

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA

PIB-S/0016/2008

Polimorfismo do gene de TNF-alfa em pacientes com Lúpus
Eritematoso Sistêmico na Amazônia

Bolsista: Victor Manabu Yano, CNPq

MANAUS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0016/2008

Polimorfismo do gene de TNF-alfa em pacientes com Lúpus
Eritematoso Sistêmico na Amazônia

Bolsista: Victor Manabu Yano, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos

MANAUS

2009

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Título: “Polimorfismo do gene TNF α em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico na Amazônia”

Número do projeto: PIB-S/0016/2008

Renovação: Não

Orientador: Luiz Fernando de Souza Passos

Bolsista: Victor Manabu Yano, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos

Bolsista: Victor Manabu Yano, CNPq

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença multi-sistêmica, ou seja, acomete a pele, rins, articulações, sistema nervoso. Ela também é auto-imune, poligênica de origem desconhecida. Esta possui diversos fatores que podem desencadear a doença, como fatores exógenos (luz solar, drogas) e endógenos (defeito na apoptose, hormônios sexuais), onde estes fatores podem interagir entre si. Por esta doença ser poligênica há diversos genes envolvidos, entre eles o do TNF α , que está localizado na região centrômero do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe III, no cromossoma 6 (6p21.3). Esta citocina, TNF α ela possui diversas funções no organismo, como por exemplo o início, regulação e perpetuação da atividade inflamatória. No LES, o TNF α , estão em níveis elevados, podendo assim estar envolvido com a atividade da doença. O bloqueio da sua eliminação pode estar relacionado no aumento da apoptose. Estudos mostram que o alelo TNF α -308A pode estar associado com aumento na atividade de transcrição e nos níveis de TNF. Indivíduos que carregam G/A tem aumento no RNAm de TNF α e dos seus níveis séricos que indivíduos G/G. Em estudos divididos por etnias indicam que A/A está associado com LES em Europeus, porém esse genótipo não foi observado em paciente Asiáticos. Aumento no alelo A foi observado em Colombianos, este alelo também foi observado em Alemães, mas não em Mexicanos. Este estudo o grupo caso foi constituído com pacientes do Ambulatório Araújo Lima – UFAM, e o grupo controle foram de pessoas saudáveis, sem evidência de lúpus sem relação entre si ou com os pacientes lúpicos. Este grupo foi composto por profissionais hospitalares e universitários. Foi colhido 5ml de sangue e extraído o DNA destes. Realizando-se a Reação em Cadeia de Polimerase e ensaio com enzima de restrição Nco1. Nosso presente estudo, até o momento, demonstra que há uma prevalência do genótipo G/G. O alelo G foi observado também com maior frequência, tanto no grupo caso como no grupo controle, 91,18% e 95,28% respectivamente. Diferentemente do que se foi observado nos outros estudos.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico; Polimorfismos genéticos; HLA.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multi-systemic disease, ie, affects the skin, kidneys, joints, nervous system. She is also autoimmune, polygenic origin unknown. This has several factors that may trigger the disease, as exogenous factors (sunlight, drugs) and endogenous (defect in apoptosis, sex hormones), where these factors may interact. For this to be a polygenic disease there are several genes involved, including the TNF, which is located in the centromere region of the MHC (Major Histocompatibility Complex) class III on chromosome 6 (6p21.3). This cytokine, TNF it has several functions in the body such as the top, regulation and perpetuation of the inflammatory activity. In SLE, TNFa, are at high levels, and therefore be involved with disease activity. The blocking its removal may be related to increased apoptosis. Studies show that the TNF-308A allele may be associated with increased transcriptional activity and levels of TNF. Individuals carrying G / A has increased TNF mRNA and serum levels that individuals G / G. In studies indicate that ethnic groups divided by A / A is associated with SLE in Europeans, but this genotype was not observed in Asian patients. Increased allele was observed in Colombia, this allele was also observed in German, not in Mexico. This study group was composed of patients with Araújo Lima Outpatient - UFAM, and the control group were healthy people with no evidence of unrelated lupus or lupus patients. This group was composed of professionals and university hospital. 5 ml of blood was drawn and DNA extracted from these. Performing the polymerase chain reaction and restriction enzyme assay Nco1. Our present study, to date, demonstrates that there is a prevalence of genotype G / G. The G allele was also observed more frequently, both in the case as in the control group, 91.18% and 95.28% respectively. Unlike what is observed in other studies.

Keywords: Systemic lupus erythematosus; genetic polymorphisms; HLA.

