antigens, Copenhagen, v. 57, n. 5, p. 397-404. 2001.

PARGA-LOZANO, C. et al. **Evolution of major histocompatibility complex G and C and natural killer receptors in primates.** Human Immunology 70:1035–1040. 2009.

PELTOLA, M. et al. **Characterization of a point mutation in aspartylglucosaminidase gene: evidence for a readthrough of a translational stop codon.** Human Molecular Genetics 3:2237–2242. 1994.

PERELMAN, P. et al. **A molecular phylogeny of living primates.** PLOS Genetics 7.3: e1001342. 2011.

PERRY, G. H. et al. **A genome sequence resource for the aye-aye (*Daubentonia madagascariensis*), a nocturnal lemur from Madagascar.** Genome Biology and Evolution 4, 126–135. 2012.

PIRRI, A. **Polimorfismo de HLA-G e sua relação com o transplante renal.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

POUGH, F. H. et al. **A vida dos vertebrados.** 4ed, 2008.

PRUFER, K. et al. **The bonobo genome compared with the chimpanzee and human genomes.** Nature 486, 527–531. 2012.

PRÜFER, K. et al. **The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains.** Nature 505.7481: 43-49. 2014.

ROGERS, J. e GIBBS, R. A. **Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics.** Nature Reviews Genetics. 2014.

SCALLY, A. et al. **Insights into hominid evolution from the gorilla genome sequence.** Nature 483, 169–175. 2012.

SEQUENCING, THE MARMOSET GENOME, AND ANALYSIS CONSORTIUM. **The common marmoset genome provides insight**

into primate biology and evolution. Nature Genetics 46.8: 850-857. 2014.

TAMURA, K. et al. **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** Molecular biology and evolution 30.12: 2725-2729. 2013.

VOIGHT, B. T. et al. **Interrogating multiple aspects of variation in a full resequencing data set to infer human population size changes.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 102 (51): 18508-18513. 2005.

WANG, W. et al. **The complete mitochondrial genome of white-tufted-ear marmoset, *Callithrix jacchus* (Primates: Callitrichinae).** Mitochondrial DNA 0: 1-2. 2014.

WATKINS, D. I. et al. **Evolution of the MHC class I genes of a New World primate from ancestral homologues of human non-classical genes.** Nature 346:60–63. 1990a.

WATKINS, D. I. et al. **Molecular cloning of cDNA that encode MHC class I molecules from a New World primate (*Saguinus oedipus*). Natural selection acts at positions that may affect peptide presentation to T cells.** The Journal of Immunology 144:1136–1143. 1990b.

WILSON, D.E. e REEDER, D. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference.** Baltimore: Johns Hopkins University Press. 2142 p. 2005.

YAN, G. et al. **Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques.** Nature Biotech. 29, 1019–1023. 2011.

YAO Y. Q. et al. **Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses.** The Journal of Immunology; 175(12):8379–85. 2005.