LISTA DE SIGLAS

CTAB – Brometo de Hexadeciltrimetilamônio ou Cetramina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTAB - Brometo de dodeciltrimetilamônio

EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid”

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IFN – Interferon

IL – Interleucina

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

MHC – “Major Histocompatibility Complex”

PDCD1 - “Programmed Cell Death-1”

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA_m – Ácido Ribonucléico mensageiro

RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”

SNP - “Single Nucleotide Polymorphism”

TNF – “Tumoral Necrosis Factor”

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Gel de agarose a 6% do grupo controle..... | 20 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Freqüência alelica, genotípica e de carreadores de alelo A e G do polimorfismo da posição -308 do gene TNF- α em grupo caso e controle..... | 21 |
|--|----|

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Freqüência dos genótipos GG, GA e AA em pacientes com LES e grupo controle..... | 21 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 10 |
| 2. Revisão bibliográfica..... | 11 |
| 2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico..... | 11 |
| 2.2 TNF (Fator de Necrose Tumoral)..... | 13 |
| 2.3 O TNF e o Lúpus Eritematoso Sistêmico..... | 13 |
| 3. Justificativa..... | 15 |
| 4. Objetivos..... | 17 |
| 4.1 Gerais..... | 17 |
| 4.2 Específicos..... | 17 |
| 5. Metodologia..... | 18 |
| 5.1 Casuística..... | 18 |
| 5.2 Materiais e métodos..... | 19 |
| 5.2.1 Ensaio e Amplificação de DNA (PCR) para o gene de TNF α | 19 |
| 5.2.2 Quantificação do DNA extraído..... | 20 |
| 5.2.3 Ensaio de amplificação de DNA (PCR) para o gene de TNF α | 20 |
| 5.2.4 Ensaio de restrição (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorfism) do produto de PCR com enzima <i>NcoI</i> | 20 |
| 6. Resultados e Discussão..... | 21 |
| 7. Conclusão..... | 25 |
| 8. Cronograma das atividades..... | 27 |
| 9. Referências..... | 28 |

1. Introdução

O Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença auto-imune, caracterizado pela presença de auto-anticorpos contra antígenos nucleares (anti-dupla hélice DNA, anti-nucleossomo) (RAHMAN e ISENBURG, 2008). Por definição, uma doença multi-sistêmica, podendo o paciente apresentar diversos sintomas, como por exemplo, artrite, serosite, anemia hemolítica auto-imune, trombocitopenia, doenças dérmicas e lúpus neonatal (RAHMAN e ISENBURG, 2008; MOK e LAU, 2003).

O LES é uma doença consideravelmente comum, com uma predominância que pode chegar a 1 em cada 2.500 indivíduos em uma dada população. É uma doença que ocorre predominantemente em mulheres, com uma razão de mulheres em relação aos homens de 9:1. Comparativamente, a razão entre mulheres e homens é de apenas 2:1, quando a doença se desenvolve durante a infância ou após os 65 anos de idade (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Diversos fatores podem estar ligados com a patogênese do LES, como por exemplo, fatores ambientais e genéticos, podendo estes interagir entre si (GOLDMAN, 2004). Dentre os fatores genéticos podemos citar o IL-6, o IL-10, o receptor Fc e o TNF, o qual é o foco deste estudo (AHMAD; BRUCE, 2001).

O TNF possui o efeito pró-apoptótico e anti-apoptótico, controla a ativação e a taxa de resposta de várias células, incluindo as do sistema imune e ativação assim como perpetuação das respostas inflamatórias. No LES o TNF possui efeito anti-autoimune, e seu bloqueio acarreta a ocorrência de auto-anticorpos. Entretanto, o TNF possui também um papel paradoxo a este, o papel pró-inflamatório principal no LES (ARINGER; SMOLEN, 2008).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença com causa desconhecida, poligênica auto-imune, caracterizada por presença de anticorpos contra antígenos nucleares. O LES, por definição, é uma doença multi-sistêmica, onde o paciente pode apresentá-la em diversas maneiras diferentes. O diagnóstico é feito pela determinação de o paciente apresentar quatro dos onze critérios clínicos e laboratoriais elaborado pelo Colégio Americano de Reumatologia (SCHUR, 2005; CLATWORTHY et al, 2007).

As posições cromossômicas 1q23–q25, 1q41–q42, 2q35–q37, 4p16–p15, 4q31–q33, 6p21.3, 6p22–p11, 7p22, 16p12–q13, 19q13, 20p13–p12 e 20q12 tem sido reportadas como tendo ligações no LES. Atualmente vários genes com variantes foram associados com o LES, tais como as variantes nas regiões HLA, FCGR3A, FCGR2A, PDCD1, IRF5 e PTPN22. Isto só foi possível devido a tecnologia que existe atualmente, onde foi realizado a Associação Pan-gênômica, onde pode ser analisados diversos genes relacionados a diversas doenças, uma delas o LES (HARLEY, 2008).

O polimorfismo genético é individual, ou seja, cada indivíduo carrega uma combinação particular desses genes, conferindo assim uma diversidade de manifestações genéticas, imunológicas e clínicas (PASSOS, 2007).

O LES ocorre mais freqüentemente em mulheres, com uma razão de mulheres em relação aos homens de 9:1, tendo o seu início principalmente em idades entre 16 e 55 anos (SCHUR, 2005). Estimar a prevalência do LES em uma população é de difícil avaliação devido à variabilidade da coleta de dados e inconsistência na leitura de dados, mas está claro que a estatística varia de acordo com a etnia (MANSON e RAHMAN, 2006). A prevalência do lúpus é desde aproximadamente 40 casos por 100.000 pessoas no Norte Europeu até 200 casos por 100.000 pessoas entre os negros (RAHMAN e ISENBERG, 2008). Estudo com gêmeos tem demonstrado que a concordância entre gêmeos monozigóticos é de 24 a 65% e entre gêmeos dizigóticos é de 2 a 9% (AHMAD e BRUCE, 2001).

A doença pode resultar de variados ativadores ambientais incluindo exposição à luz solar, drogas e infecções, particularmente o Vírus Epstein-Barr, fatores endógenos, como o defeito na apoptose, regulação imune, degradação de proteína, imunoglobulinas e hormônios sexuais também estão envolvidos na patogênese da doença, podendo estes fatores, endógenos e exógenos, interagirem entre si (SCHUR, 2005).

O mecanismo patológico do LES ainda não está totalmente esclarecido. A maioria dos pacientes apresenta auto-anticorpo contra antígenos nucleares, como por exemplo, o DNA de dupla-hélice (“nativo”) e de hélice única (“desnaturado”), proteínas, como as histonas (PASSOS, 2008).

A morte celular é o fenômeno mais provável que supre os auto-anticorpos. Existem duas formas de morte celular, a apoptose e a necrose (MUNOZ et al, 2005).

A apoptose é um processo de morte celular programada e regulada, tanto nas condições fisiológicas e patológicas, em todos os tecidos. Quando a morte ocorre por apoptose, a membrana das células apoptóticas apresenta mudanças importantes e características do arranjo dos fosfolipídios e açúcares. Estas mudanças morfológicas e bioquímicas são de extrema importância para o *clearance*. Se estas células não forem processadas a tempo por células apresentadoras de antígeno (macrófagos, linfócitos e células dendríticas), elas perdem a integridade da membrana e torna-se necrótica, liberando assim altas taxas de materiais nucleares e materiais citoplasmáticos. Neste caso, a inflamação e indução de respostas imunes contra os antígenos nucleares são possíveis (MUNOZ et al, 2005; SCHUR, 2005).

Quando os materiais nucleares e citoplasmáticos são processados em peptídeos, o peptídeo – complexo de histocompatibilidade principal estimula a expansão das células T *helper* auto-reativativas, através de citocinas (IL-6, IL-4, IL-10) fazem com que as células B sejam ativadas, proliferem-se e diferenciem-se em células produtoras de anticorpos a antígenos nucleares. Assim desenvolve-se níveis elevados de anticorpos antinucleares especialmente ao DNA, Sm, Ro, La, entre outros (SCHUR, 2005).

2.2 TNF (Fator de Necrose Tumoral)

Em humanos o gene TNF- α está presente na região centrômero 250kb do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe III do locus HLA-B e aproximadamente a 850kb telomérico do locus HLA-DR no cromossoma 6 (6p21.3). Esta região possui por volta de 220 genes, onde se conhece que cerca de 40% destes possuem função imune. O gene TNF possui 4 éxons e 3 íntrons . O grupo TNF- α contém vários polimorfismos incluindo micro-satélites e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). São eles, 14 SNPs (-1031 T/C, -863 C/A, -857 C/T, -851 C/T, -419 G/C, -376 G/A, -308 G/A, -244 G/A, -238 G/A, -163 G/A, -49 G/A, +489 G/A, +851 A/G, +1304 A/G), maioria na região promotora reguladora do gene TNF- α , e 6 micro-satélites foram caracterizadas (NEMEC *et al*, 2008).

Sequência de pelo menos 1.100 pb de DNA entre o fim 3' da linfotoxina- α e o fim 5' do gene TNF- α tem sido demonstrado como centro para o controle da transcrição gênica. Onze dos SNPs estão localizados na região regulatória e podem desta forma influenciar na taxa de transcrição deste gene (NEMEC *et al*, 2008).

O TNF possui diversas funções, dentre elas a de ativar células endoteliais, ocasionando a expressão de moléculas de adesão. Outra função por ela desempenha é a atividade inflamatória e reguladora, ela é a chave para o início, regulação e perpetuação da atividade inflamatória (JANEWAY, 2005; KOSS *et al*, 2000).

A organogênese do sistema linfóide é uma função que é desempenhada pelo TNF, possui também o efeito pró e anti-apoptótico, o qual depende do contexto da situação, a atração, ativação e respostas de muitas células, incluindo células do sistema imune (ARINGER e SMOLEN, 2008).

O TNF está superproduzido quando o organismo encontra-se em inflamação crônica ou com doença auto-imune (KASSIOTIS, 2001).

2.3 O TNF e o Lúpus Eritematoso Sistêmico

A redução, por meio de terapia, da atividade do TNF pode formar anticorpos contra componentes nucleares e fosfolipídeos. Esta função pode ser

em parte explicada pela hipótese relacionada a ativação do interferon (IFN)- α . Em circunstâncias normais, o TNF infra-regula o IFN- α , tem sido como hipótese que para promover a auto-imunidade, a redução do TNF deve aumentar o IFN- α . Entretanto, no LES, ambos IFN- α e TNF estão altamente elevados e os níveis de ambas citocinas estão relacionados à atividade da doença. Estes achados não apenas confrontam a hipótese, mas também sugerem que a regulação negativa de ambas as citocinas não é funcional para atividade do LES. Contudo, o aumento simultâneo do IFN- α e TNF pode contribuir para a patogênese da auto-imunidade sistêmica (ARINGER e SMOLEN, 2008).

Outra hipótese existente é a de que o bloqueio de TNF dificulta a eliminação de linfócitos B auto-ímmunes por células T citotóxicas. Finalmente o bloqueio do TNF após exposição crônica da mesma pode resultar no aumento da apoptose. O aumento de material apoptótico pode explicar o porquê dos anticorpos emergentes aparentam ter como alvo exclusivamente antígenos e fosfolípidos, ambos os quais são expressos em corpos apoptóticos (ARINGER e SMOLEN, 2008).

3. Justificativa

Na patogenia do LES, admite-se que diversos genes interajam entre si e com fatores ambientais, acarretando a quebra de tolerância imunológica e a produção de autoanticorpos patológicos (SCHUR, 2005). De maneira esquemática, pode-se dividir esses fatores genéticos e ambientais em 3 grupos:

- Fatores envolvidos na apoptose e na depuração dos restos apoptóticos, acarretando excessiva oferta de fragmentos nucleares ao sistema imune, dirigindo a produção de anticorpos anti-nucleares (MUNOZ et al, 2005).
- Fatores envolvidos na hiper-reatividade do sistema imune, gerando quebra da tolerância aos antígenos nucleares. Esses genes condicionam fenômenos de autoimunidade em geral e não apenas no LES (MUNOZ et al, 2005)
- Fatores envolvidos na circulação e depuração de complexos antígeno-anticorpo, acarretando sua deposição nos órgãos alvos da doença (PASOS, 2007).

Genes do sistema HLA, situados nos complexo maior de histocompatibilidade, não tem tanta importância na patogenia do LES quanto em outras doenças autoimunes, mas ainda assim guardam certa importância, participando na determinação da especificidade dos auto-anticorpos contra antígenos nucleares específicos (PASSOS, 2007).

O tratamento da LES baseia-se hoje em medidas imunossupressivas gerais. A descoberta de elementos moleculares e genéticos específicos é uma esperança para o desenvolvimento de terapias pontuais e específicas (ARINGER e SMOLEN, 2008) Pesquisas genéticas no LES concentram-se em estudos de *linkage* para identificar segmentos cromossômicos que abrigam genes relacionados ao LES, e em estudos de genes candidatos, nos quais a presença de variantes polimórficas de determinado gene é detectada em

pacientes lúpicos e comparada a população controle etnicamente similar. Vários genes têm sido submetidos a esse tipo de investigação, sendo necessária a reprodução do estudo em etnias diferentes para a validação do referido gene como elemento contribuinte à patogenia do LES (PASSOS, 2007).

O gene TNF α , dependendo da variante alélica presente, poderá estar relacionada à maior ou menor produção de TNF α no organismo, sendo que o perfil genético para esta citocina deve estar envolvido na patogênese da LES. Em um estudo realizado com uma população Afro-americana o polimorfismo do TNF α apresentou em pacientes com LES numa frequência de 0,188, e no grupo controle a frequência do gene foi de 0,078 (SULLIVAN, 1997).

O LES é uma doença com alta prevalência na Amazônia, com grande impacto social. A doença possui, dentre os polimorfismos, o do gene TNF α . Estudos com este gene foram realizados em grupos Europeus, Asiáticos e Colombianos, porém ainda não foram realizados em pacientes da Amazônia. Este estudo visa contribuir para o entendimento da patogênese do LES e a influência genética nos pacientes amazônicos e ancestralidade ameríndia.

4. Objetivos

4.1 Gerais

- Investigar a frequência do polimorfismo no gene do TNF α em pacientes com LES atendidos no Ambulatório Araújo Lima – UFAM.

4.2 Específicos

- Determinar a frequência dos alelos do gene da região promotora de TNF α na posição -308 A/G em pacientes com LES ;
- Investigar possível associação entre o polimorfismo do gene de TNF α em relação ao desenvolvimento ou não da LES.

5. Metodologia

5.1. Casuística

O grupo de casos foi constituído por pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, com preenchimento de pelo menos quatro dos onze critérios classificatórios publicados em 1982 pelo American College of Rheumatology (ACR) (SCHUR, 2005), modificados em 1998, quais sejam: 1- fotossensibilidade; 2 – erupção (*rash*) malar; 3 – erupção (*rash*) discóide; 4 – úlcera oral; 5 – artrite; 6- serosite; 7 – nefrite; 8 – acometimento hematológico (anemia hemolítica ou trombocitopenia ou leucopenia); 9 – acometimento neurológico (psicose ou convulsão); 10 – presença de anticorpos antinucleares em teste de imunofluorescência indireta em substrato de células HEpII (Fator Antinuclear ou FAN); 11 – critério imunológico (anticorpos anti-DNA ou anti-Sm ou anti-cardiolipina). A inclusão foi seqüencial, não tendo havido nenhuma recusa dos pacientes em participar do trabalho. Não houve exclusão por sexo, idade, tipo de manifestação ou grau de atividade da doença. A busca por pacientes deu-se apenas no Serviço de Reumatologia.

Os pacientes são nascidos na região da Amazônia. Foram considerados Amazônia os Estados brasileiros do Amazonas, Acre, Roraima, Rondônia, Pará, Amapá e Tocantins, além dos países vizinhos Peru, Colômbia, Venezuela e Guiana, Guiana Francesa e Suriname.

O grupo controle foi constituído de pessoas sadias, sem evidências clínicas atuais ou pretéritas de sinais ou sintomas de lúpus eritematoso sistêmico, sem relação de parentesco entre si e sem relação de parentesco com pacientes lúpicos. Tentou-se parear o grupo controle com o grupo caso por sexo, faixa etária e procedência. Como o LES é um fenótipo tardio, admitiu-se a inclusão de mulheres com idade superior à esperada no grupo teste. O grupo controle foi composto com profissionais hospitalares e universitários, além de comunitários vizinhos e conhecidos de pacientes lúpicos. Às pessoas convidadas foi feita uma explanação sobre as finalidades do trabalho, os riscos na participação e o sigilo com relação aos dados clínicos e moleculares. Após, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado e, colhida amostra de 5 mL de sangue venoso em veia periférica. Uma entrevista foi feita com o objetivo de registrar quaisquer doenças prévias, sintomas compatíveis com

lúpus e outras doenças auto-imunes, e história familiar de lúpus ou de outra doença auto-imune.

5.2 Materiais e Métodos

Este projeto de pesquisa está vinculado ao projeto: Polimorfismos do gene PDCD1 em pacientes da Amazônia com Lúpus Eritematoso Sistêmico aprovado no Comitê de Ética na Pesquisa da UFAM sob o número 174/2005 em 14 de novembro de 2005.

5.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA genômico dos pacientes lúpicos e indivíduos controle foi feita a partir da amostra de 5 mL de sangue venoso colhido com EDTA, utilizando a técnica de sais de brometo de tetrametilamônio - DTAB/CTAB descrita por Gustincich e colaboradores (1991) com algumas adequações. A técnica consistiu na retirada de aproximadamente 0,5 mL de amostra com a camada de leucócitos “*buffy coat*” obtida a partir do repouso do sangue por 24 horas a 4° C. As amostras foram acondicionadas em microtubos de polipropileno de 2 mL e misturadas com um volume igual (0,5 mL) de tampão de lise: DTAB (dodecyl-trimethyl-ammonium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) a 12%, NaCl 2,25 M, Tris 150 mM pH 8,6 e EDTA 75 mM, centrifugadas por sete segundos e incubadas por 10 minutos a temperatura de 68 a 70°C. Após esta etapa, foi adicionado 800µL de clorofórmio em cada tubo, e imediatamente submetido a vigorosa agitação. Após centrifugação a 10.000 x g por 2 minutos, a fase superior do sobrenadante de cada tubo foi transferida para dois novos microtubos de 2 mL, que continham 1,0 mL de CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) a 0,5% com NaCl 0,4 M. Em seguida a mistura foi lentamente homogeneizada para se obter o precipitado – DNA/CTAB. Após nova centrifugação a 10.000 x g por dois minutos, o precipitado (DNA) foi ressuspenso em 300 µL de cloreto de sódio 1,2 M e 750 µL de etanol absoluto e centrifugado por mais três minutos a 13.000 x g. As duas lavagens finais foram realizadas com etanol a 70% e centrifugadas por três minutos. O sobrenadante foi desprezado e o DNA foi posteriormente dissolvido em 100-200 µL de H₂O. O DNA extraído foi

armazenado a 20°C negativos em microtubos de polipropileno de 0,6 mL e identificados por código.

5.2.2 Quantificação do DNA extraído

As amostras de DNA obtidas de ambos os grupos foram quantificadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator – Amersham Biosciences, Pittsburgh, Estados Unidos.) e diluídas para 50 ng/μL para uso na PCR.

5.2.3 Ensaio de amplificação de DNA (PCR) para o gene de TNF α

O sítio polimórfico G/A na posição –308 do gene promotor será amplificado pelo protocolo descrito por De Jong et al. (2002) com pequenas adaptações. A seqüência alvo (147 pares de bases - pb) será amplificada com os iniciadores 5'- GAG GCA ATA GGT TTT GAG GGC CAT - 3' e 5' - GGG ACA CAC AAG CAT CAA G - 3'.

O DNA extraído (100 ng) será adicionado à PCR, em um volume final de 50 μL, contendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0,3 μM de cada iniciador e 1.25 U Taq DNA Polimerase. Os parâmetros de amplificação no termociclador constará de 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

5.2.4 Ensaio de restrição (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorfism) do produto de PCR com enzima *Nco* I

O polimorfismo para TNF α será detectado após digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Nco* I a 37°C “*overnight*” e eletroforese em gel agarose a 3% corado com *Sybergreen*. Os tamanhos dos fragmentos, visualizados em transluminador, serão definidos como genótipo G/G (126 e 21 pb), G/A (147, 126 e 21 pb) ou A/A (147 pb).

Além dos controles positivos e negativos da reação, serão realizados repetições dos ensaios de PCR-RFLP em pelo menos 20% dos casos analisados.

6. Resultados e Discussão

No processo de amplificação e digestão com a enzima de restrição *Nco*I, obtivemos 147 pares de bases (pb) correspondente ao genótipo Aa, fragmentos de 147, 126 e 21 pb correspondente ao alelo GA e fragmentos de 126 e 21 pb correspondente ao GG.

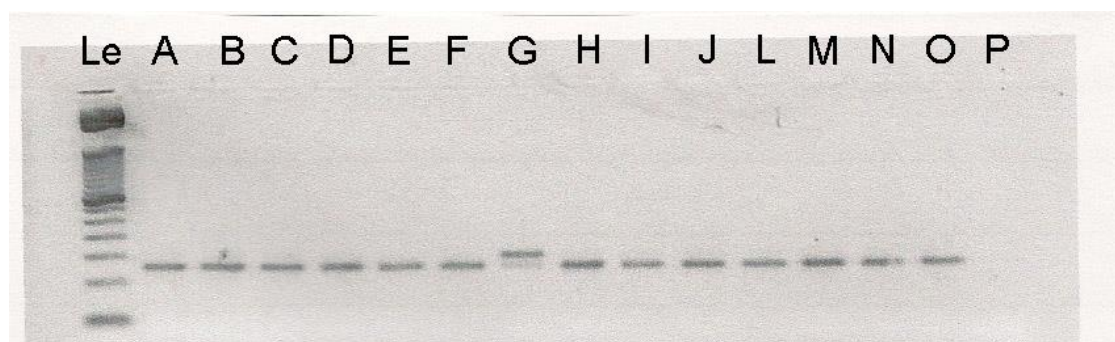


Figura 1 - Gel de agarose a 6% com o produto da digestão pela enzima *Nco*I do segmento de DNA amplificado do gene *TNF-α*, do grupo controle. Linhas “A”, “B”, “C”, “D”, “E”, “F”, “H”, “I”, “J”, “L”, “M”, “N”, “O” são genótipos GG com fragmento de 126 e 21 pb; linha “G” é genótipo GA com fragmentos de 147, 126 e 21 pb. Linha “P” é controle negativo e “Le” são *ladders* de 50 pb.

O estudo estatístico foi realizado utilizando-se o teste qui-quadrado, através do programa GraphPad Prism, versão 3 de 1999.

A frequência do alelo G na posição -308 do gene *TNF-α* foi de 91,18% no grupo de casos e de 95,28% no grupo controle. Correspondentemente, a frequência do alelo A foi de 8,82% no grupo de casos e de 4,71% no grupo controle. Os genótipos GG, GA e AA no grupo de casos foram 82,35%, 17,65% e 0% e, respectivamente, 90,57%, 9,43% e 0% no grupo controle. Os carreadores do alelo G, isto é, indivíduos GG e GA foram 100% no grupo de casos e 100% no grupo controle. Os carreadores do alelo A, isto é, indivíduos AA e GA foram 17,65% no grupo de casos e 9,43% no grupo controle. Não houve diferença significativa estatisticamente ($p > 0,05$) quanto à frequência alélica, às frequências genotípicas e a frequência de carreadores entre os dois grupos. Esses dados estão resumidos na Tabela 1. O Gráfico 1 demonstra um comparativo do genótipo entre o grupo caso e o grupo controle.

| Genotipagem | Grupo Casos (n=85) | Grupo Controles (n=53) | "p" |
|------------------------|-----------------------|---------------------------|--------|
| Alelo G | 91,18% (155/170) | 95,28% (101/106) | 0,2006 |
| Alelo A | 8,82% (15/170) | 4,71% (5/106) | 0,2006 |
| Genótipo GG | 82,35% (70/85) | 90,57% (48/53) | 0,1825 |
| Genótipo GA | 17,65% (15/85) | 9,43% (5/53) | 0,2433 |
| Genótipo AA | 0% (0/85) | 0% (0/53) | 1 |
| Carreadores do alelo G | 85 (100%) | 53 (100%) | 0,2451 |
| Carreadores do alelo A | 15 (17,65%) | 5 (9,43%) | 0,2451 |

Tabela 1 – Frequências alélica, genotípica e de carreadores do alelo A e G do polimorfismo da posição -308 do gene *TNF-α* em grupo casos e controles

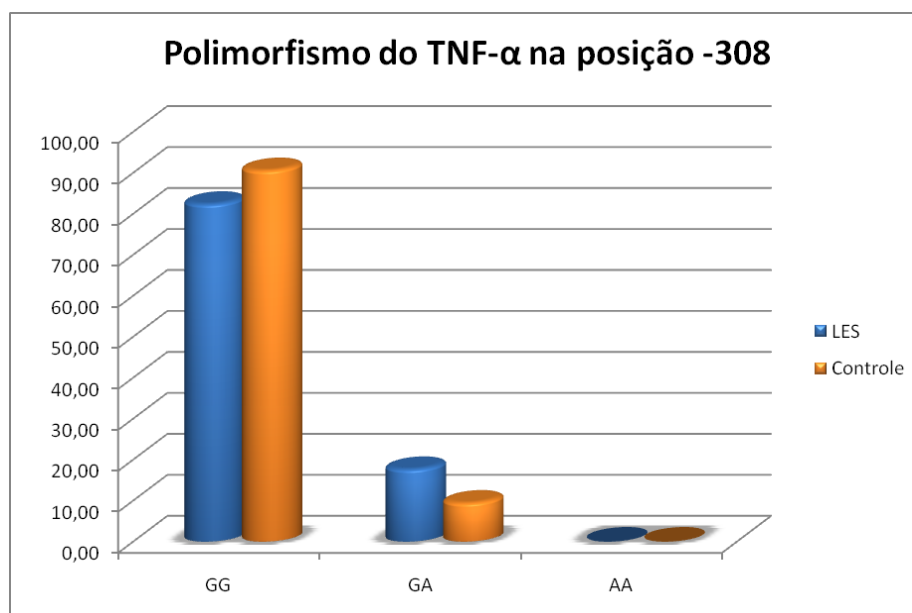


Gráfico 1 – Frequência dos genótipos GG, GA e AA em pacientes com LES e grupo controle.

As duas populações respeitam o equilíbrio de Hardy-Weinberg, presumindo-se pan-mixia.

A importância do TNF- α na patogênese do LES ainda é incerta, mas mesmo diferenças pequenas na produção do TNF- α pode influenciar no resultado auto-imune da doença (LEE, 2006).

Existem diversos SNPs para o TNF- α , porém os mais estudados são o polimorfismo na região promotora da posição -308 G/A e -238 G/A. Não há estudos fortes que evidenciem que a posição -308 esteja relacionada ao local de ligação para os fatores de transcrição, ou correlacionados com a expressão de proteínas. Entretanto, o alelo TNF- α -308A aparenta estar associado com aumento na atividade de transcrição e nos níveis de TNF. Na verdade, estudos recentes têm mostrado que indivíduos que carregam G/A tem aumento de RNAm de TNF- α e dos níveis séricos de concentração que indivíduos G/G; o genótipo A/A não se mostrou presente nas amostras (JIMÉNEZ-MORALES, 2009).

Estudos de meta-análise foram realizados em relação ao SNP -308 do TNF- α , onde foram demonstrados que a associação entre LES e A/A como genótipo de risco (assumindo alelo A como alelo recessivo) foi encontrada na população global. Entretanto quando estratificado por etnias indicam que o genótipo A/A está significativamente associado com LES em Europeus. Não foi encontrada associação com genótipo A/A em pacientes com LES em grupos asiáticos (LEE, 2006).

Assumindo alelo A como um alelo dominante, o odds ratio (OR) para combinação A/A+G/A foi 2,0 95% IC = 1,3-3,1 e $p < 0,001$). Quando estratificado por etnia, o OR aumentou de forma significativa em grupos europeus (OR=2,9, 95% IC = 2,0 – 4,2, $p < 0,001$), mas não em asiáticos (OR=1,3, 95% IC = 0,5 – 3,1, $p = 0,44$) (LEE, 2006).

Em um estudo Colombiano foi observado um aumento na frequência do alelo A do TNF α -308 em pacientes com LES em relação ao grupo controle (GUAMIZO-ZUCCARDI, 2007).

Maior frequência e maior produção do TNF- α , com genótipo G/A e A/A, foram encontrados nos pacientes com LES que no grupo controle (0,248 vs. 0,138, respectivamente). A frequência do TNF- α -308A é maior em pacientes com LES Colombianos, assim como Alemães, mas não em Mexicanos. (GUAMIZO-ZUCCARDI, 2007).

Neste presente estudo observa-se uma maior prevalência do genótipo G/A em relação ao grupo controle e não foi observado nenhum genótipo A/A tanto no grupo caso como no grupo controle. O alelo G foi observado com maior frequência em nosso estudo, tanto no grupo caso como no controle, 91,18% e 95,28% respectivamente. O alelo A com 8,82% e 4,71%, no grupo caso e controle, respectivamente. Observando-se assim que não está em consonância com outros estudos realizados.

O HLA de classe III, incluindo o TNF- α , está entre a região de classe I e II e outros genes importantes para o sistema imune, incluindo os componentes C2 e C4 do complemento. A região promotora do TNF- α -308A e HLA-DR contribuem independentemente para a susceptibilidade do LES em Sul-africanos, enquanto o alelo A do TNF- α está ligado ao desequilíbrio do alelo HLA-DR3 nos pacientes caucasianos com LES (LEE, 2006).

7. Conclusão

Os SNPs mais estudados para o TNF são o – 308 G/A e – 38 G/A. O alelo TNF – 308^a apresenta estar associado com aumento na atividade de transcrição no níveis de TNF. Estudos mostraram que indivíduos G/A tem aumento no RNAm de TNF (JIMÉNEZ-MORALES, 2008).

Observou-se aumento do alelo A em pacientes com LES em Colombianos, mas não em Mexicanos (GUAMIZO-ZUCCARDI, 2007). Estes povos são os que possuem características mais semelhantes com os amazônicos. Em nossos estudos o alelo não foi tão frequente como nesses povos, sendo mais frequentes o alelo G.

No presente estudo observamos que o LES é uma doença auto-imune poligênica, onde fatores intrínsecos e extrínsecos estão envolvidos, logo mesmo que um único fator possa estar associado ou não ao LES o paciente

pode vir a não apresentar a doença, assim como poderá ou não apresentar determinado sintoma, uma vez que é dependente de vários outros fatores.

7. Cronograma das atividades

| Nº | Descrição | Ago 2008 | Set | Out | Nov | Dez | Jan 2009 | Fev | Mar | Abr | Mai | Jun | Jul |
|----|--|-------------|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | Revisão Bibliográfica | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 2 | Padronização do Ensaio de amplificação do TNF α | R | R | R | | | | | | | | | |
| 3 | Execução dos ensaios de amplificação do TNF α com os DNA armazenados de LES e controles | | | | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 4 | Análise parcial dos resultados | | | | | | R | R | R | R | R | R | R |
| 5 | Elaboração da apresentação oral (parcial) | | | | R | | | | | | | | |
| 6 | Elaboração do relatório parcial | | | | | R | R | | | | | | |
| 7 | Análise final dos resultados | | | | | | | | | R | R | R | R |
| 8 | Elaboração do Resumo e Relatório Final | | | | | | | | | | R | R | R |
| 9 | Preparação da Apresentação Final para o Congresso | | | | | | | | | | | | NR |

8. Referências

AHMAD, Y. M.; BRUCE, I. N.; **Genetic Epidemiology - Systemic Lupus Erythematosus** Arthritis Res, Vol. 3, n. 6, p. 331-336, 2001.

ARINGER, M.; SMOLEN, J. S. **SLE - Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus** Arthritis Research & Therapy, Vol. 5, n. 4, 172-177, 2003

ARINGER, M.; SMOLEN, J. S. **The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus** Arthritis Research & Therapy, Vol. 10, n. 1, p. 202, 2008.

GUARNIZO-ZUCCARDI, P. *et al* **Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus** Tissue antigens n. 70, p. 376-382, 2007.

GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G.; SCHNEIDER, G.; CARNINCI, P. A. **Fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood.** Biotechniques. v.11, n.3, p.298-300, 1991.

HARLEY, J. B. *et al* **Genome wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci.** Nature, vol.40, n.2, p.204-210, 2008.

JIMÉNEZ-MORALES, S. *et al* **Tumor necrosis factor- α is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population** Human Immunology n.70, p.251-256, 2009.

KASSIOTIS, G.; KOLLIAS, G. **TNF and receptors in organ-specific autoimmune disease: multi-layered functioning mirrored in animal models** The Journal of Clinical Investigation, Vol. 107, n. 12, p.1507 – 1508, 2001.

KOSS, K.; SATSANG, J.; FANNING, G. C.; WELSH, K. I.; JEWELL, D. P. **Cytokine (TNF, LT and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies** Genes and immunity, Vol.1, p. 185-190, 2000.

KUMAR, V. ; ABBAS, A. K.; Fausto, N. **Robbins & Cotran – Patologia: Bases patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LEE, Y. H.; HARLEY, J. B.; NATH, S. K. **Meta-analysis of TNF- α promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility** European Journal of Human Genetic, vol. 24, p.364-371, 2006.

MANSON, J. J.; RAHMAN, A. **Systemic lupus erythematosus** Orphanet Journal of Rare Diseases, Vol. 1, n. 6, 2006.

MOK, C. C. e LAU, C. S. **Pathogenesis of systemic lupus erythematosus**. **Journal of Clinical Pathology**. Vol.56 , p.481-490, 2003.

MUNOZ, L. E.; GAJPL, U.S.; FRANZ, S.; SHERIFF, A.; VOLL, R. E.; KALDEN, J. R.; HERRMANN, M. **SLE—a disease of clearance deficiency?** Rheumatology, Vol, 44, p. 1101-1107, 2005.

NEMEC *et al.* **Polymorphism in the tumor necrosis factor- α gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population** Clin Rheumatol, Vol. 27, p.59-65, 2008.

PASSOS, L. F. de S. **Medicina genômica no lúpus eritematoso sistêmico** Jornal da LIRNNE. Vol 4, n. 1, p.152-158, 2008.

PASSOS, L. F. de S. **Polimorfismo do gene *PDCD1* EM PACIENTES DA Amazônia com lúpus eritemato sistêmico** UFAM, 2007.

PERREY C. et al. **ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF- α , TNF- β and TGF- β 1 gene polymorphisms**. Transplant Immunology. Volume 7, N. 2, p.127-128, 1999.

RAHMAN, A.; ISENBERG, D.A. **Systemic Lupus Erythematosus** The New England Journal of Medicine. Volume 358, n. 9, p. 929-939, 2008.

SCHUR, P. H. **Lúpus Eritematoso Sistêmico** In: GOLDMAN, L; AUSIELLO, D. **Cecil – Tratado de medicina interna**, 22^a Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005 Volume 2, Cap. 208, p. 1937-1947

SULLIVAN, K. E.; WOOTEN, C.; SCHMECKPEPER, B. J.; GOLDMAN, D.;
PETRI, M. A. **A promoter polymorphism of tumor necrosis factor [alpha]
associates with systemic lupus erythematosus in African-americans**
American College of Rheumatology. Vol 40, n. 12, p. 2207-2211, 1997.